

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



EVA JERIČ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



EVA JERIČ

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA DERIVATOV 3-AMINO-2-
TIOKSOTIAZOLIDIN-4-ONA IN 1H-PIROL-3-AMINA KOT
POTENCIALNIH ZAVIRALCEV GIRAZE B**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF 3-AMINO-2-THIOXO-
THIAZOLIDIN-4-ONE AND 1H-PYRROLE-3-AMINE
SCAFFOLD DERIVATIVES AS POTENTIAL INHIBITORS
OF DNA GYRASE B**

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Danijela Kiklja, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Roka Frlana, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo ter na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Biološko testiranje je bilo opravljeno na Fakulteti za farmacijo.

Zahvala

Zahvaljujem se svojemu mentorju, prof. dr. Danijelu Kiklju, mag. farm., za sprejeto mentorstvo in vso pomoč pri izdelavi naloge. Iskreno se zahvaljujem tudi svojemu somentorju, asist. dr. Roku Frlanu, mag. farm., za vso posredovano znanje in izkušnje, predvsem pa za potrpežljivost pri eksperimentalnem delu. Hvala tudi ostalim članom Katedre za farmacevtsko kemijo.

Zahvalila bi se tudi mami, očetu in sestri za podporo tekom študija. Hvala vsem prijateljicam in prijateljem.

Za konec še zahvala moji pokojni noni, ki me je navdušila za ta poklic.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Danijela Kiklja, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Roka Frlana, mag. farm.

Eva Jerič

Ljubljana, 2014

VSEBINA

1	UVOD	1
1.1	Protibakterijske učinkovine in njihovi mehanizmi delovanja.....	1
1.2	Odpornost na antibiotike.....	2
1.3	DNA giraza	3
1.4	Zaviralci DNA giraze.....	5
2	NAČRT DELA.....	9
3	MATERIALI IN METODE	11
3.1	MATERIALI	11
3.2	METODE.....	11
3.2.1	Kromatografske metode	11
3.2.2	Spektroskopske metode	12
3.2.3	Določanje temperature tališča	13
3.2.4	Elementna analiza.....	13
3.2.5	Biološko testiranje spojin	13
3.2.6	Molekulsko modeliranje	13
3.2.7	Poimenovanje in risanje spojin.....	13
4	EKSPERIMENTALNO DELO.....	14
4.1	REAKCIJSKE SCHEME.....	14
4.1.1	Shema 1: Sinteza Boc-gvanidina (2)	15
4.1.2	Shema 2: Sinteza 3-bromo-1,1-dimetoksipropan-2-ona (4).....	15
4.1.3	Shema 3: Sinteza <i>tert</i> -butil-2-[bis(<i>tert</i> -butoksikarbonil)amino]-5-formilimidazol-1-karboksilata (7)	15
4.1.4	Shema 4: Sinteza <i>N</i> -(4-okso-2-tiokso-tiazolidin-3-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida (9).....	15
4.1.5	Shema 5: Sinteza <i>N</i> -[(5 <i>E</i>)-5-[(2-amino-1 <i>H</i> -imidazol-5-il)metilen]-4-okso-2-tiokso-tiazolidin-3-il]-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida (11).....	16
4.1.6	Shema 6: Sinteza benzilnih derivatov <i>N</i> -(4-okso-2-tiokso-tiazolidin-3-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida (17, 18, 19, 20, 21).....	16

4.1.7	Shema 7: Sinteza nitro derivatov 2,2,2-trikloro-1-(1 <i>H</i> -pirol-2-il)etanona (23 , 24)	18
4.1.8	Shema 8: Sinteza derivatov 1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline (27 , 28 , 29)	18
4.1.9	Shema 9: Sinteza metil (4-amino-1 <i>H</i> -pirol-2-karbonil)glicinata (32)	18
4.1.10	Shema 10: Sinteza (4-(1 <i>H</i> -indol-2-karboksamido)-1 <i>H</i> -pirol-2-karbonil)glicina (35)	18
4.1.11	Shema 11: Sinteza derivatov (4-(1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-1 <i>H</i> -pirol-2-karbonil)glicina (39 , 40 , 41)	19
4.2	SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ	19
4.2.1	Boc-gvanidin (2)	19
4.2.2	3-bromo-1,1-dimetoksiopropan-2-on (4)	20
4.2.3	<i>tert</i> -butil 2-amino-5-(dimetoksimetil)imidazol-1-karboksilat (5)	20
4.2.4	<i>tert</i> -butil 2-[bis(<i>tert</i> -butoksikarbonil)amino]-5-(dimetoksimetil)imidazol-1-karboksilat (6)	21
4.2.5	<i>tert</i> -butil 2-[bis(<i>tert</i> -butoksikarbonil)amino]-5-formil-imidazol-1-karboksilat (7)	22
4.2.6	<i>N</i> -(4-okso-2-tiokso-tiazolidin-3-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid (9)	23
4.2.7	<i>tert</i> -butil <i>N-tert</i> -butoksikarbonil- <i>N</i> -[5-[(<i>E</i>)-[4-okso-3-(1 <i>H</i> -pirol-2-karbonilamino)-2-tiokso-tiazolidin-5-iliden]metil]-1 <i>H</i> -imidazol-2-il]karbamat (10)	24
4.2.8	<i>N</i> -[(5 <i>E</i>)-5-[(2-amino-1 <i>H</i> -imidazol-5-il)metilen]-4-okso-2-tiokso-tiazolidin-3-il]-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid (11)	25
4.2.9	Benzilni derivati <i>N</i> -(4-okso-2-tiokso-tiazolidin-3-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida (17 , 18 , 19 , 20 , 21)	26
4.2.10	2,2,2-trikloro-1-(5-nitro-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etanon (23) in 2,2,2-trikloro-1-(4-nitro-1 <i>H</i> -pirol-2-il)etanon (24)	31
4.2.11	Derivati 1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline (27 , 28 , 29)	32
4.2.12	Metil (4-nitro-1 <i>H</i> -pirol-2-karbonil)glicinat (31)	34
4.2.13	Metil (4-amino-1 <i>H</i> -pirol-2-karbonil)glicinat (32)	35
4.2.14	Metil (4-(1 <i>H</i> -indol-2-karboksamido)-1 <i>H</i> -pirol-2-karbonil)glicinat (34)	36
4.2.15	Derivati metil (4-(1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-1 <i>H</i> -pirol-2-karbonil)glicinata (36 , 37 , 38)	37
4.2.16	Derivati 4-karboksamido-1 <i>H</i> -pirol-2-karbonilglicina (35 , 39 , 40 , 41)	41
4.2.17	(4-(4,5-dibromoprol-2-karboksamido)-1 <i>H</i> -pirol-2-karbonil)glicin (40)	44

5	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	46
5.1	KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	46
5.1.1	Tvorba imidazolnega obroča	46
5.1.2	Sinteza amidne vezi	49
5.1.3	Knoevenaglova kondenzacija	54
5.1.4	Uvajanje nitro skupine na pirol	56
5.1.5	Hidroliza estra do karboksilne skupine	58
5.1.6	Redukcija nitro skupine do amina	58
5.2	SEZNAM KONČNIH SPOJIN TER KOMENTAR BIOLOŠKEGA TESTIRANJA	59
5.3	MOLEKULSKO MODELIRANJE	61
6	SKLEP	63
7	LITERATURA	65

KAZALO SLIK

<i>Slika 1:</i>	Pretvorba relaksirane oblike krožne DNA v negativno superzvito.....	4
<i>Slika 2:</i>	Struktura DNA giraze.....	4
<i>Slika 3:</i>	Katalitični cikel DNA giraze.....	5
<i>Slika 4:</i>	Predstavniki prve do četrte generacije kinolonov.	6
<i>Slika 5:</i>	Kemijski strukturi novobiocina in klorobiocina.	7
<i>Slika 6:</i>	Kemijska struktura ciklotialidina GR12222X.....	7
<i>Slika 7:</i>	Kemijska struktura zaviralca GyrB s pirolamidnim obročem.....	8
<i>Slika 8:</i>	Kemijska struktura 4-[(4'-metil-2'-(propanoilamino)-4,5'-bi-1,3-tiazol-2-il)amino]benzojske kisline.....	8
<i>Slika 9:</i>	Interakcije izhodiščne spojine s tarčo.....	9
<i>Slika 10:</i>	Spremembe izhodiščne spojine po dveh sinteznih poteh.	10
<i>Slika 11:</i>	Splošna shema sinteze substituiranega imidazola.....	46
<i>Slika 12:</i>	Sintezi substituiranih 2-aminoimidazolov.....	46
<i>Slika 13:</i>	Shema sinteze <i>terc</i> -butil-2-amino-5-(dimetoksimetil)imidazol-1-karboksilata... 47	47
<i>Slika 14:</i>	Zaščita primarnega amina z Boc ₂ O in odščita Boc-zaščitenega primarnega amina.	48

<i>Slika 15:</i> Kislinsko katalizirana pretvorba keto-oblike v enol.	48
<i>Slika 16:</i> Bromiranje ketonov na α mestu, 2. in 3. stopnja kislinsko katalizirane reakcije.	49
<i>Slika 17:</i> Mehanizem aktivacije karboksilne kisline s SOCl_2 in DMF kot katalizatorjem.	50
<i>Slika 18:</i> Reakcijska shema nastanka amidne vezi med trikloroacetilpirolom in primarnim aminom.	51
<i>Slika 19:</i> Kemijska struktura reagenta EDC.	51
<i>Slika 20:</i> Aktivacija karboksilne kisline z EDC in HOBt ter stranski produkti reakcije. ...	52
<i>Slika 21:</i> Nastanek gvanidinskega derivata.	52
<i>Slika 22:</i> Sinteza peptidne vezi s sklopitvenim reagentom TBTU.	53
<i>Slika 23:</i> Natrijeva sol spojine 37	53
<i>Slika 24:</i> Splošna shema Knoevenaglove kondenzacije.	54
<i>Slika 25:</i> Mehanizem Knoevenaglove kondenzacije.	54
<i>Slika 26:</i> Reakcija dvojne vezi z vodo do nastanka aldehida in <i>N</i> -(4-okso-2-tiokso-tiazolidin-3-il)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida.	55
<i>Slika 27:</i> Michaelovi akceptorji.	56
<i>Slika 28:</i> Enačba reakcije nastanka šibkega elektrofilnega reagenta AcONO_2	56
<i>Slika 29:</i> Prikaz resonančnih struktur intermediata elektrofilne aromatske substitucije na pirolu z elektrofilom vezanim na mestih 2 ali 3.	57
<i>Slika 30:</i> Usmerjanje elektron-privlačne skupine na mesto 4.	57
<i>Slika 31:</i> Reakcija nastanka 5-nitro regioizomera.	57
<i>Slika 32:</i> B_c2 mehanizem bazično uravnane hidrolize karboksilnega estra.	58
<i>Slika 33:</i> Spojina 40 v aktivnem mestu GyrB.	62
<i>Slika 34:</i> Spojina 41 v aktivnem mestu GyrB.	62

KAZALO TABEL

<i>Tabela 1:</i> Sinteza imidazola pri različnih reakcijskih pogojih.	49
<i>Tabela 2:</i> Seznam spojin in rezultati testiranja na zaviranje giraze B <i>E. coli</i>	60
<i>Tabela 3:</i> Rezultati testiranja spojine 40	61

POVZETEK

Sposobnost bakterij, da pridobijo odpornost na določene antibiotike, predstavlja največji izziv pri načrtovanju novih protibakterijskih učinkovin. V boju proti bakterijski rezistenci sta pomembna predvsem identifikacija novih potencialnih protibakterijskih tarč in načrtovanje spojin z novimi mehanizmi delovanja ter z delovanjem na več tarč hkrati. ATP domena bakterijske DNA giraze predstavlja novejšo protibakterijsko tarčo. Omenjeni encim katalizira proces zvijanja krožne dvovijačne DNA v negativno superzvito obliko, pri čemer porablja energijo, ki jo pridobi s hidrolizo ATP.

V magistrski nalogi smo se osredotočili na načrtovanje in sintezo potencialnih zaviralcev DNA giraze B, ki se vežejo v ATP vezavno mesto te podenote. Pri načrtovanju smo izhajali iz 4-[(4'-metil-2'-(propanoilamino)-4,5'-bi-1,3-tiazol-2-il)amino]benzojske kisline, ki zavira encim z $IC_{50} = 1,1 \pm 0,2 \mu M$ in za katero je znana kristalna struktura v kompleksu z encimom. Sintetizirali smo deset končnih spojin, od tega šest derivatov 3-amino-2-tioksotiazolidin-4-ona in štiri derivate 1*H*-pirol-3-amina. Čistost in ustreznost sintetiziranih spojin smo ovrednotili z vsemi potrebnimi analiznimi metodami: kromatografske metode (TLC, HPLC), spektroskopske metode (1H -NMR, ^{13}C -NMR, IR, MS), določitev temperature tališča in elementna analiza. Končne spojine ter njihove zaščitene derivate smo testirali na girazno aktivnost, od katerih se je kot najbolj obetaven zaviralec izkazal (4-(4,5-dibromopirrol-2-karboksamido)pirrol-2-karbonil)glicin z $IC_{50} = 61,3 \mu M$, ki je derivat 1*H*-pirol-3-amina, medtem ko so se derivati 3-amino-2-tioksotiazolidin-4-ona izkazali za neaktivne. Zaviralno aktivnost omenjene spojine smo dodatno preverili s SPR testom, ki je pokazal, da ima spojina zaradi svojih agregacijskih lastnosti slabše inhibitorne lastnosti od prvotno določenih. Tudi testiranje na *in vitro* protibakterijsko aktivnost na treh bakterijskih sevih je pokazalo, da spojina nima merljive protibakterijske aktivnosti.

Ključne besede: odpornost na antibiotike, ATP domena, sinteza, zaviralci, ATP vezavno mesto, 3-amino-2-tioksotiazolidin-4-on, 1*H*-pirol-3-amin, sidranje, DNA giraza B, IC_{50} .

ABSTRACT

The ability of bacteria to acquire resistance to certain antibiotics represents a major challenge in the design of new antibacterial agents. In order to combat bacterial resistance it is particularly important to identify new antibacterial targets and to design compounds with new action mechanisms and compounds active on several targets simultaneously. ATP domain of bacterial DNA gyrase represents a newer antibacterial target. This enzyme catalyzes the process of turning a circular double stranded DNA into a negative supercoiled molecule utilizing energy which is obtained by the hydrolysis of ATP.

The master thesis was focused on the design and synthesis of potential inhibitors of DNA gyrase B, which bind to the ATP binding site of this subunit. 4-[(4'-methyl-2'-(propanoylamino)-4,5'-bi-1,3-thiazol-2-yl)amino]benzoic acid with $IC_{50} = 1,1 \pm 0,2 \mu M$ was used as a starting point for design and ten final compounds were synthesized, six of them being derivatives of 3-amino-2-thioxo-thiazolidin-4-one scaffold, and four of them derivatives of 1H-pyrrole-3-amine scaffold. Identity and purity of compounds was proven using a standard set of analytical methods: chromatographic methods (TLC, HPLC), spectroscopic methods (1H -NMR, ^{13}C -NMR, IR, MS), melting point determination and elemental analysis. Final compounds and their protected derivatives were tested for the activity against DNA gyrase and (4-(4,5-dibromo-1H-pyrrole-2-carboxamido)-1H-pyrrole-2-carbonyl)glycine was found to have weak inhibitory activity against DNA gyrase B ($IC_{50} = 61,3 \mu M$.) while other derivatives were found inactive. The activity of (4-(4,5-dibromo-1H-pyrrole-2-carboxamido)-1H-pyrrole-2-carbonyl)glycine was further tested by SPR assay, where aggregating properties of the compound were detected and the determined inhibitory activity against gyrase B was therefore much weaker than initially found. Unfortunately, this compound also showed no detectable *in vitro* antibacterial activity against three bacterial strains.

Key words: resistance to antibiotics, ATP domain, synthesis, inhibitors, ATP binding site, 3-amino-2-thioxo-thiazolidin-4-one, 1H-pyrrole-3-amine, docking, DNA gyrase B, IC_{50} .

SEZNAM OKRAJŠAV IN SIMBOLOV

AAC	aminoglikozid acetiltransferaze
Ac ₂ O	acetanhidrid
ANT	aminoglikozid adeniltransferaze
APH	aminoglikozid fosfotransferaze
ATP	adenozin trifosfat
ATR	oslabljena popolna odbojnost (angl. Attenuated Total Reflectance)
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
Boc ₂ O	<i>Boc</i> -anhidrid
br.	širok signal (angl. broad)
CDCl ₃	devteriran kloroform
d	dublet
DCC	dicikloheksil karbodiimid
dd	dublet dubleta
DMAP	4-dimetilaminopirirdin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO-d ₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ESI	ionizacija z razprševanjem raztopin v električnem polju (angl. Electrospray Ionisation)
Et ₃ N	trietilamin

EtOAc	etil acetat
EtOH	etanol
EWG	elektron-privlačna skupina
G+	po Gramu pozitivne bakterije
G-	po Gramu negativne bakterije
GyrA	podenota A encima DNA giraza
GyrB	podenota B encima DNA giraza
Hex	<i>N</i> -heksan
HOBt	hidroksibenzotriazol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (angl. High-Performance Liquid Chromatography)
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti (angl. High Resolution Mass Spectrometry)
IC ₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
IR	infrardeča spektroskopija
IUPAC	mednarodno združenje za čisto in uporabno kemijo (angl. The International Union of Pure and Applied Chemistry)
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
lit.	literaturni podatek
m	multiplet
MeCN	acetonitril
MeOD	devteriran metanol
MeOH	metanol
MF	mobilna faza

Mr	molekulska masa
MRSA	proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	masna spektrometrija
NaOAc	natrijev acetat
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
OEt	etoksi skupina
OMe	metoksi skupina
OR	alkoksi skupina
q	kvartet
QRDR	regija povezana z rezistenco na kinolone (angl. Quinolone Resistance-determining Region)
RA	rezidualna aktivnost
Rf	retencijski faktor
r.t.	sobna temperatura
s	singlet
SPR	površinska plazmonska resonanca (angl. Surface Plasmon Resonance)
t	triplet
TBTU	2-(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev tetrafluoroborat
TFA	trifluoroacetna kislina
THF	tetrahidorfuran
TLC	tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan

t_R	retencijski čas
T_T	temperatura tališča
VRE	proti vankomicinu odporni enterokoki
δ	kemijski premik
$\bar{\nu}$	valovno število

1 UVOD

Antibiotiki so definirani kot naravni metabolični produkti bakterij ali gliv ter njihovi sintezni derivati, ki že v majhnih količinah zavirajo rast mikroorganizmov brez učinka na gostitelja (1).

1.1 PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE IN NJIHOVI MEHANIZMI DELOVANJA

Protimikrobne spojine imajo bakteriostatično ali baktericidno delovanje. Bakteriostatiki najprej zavrejo rast ali reprodukcijo mikroorganizmov, nato imunski sistem gostitelja odstrani mikroorganizem iz sistema, medtem ko povzročijo baktericidi smrt bakterije neodvisno od delovanja imunskega sistema gostitelja (2).

Antibiotike razdelimo glede na izvor (naravni, polysintezni in sintezni) ali spekter delovanja (ozkospektralni, širokospektralni), običajno pa jih delimo v različne razrede glede na mehanizem delovanja. Protibakterijske učinkovine izkazujejo selektivno toksičnost, to pomeni, da selektivno delujejo na strukturo ali funkcijo, ki je nujno potrebna za rast in preživetje bakterij, ne da bi bile toksične za gostitelja (3).

Glavni mehanizmi delovanja so naslednji (4):

▪ ZAVIRANJE BIOSINTEZE CELIČNE STENE

- a) Vezava učinkovin v aktivno mesto transpeptidaze: *spojine z β -laktamskim obročem (penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami).*
- b) Vezava učinkovin na D-Ala-D-Ala terminalne dele pentapeptidnih verig, ki sodelujejo v sintezi mostov med verigami peptidoglikana (inhibicija transglikozilacije): *glikopeptidi (vankomicin in teikoplanin).*
- c) Vezava na lipidni prenašalec, ki je odgovoren za prenos N-acetilmuraminske kisline: *polipeptid bacitracin (5).*

▪ ZAVIRANJE BIOSINTEZE PROTEINOV

- a) Vezava učinkovin na 30S podenoto bakterijskega ribosoma: *tetraciklini (tetraciklin, doksiciklin, minociklin), aminoglikozidi (amikacin, gentamicin, tobramicin), gliciklini (tigeciklin).*
- b) Vezava učinkovin na 50S podenoto bakterijskega ribosoma: *makrolidi (eritromicin, azitromicin, klaritromicin), ketolidi (telitromicin), oksazolidinoni (linezolid), klindamicin in kloramfenikol, streptogramini (kvinuipristin-dalfopristin).*

- **ZAVIRANJE SINTEZE NUKLEINSKIH KISLIN**
 - a) Zaviranje bakterijske DNA giraze in topoizomeraze IV: *kinoloni (nalidiksna kislina, ciprofloksacin, levofloksacin, moksifloksacin)*.
- **ZAVIRANJE METABOLIZMA FOLATOV – ANTIMETABOLITI**
 - a) Inhibitorji dihidropteroat sintaze: *sulfonamidi (sulfametoksazol)*.
 - b) Kompetitivni inhibitor dihidrofolat reduktaze: *trimetoprim*.
- **ZAVIRANJE FUNKCIJE CELIČNE MEMBRANE**
 - a) Vezava učinkovine v citoplazemsko membrano in sprememba ionskega gradienta: *lipopeptidi (daptomicin)*.
 - b) Povečana permeabilnost celične membrane: *ciklični polipeptidi – polimiksini (4)*.

1.2 ODPORNOST NA ANTIBIOTIKE

Protimikrobna odpornost predstavlja vedno večji problem javnega zdravstva v svetu. Odpornost se lahko pojavi že v nekaj letih od prihoda antibiotika v klinično prakso (2). Z neustrezno in pretirano uporabo protibakterijskih učinkovin se odpornost še povečuje. Posledica tega je neučinkovitost antibiotika in s tem neučinkovito zdravljenje infekcij (6).

Kontinuiran selektivni pritisk širokospektralnih protimikrobnih učinkovin je povzročil razvoj večkratno odpornih organizmov (angl. multi drug resistance - MDR). MDR definiramo kot odpornost na več kot 3 skupine antibiotikov hkrati (7). Med najbolj problematične MDR organizme danes prištevamo *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, proti vankomicinu odporni enterokoki (VRE), proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus* (MRSA) in proti vankomicinu odporni MRSA (8).

Rezistenco na antibiotike delimo na dva tipa, prirojeno ali pasivno in pridobljeno ali aktivno rezistenco (9). V primerih, ko mikroorganizmi ne posedujejo tarčnega mesta ali so neprepustni za protibakterijsko učinkovino, so le-ti prirojeno odporni na več kot en razred protibakterijskih učinkovin. Prirojena odpornost je značilna za celotno bakterijsko vrsto in sevi te bakterijske vrste so rezistentni na antibiotike z enakim mehanizmom delovanja. Pri pridobljeni rezistenci lahko sprva občutljive populacije bakterij postanejo odporne na antibiotik s spontanimi mutacijami genov. Mutirane bakterije, ki preživijo selektivni pritisk antibiotika, se naprej razmnožujejo ter tako prenašajo nov genski zapis na svoje potomce (vertikalna evolucija). Bakterije pridobijo odpornost na protimikrobne učinkovine tudi preko izmenjave genskih informacij z rezistentnimi organizmi (horizontalna evolucija) (7).

Prenos genskega materiala je mogoč med sevi iste bakterijske vrste kot tudi med sevi različnih vrst. Izmenjava genskega materiala lahko poteka na tri načine, s konjugacijo, transdukcijo in transformacijo. Pri konjugaciji se zapis za rezistenco prenaša s plazmidi, pri transdukciji z bakteriofagi, pri transformaciji pa neodporna bakterija privzame golo DNA, ki nosi gen za protimikrobno odpornost (10).

Ločimo tri glavne mehanizme, ki bakterijam omogočajo odpornost na antibiotike:

1. Sinteza encimov, ki inaktivirajo učinkovino.

Rezistentna bakterija sintetizira encime, ki s hidrolizo, substitucijo funkcionalnih spojin ali redoks mehanizmi pretvorijo antibiotik v neaktiven derivat (9). Primeri encimov so β -laktamaze, kloramfenikol aciltransferaze in aminoglikozid-modificirajoči encimi (AAC, ANT, APH) (2).

2. Preprečen dostop učinkovine do tarče.

Odporne G- bakterije lahko zmanjšajo ekspresijo proteinskih kanalčkov v zunanji membrani (porinov) bakterije ali spremenijo njihovo strukturo. Posledica tega je znatno zmanjšana permeabilnost membrane in tako antibiotik ne more vstopiti v bakterijsko celico (7). G+ in G- organizmi lahko povečajo sintezo membranskih proteinov, ki delujejo kot efluks črpalke. Efluks črpalke aktivno izločajo učinkovino iz celice in s tem vzdržujejo nizke intracelularne koncentracije antibiotika, ki pa so prenizke za protibakterijski učinek (3).

3. Sprememba aktivnega mesta ključnih bakterijskih encimov.

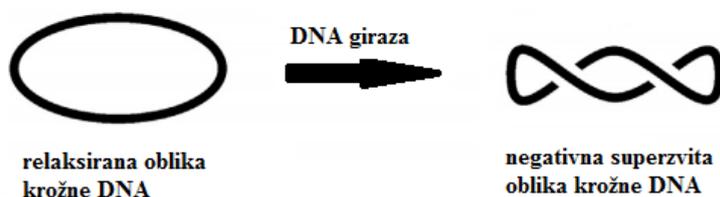
Majhne strukturne spremembe v aktivnem mestu zmanjšajo občutljivost na antibiotik brez vpliva na funkcijo bakterijske celice (11). Do teh sprememb lahko pride z mutacijami ali s post-transkripcijskimi in post-translacijskimi modifikacijami. Rezultat je zmanjšana afiniteta vezave antibiotika v aktivno mesto. Če je tarča antibiotika presnovna pot, se ta izvaja po alternativni poti. (12).

S pojavom novih učinkovin bodo bakterije še naprej razvijale protimikrobno odpornost. Zato je potreben konstanten razvoj novih antibiotikov z novimi mehanizmi delovanja ter iskanje novih potencialnih tarč.

1.3 DNA GIRAZA

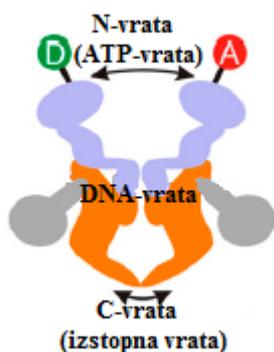
Nosilec genov v bakteriji je en sam kromosom krožne dvovijačne DNA z negativno superzvito strukturo (4).

DNA topoizomeraze so skupina proteinov, ki jih najdemo v prokariotskih in evkariontskih celicah ter v nekaterih virusih. Topoizomeraze so encimi, ki sodelujejo pri replikaciji in transkripciji DNA, saj katalizirajo pretvorbo molekule DNA iz ene topološke oblike v drugo, pri čemer pride do sprememb v terciarni strukturi DNA. Topoizomeraze delimo na tip I in tip II. Encimi tipa I cepijo eno verigo dvovijačne DNA in tako razvijejo superzvito DNA v energetsko ugodnejšo relaksirano obliko. Encimi tipa II cepijo obe verigi dvovijačnice in tvorijo negativni supernavoj DNA (13, 14). V bakterijah najdemo dva različna tipa topoizomeraz IIA, in sicer encim DNA girazo ter topoizomerazo IV. DNA giraza katalizira proces zavijanja krožne dvovijačne DNA v negativno superzvito obliko v prisotnosti ATP (Slika 1).



Slika 1: Pretvorba relaksirane oblike krožne DNA v negativno superzvito.

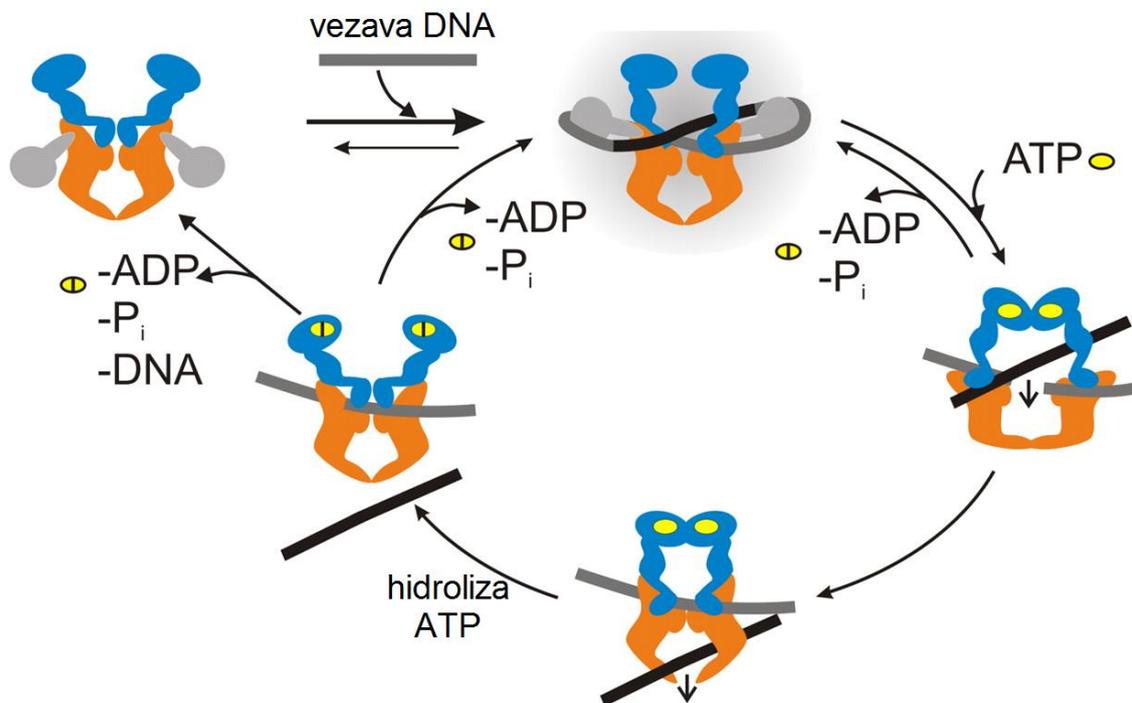
DNA giraza ima strukturo tetramera, ki je sestavljen iz dveh GyrA in dveh GyrB podenot, katere skupaj tvorijo A_2B_2 kompleks v aktivnem encimu (Slika 2) (15). Primarna naloga podenote A je cepitev in ponovna združitev DNA verig, podenota B pa nosi ATP-azno aktivnost. Obe podenoti sta potrebni za nemoteno delovanje encima (13).



Slika 2: Struktura DNA giraze, kjer oranžna barva predstavlja N-terminalno domeno GyrA, modra N-terminalno domeno GyrB in siva C-terminalno domeno GyrA. Povzeto po (16).

Slika 3 prikazuje katalitični cikel DNA giraze (16). DNA giraza veže G-segment DNA molekule, poteče cepitev obeh verig DNA in zavijanje le-te okrog C-terminalne domene GyrA. To vodi v konformacijsko spremembo N-terminalnih domen GyrB. Sledi vezava ATP molekule (rumene barve) v ATP vezavno mesto GyrB, kar povzroči, da se domeni N GyrB združita. DNA domeni se nato ločita in T segment (črne barve) DNA molekule

izstopi skozi C-vrata. Hidroliza ATP molekule povzroči ponovno ločitev N-domen GyrB in DNA se sprostí. Če ostane G-segment DNA molekule vezan v girazi poteče nov katalitični cikel.



Slika 3: Katalitični cikel DNA giraze. Povzeto po (16).

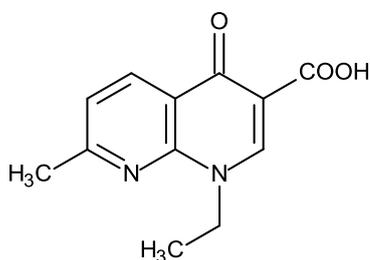
1.4 ZAVIRALCI DNA GIRAZE

DNA giraza še vedno predstavlja zanimivo tarčo pri načrtovanju novih protibakterijskih učinkovin, med drugim tudi zato, ker encima ne zasledimo v evkariontskih celicah. Funkcijo DNA giraze zavirajo številne protimikrobne spojine - kinoloni zavirajo GyrA, kumarini in ciklotialidini pa GyrB.

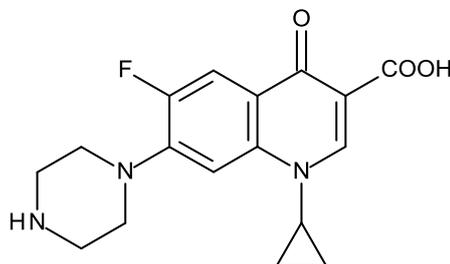
Zaviralci DNA giraze A

(Fluoro)kinoloni predstavljajo edino skupino zaviralcev DNA giraze, ki se trenutno uporabljajo v klinični praksi (17). Gre za popolnoma sintezne spojine z značilnim 4-okso-1,4-dihidrokinonskim delom. Prva sintetizirana spojina iz skupine kinolonov je bila nalidiksna kislina, ki jo uvrščamo med učinkovine prve generacije kinolonov, kateri so učinkoviti le proti G- bakterijam. Zaradi hitrega razvoja rezistence se je terapevtska uporaba nalidiksne kisline opustila. Z nadaljnimi spremembami v kemijski strukturi kinolonov so izboljšali učinkovitost tako proti G- kot tudi proti G+ bakterijam in atipičnim

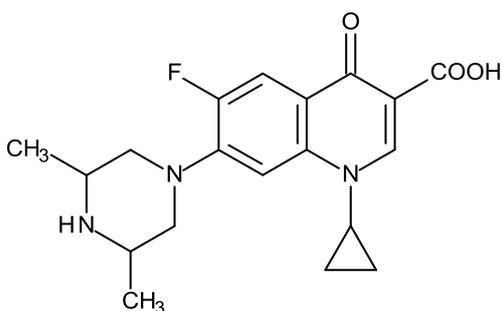
bakterijam, zmanjšali toksičnost za evkarionte, olajšali penetracijo v bakterijsko celico in izboljšali farmakokinetiko. Slika 4 prikazuje predstavnike kinolonov prve do četrte generacije (5, 13, 15).



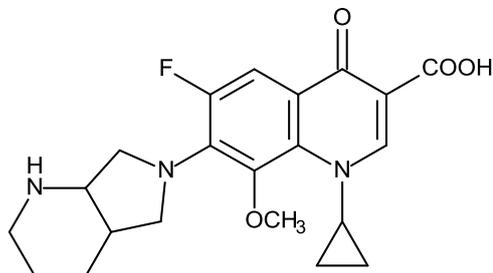
NALIDIKSNA KISLINA - 1. generacija kinolonov



CIPROFLOKSACIN - 2. generacija kinolonov



SPAROFLOKSACIN - 3. generacija kinolonov



MOKSIFLOKSACIN - 4. generacija kinolonov

Slika 4: Na sliki so prikazani štiri predstavniki od prve do četrte generacije kinolonov – nalidiksna kislina, ciprofloksacin, sparofloksacin in moksifloksacin.

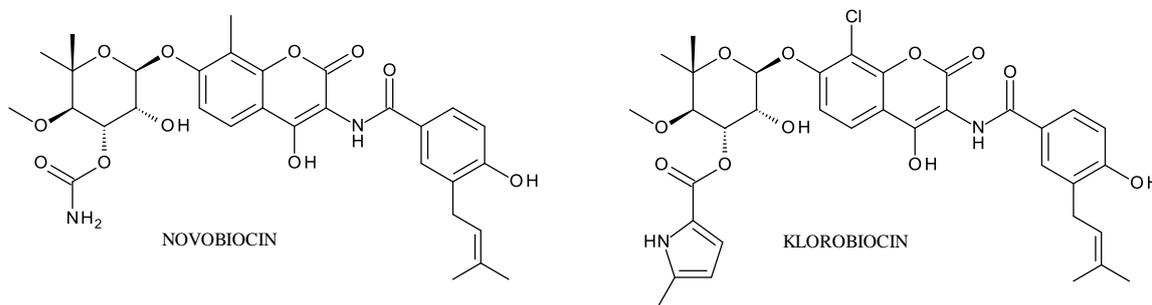
Fluorokinoloni so baktericidne učinkovine, ki zavirajo encima DNA girazo in topoizomerozo IV. Primarna tarča kinolonov v G- bakterijah je podenota A DNA giraze, v G+ bakterijah pa topoizomeroza IV. Fluorokinoloni delujejo tako, da stabilizirajo kompleks med molekulo DNA in aktivnim mestom GyrA in tako onemogočijo uvedbo dodatnih negativnih navojev v krožno dvovijačno DNA.

Rezistenca na fluorokinolone se največkrat izrazi s kromosomskimi mutacijami tarčnega encima. Do mutacij pride v QRD regiji (angl. quinolone resistance-determining region) gena *gyrA* podenote A, ki se nahaja ob aktivnem mestu encima. Ob tem se aminokislinske OH skupine v QRD regiji zamenjajo s hidrofobnimi preostanki, kar vodi do zmanjšane afinitete vezave. Poleg tega lahko G- bakterije razvijejo rezistenco na kinolone tudi z zmanjšano permeabilnostjo zunanje celične membrane (2).

Zaviralci DNA giraze B

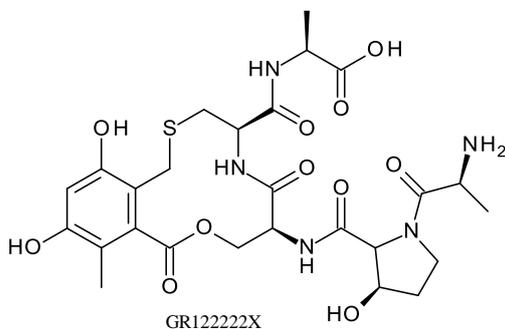
GyrB mutacije so manj običajne in povzročajo nižje stopnje odpornosti od GyrA mutacij (18). ATP vezavno mesto na podenoti B DNA giraze zato predstavlja idealno tarčo pri načrtovanju novih zaviralcev giraze.

Prve protimikrobne učinkovine naravnega izvora z delovanjem na podenoto B so bili kumarini iz bakterijskega rodu *Streptomyces*. Novobiocin je bil odkrit prvi, sledila sta mu kumermicin A in klorobiocin. Zaradi nizke učinkovitosti proti G- bakterijam, toksičnih učinkov na evkariontski sistem in pojava rezistence se kumarini niso uveljavili v klinični praksi. Slika 5 prikazuje kemijski strukturi novobiocina in klorobiocina (13).



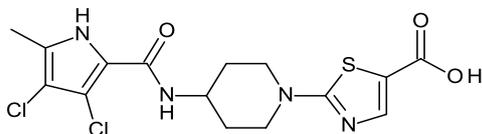
Slika 5: Kemijski strukturi novobiocina in klorobiocina.

Druga skupina naravnih antibiotikov, ki ravno tako delujejo kot kompetitivni zaviralci vezave ATP in superzvitja DNA, so ciklotialidini. Slika 6 prikazuje kemijsko strukturo ciklotialidina GR122222X. Kljub visoki *in vitro* učinkovitosti in zmanjšanim vplivom na evkariontske celice v primerjavi s kumarini, zaradi visoke lipofilnosti ne izkazujejo protimikrobne aktivnosti *in vivo*. Poznavanje podatkov o strukturi ciklotialidinov je pomagalo pri odkrivanju novih zaviralcev GyrB z močnejšim protimikrobnim delovanjem (19).



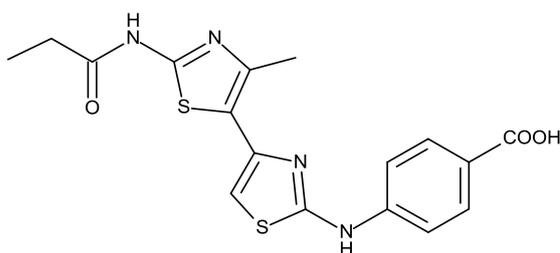
Slika 6: Kemijska struktura ciklotialidina GR122222X.

Novejši pirolamidni zaviralci giraze B so se izkazali učinkoviti tako proti G⁺ kot tudi proti G⁻ bakterijam. Slika 7 prikazuje strukturo enega izmed pirolamidnih zaviralcev (15).



Slika 7: Kemijska struktura zaviralca GyrB s pirolamidnim obročem.

Zaviralci DNA giraze B se običajno vežejo v adeninski žep ATP vezavnega mesta, kjer tvorijo dve vodikovi vezi z Asp73. Prva vodikova vez nastane neposredno med donorjem vodikove vezi (npr. NH skupina pirola) in karboksilno skupino Asp73, medtem ko se druga vodikova vez z Asp73 tvori posredno med akceptorjem vodikove vezi (npr. C=O) in molekulo vode, ki je povezana naprej preko vodikove vezi z Asp73. Še ena vodikova vez se običajno tvori med učinkovino in Arg136, ki pa ni del adeninskega žepa (15). Upoštevanje te značilnosti so Brvar in sodelavci z virtualnim rešetanjem odkrili 4,5'-bitiazolni inhibitor giraze B. Spojina je izkazovala visoko zaviralno aktivnost na DNA girazo B ($IC_{50} = 1,1 \pm 0,2 \mu\text{mol}$) (17). 4,5'-bitiazolni derivat, katerega strukturo prikazuje slika 8, smo v magistrski nalogi uporabili kot izhodišče pri načrtovanju in sintezi potencialnih zaviralcev giraze B.



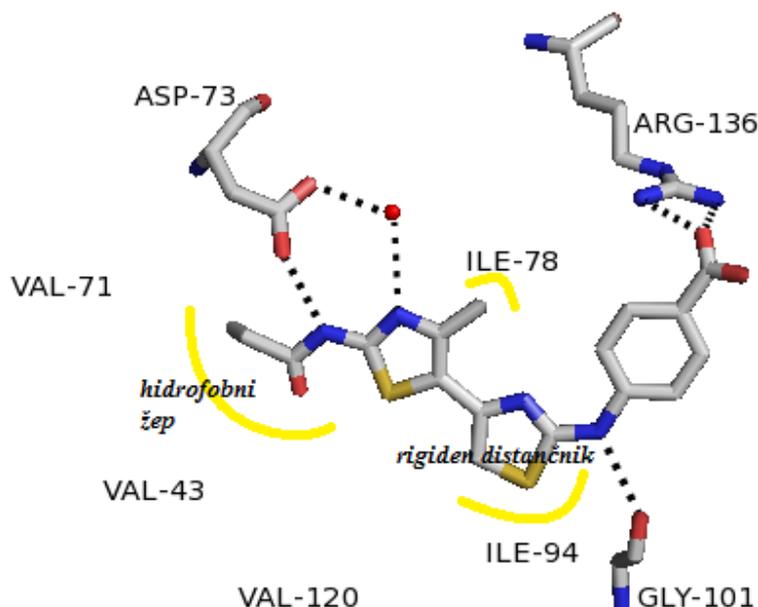
Slika 8: Kemijska struktura 4-[(4'-metil-2'-(propanoilamino)-4,5'-bi-1,3-tiazol-2-il)amino]benzojske kisline.

2 NAČRT DELA

V okviru magistrske naloge želimo sintetizirati potencialne zaviralce podenote B encima DNA giraza, na kateri je vezavno mesto za ATP. Pri načrtovanju bomo uporabili dosegljive podatke o kristalni strukturi kompleksa *N*-terminalnega dela GyrB iz *E. coli* z maso 24 kDa z ligandom 4-[(4'-metil-2'-(propanoilamino)-4,5'-bi-1,3-tiazol-2-il)amino]benzojsko kislino (podatki so dostopni v RCSB Protein Data Bank pod šifro 4DUH).

Za zaviralno delovanje izhodiščne spojine na encim GyrB je pomembno naslednje (Slika 9):

- akceptor-donor interakcija: donor vodikove vezi, ki tvori interakcije z Asp73 ter akceptor H-vezi, ki se preko molekule vode veže z Asp73,
- zapolnitev hidrofobnega žepa – hidrofobne interakcije z Val43, Val71 in Val120,
- rigidni distančnik med dvema obročema, ki tvori hidrofobne interakcije s hidrofobnimi aminokislinskimi ostanki proteina,
- H-vez z Arg136 pripomore k močnejšemu zaviralnemu delovanju,
- za močnejšo vezavo v aktivno mesto je zaželjena dodatna H-vez z Gly101 (19).



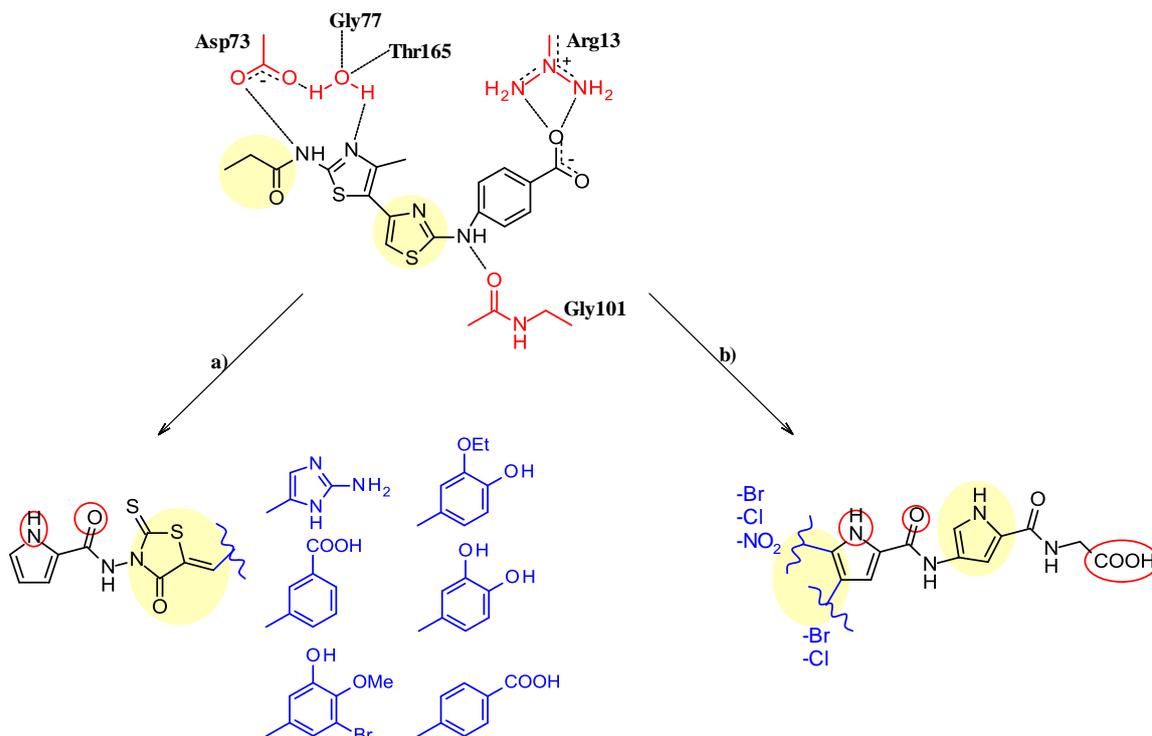
Slika 9: Interakcije izhodiščne spojine s tarčo. Prirejeno po (19).

Pri načrtovanju novih zaviralcev GyrB bomo 2-aminotiazolni del izhodiščne spojine zamenjali s pirolamidnim in tako skušali ohraniti vodikovi vezi NH skupine pirola, ki bo

delovala kot proton donor, in kisika amidne vezi v vlogi proton akceptorja. Pripravili bomo spojine z dvema različnima ogrodjema. Slika 10 prikazuje načrtovane strukturne spremembe izhodiščne spojine.

- V prvi sintezni veji bomo tiazolni distančnik zamenjali s 3-amino-2-tioksotiazolidin-4-onom, ki bo tvoril hidrofobne interakcije z ATP vezavnim mestom. Fenilni obroč bomo ohranili in uvedli substituentne (Br, COOH, OEt, OH, OMe) na mestih 3, 4 in 5. Samo v enem primeru bomo substituiran fenilni obroč nadomestili z 2-aminoimidazolom. Z uvedbo substitucij na (hetero)aromatih, bomo skušali ohraniti interakcijo z Arg136.
- V drugi sintezni veji bomo tiazolni obroč nadomestili z 1H-pirol-3-aminom in tako ohranili distančnik, ki bo tvoril hidrofobne interakcije s tarčo. Na mesto 2' pirola bomo z amidno vezjo pripojili molekulo glicina, katerega COOH naj bi delovala kot akceptor H-vezi z Arg136. Z različnimi funkcionalnimi skupinami na mestu 4 in 5 pirola bomo zapolnili hidrofobni žep tarče.

Pripravljenim končnim spojinam bomo določili zaviralno aktivnost na DNA girazo B.



Slika 10: Spremembe izhodiščne spojine po dveh sinteznih poteh.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Pri sinteznem delu smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev *Acros Organics*, *Fluka*, *Merck*, *Sigma-Aldrich*.

3.2 METODE

3.2.1 KROMATOGRFSKE METODE

- **Tankoplastna kromatografija (TLC)**

Za TLC smo uporabljali ploščice *Kieselgel 60 F254* proizvajalca *Merck* z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijskem nosilcu z dodanim fluorescentnim indikatorjem. Kromatograme smo razvijali v različnih mobilnih fazah, ki so navedene pri vsaki spojini posebej. Za detekcijo spojin smo uporabljali UV svetilko, z valovnima dolžinama 254 nm in 366 nm ter različne orositvene reagente (ninhidrin, FeCl₃, bromkrezolno modro, 2,4-dinitrofenilhidrazin).

- **Kolonska kromatografija**

Pri nekaterih sintezah smo za ločevanje oziroma čiščenje spojin uporabljali kolonsko kromatografijo. Stacionarna faza je bil silikagel 60 s premerom delcev 0,040 – 0,063 nm proizvajalca *Merck*. Mobilne faze so se razlikovale in so navedene pri vsaki spojini posebej.

- **Reverznofazna tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)**

Analize smo izvedli na sistemu *Agilent Technologies 1100* z *G1365B UV-VIS* detektorjem (220 nm in 254 nm). Pri prvih štirih metodah smo uporabili 5 µm kolono *Agilent Eclipse Plus C18* (150 x 4,6 mm), ki je bila termostatorirana na 25 °C. Pri metodi 5 smo uporabili 5 µm kolono *Phenomenex Luna* (250 × 4,6 mm). Uporabili smo naslednje metode:

- Metoda 1: MF je bila sestavljena iz 0,1% raztopine TFA v bidestilirani vodi (A) in acetonitrila (B).

Gradient: 0-15 min: 30 % B v A → 95 % B v A; 15-17,5 min: 95 % B v A; 17,5-18 min: 95 % B v A → 30 % B v A; 18-23 min: 30 % B v A, Pretok MF 1,0 ml/min, volumen injiciranja 5 µl.

- Metoda 2: MF je bila sestavljena iz 0,1% raztopine TFA v bidestilirani vodi (A) in acetonitrila (B).

Gradient: 0-15 min: 10 % B v A → 90 % B v A; 15-17,5 min: 90 % B v A; 17,5-23,5 min (17,5-24,5 min pri spojini **9**): 90 % B v A → 10 % B v A. Pretok MF 1,0 ml/min, volumen injiciranja 5 µl (10 µl pri spojini **9**).

- **Metoda 3:** MF je bila sestavljena iz 0,1 % raztopine TFA v bidestilirani vodi (A) in metanola (C).

Gradient: 0-15 min: 30 % C v A → 95 % C v A; 15-17,5 min: 95 % C v A; 17,5-18 min: 95 % C v A → 30 % C v A; 18-23 min: 30 % C v A. Pretok MF 1,0 ml/min, volumen injiciranja 5 µl.

- **Metoda 4:** MF je bila sestavljena iz 0,1 % raztopine TFA v bidestilirani vodi (A) in metanola (C).

Gradient: 0-15 min: 20 % C v A → 95 % C v A; 15-17,5 min: 95 % C v A; 17,5-18 min: 95 % C v A → 20 % C v A; 18-23 min: 20 % C v A. Pretok MF 1,0 ml/min, volumen injiciranja 5 µl.

- **Metoda 5:** MF je bila sestavljena iz bidestilirane vode (D) in acetonitrila (B).

Gradient: 0-15 min: 20 % B v D → 90 % B v D; 15-17,5 min: 90 % B v D; 17,5-18 min: 90 % B v D → 20 % B v D; 18-24 min: 20 % B v D. Pretok MF 0,5 ml/min, volumen injiciranja 5 µl.

3.2.2 SPEKTROSKOPSKE METODE

▪ Jedrska magnetna resonanca (NMR)

¹H NMR in ¹³C NMR spektri so bili posneti s spektrometrom *Bruker Avance III 400 MHz* na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Za topila smo uporabljali dimetil sulfoksid-d₆, kloroform-d in metanol-d₄ ter tetrametilsilan kot interni standard. Za obdelavo dobljenih spektrov smo uporabili program *NMRnotebook 2.70 (NMRTEC S.A.S.)*.

▪ Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektre smo posneli s spektrometrom *Nexus FT-IR* z nastavkom za snemanje z ATR tehniko (*Nicolet Smart DuraSampl IR™*) na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Spektre smo obdelali s programom *Omic E.S.P. 5.2*.

▪ Masna spektrometrija (MS)

Masni in HRMS spektri so bili posneti na masnem spektrometru *VG-Analytical AutoSpec Q* z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani.

3.2.3 DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA

Temperaturo tališča smo določali na mikroskopu z ogrevalno mizico *Leica Microsystems* na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Tališča so nekorrigirana.

3.2.4 ELEMENTNA ANALIZA

Elementne analize spojin za elemente C, H in N so izmerili na analizatorju *Perkin-Elmer 2400 CHN* na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

3.2.5 BIOLOŠKO TESTIRANJE SPOJIN

In vitro testiranje spojin na girazno aktivnost je potekalo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani s testnim sistemom podjetja *Inspiralis* (20).

3.2.6 MOLEKULSKO MODELIRANJE

Molekulsko sidranje v aktivno mesto giraze B je izvedel asist. dr. Rok Frlan, mag. farm. s programskim paketom *OpenEye Scientific Software*. Za vizualizacijo spojin v aktivnem mestu smo uporabili program *PyMOL (DeLano Scientific LCC)*.

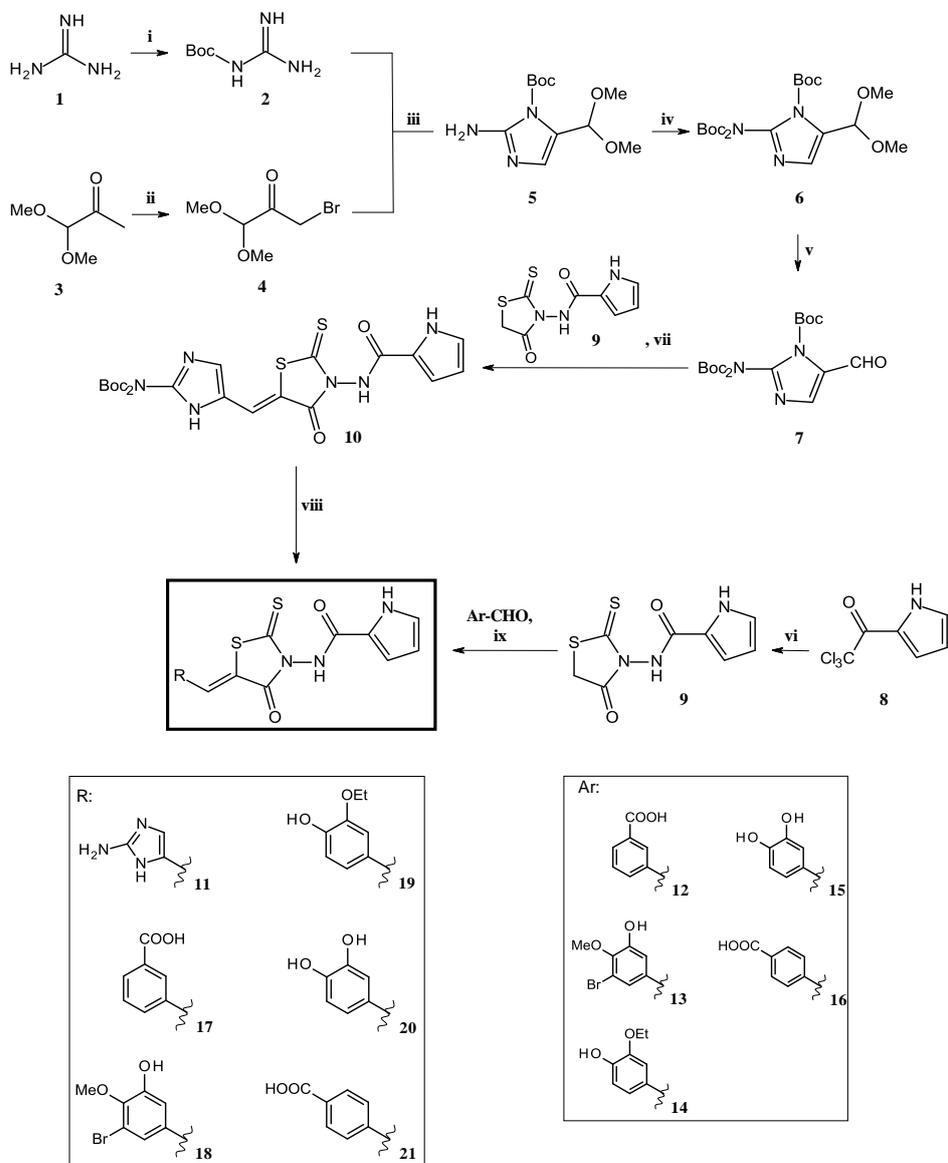
3.2.7 POIMENOVANJE IN RISANJE SPOJIN

Strukturne formule spojin smo poimenovali (po IUPAC-u) ter narisali s pomočjo programa *Accelrys Draw 4.1 SP1 (Accelrys, Inc.)*.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 REAKCIJSKE SCHEME

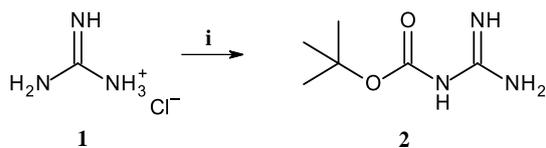
Prva sintezna pot:



Reagenti in reakcijski pogoji:

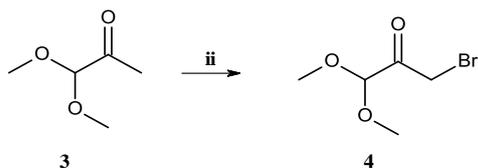
- (i) 1 ekv. Boc_2O , dioksan, 6M NaOH v H_2O , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{r.t.}$, 24 h; (ii) 2 ekv. Br_2 , CCl_4 , $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{r.t.}$, 3 h; (iii) THF, reflux, 24 h; (iv) 3 ekv. Boc_2O , DMAP, THF, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{r.t.}$, 24 h; (v) 1 ekv. I_2 , brezvodni aceton, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{r.t.}$, 4 h; (vi) 1.) 5 ekv. SOCl_2 , DMF, toluen, $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{r.t.}$, 30 min $\rightarrow 70\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h; 2.) 1 ekv. *N*-aminorodanina, THF, reflux, 4 h $\rightarrow 60\text{ }^\circ\text{C}$, 48 h; (vii) NaOAc, CH_3COOH , EtOH, r.t., 24 h $\rightarrow -10\text{ }^\circ\text{C}$, 3 dni; (viii) CF_3COOH , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 2 h; (ix) 1 ekv. piperidina, EtOH, r.t., 24 h.

4.1.1 SHEMA 1: SINTEZA BOC-GVANIDINA (2)



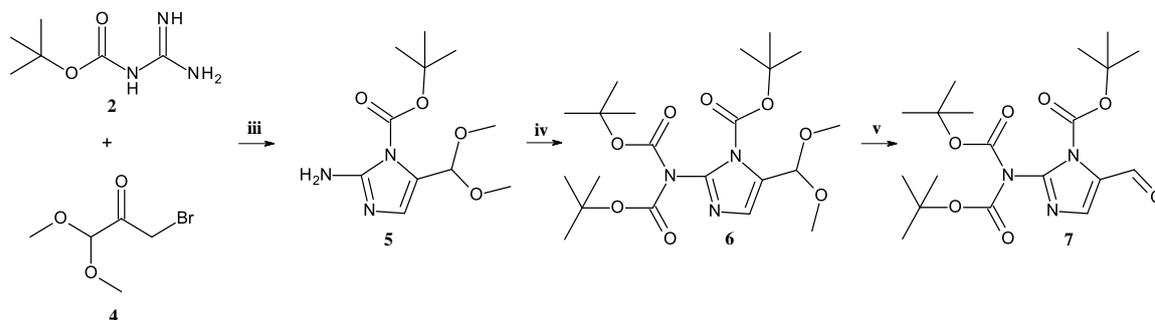
Reagenti in reakcijski pogoji: (i) 1 ekv. Boc₂O, dioksan, 6M NaOH v H₂O, 0 °C → r.t., 24 h.

4.1.2 SHEMA 2: SINTEZA 3-BROMO-1,1-DIMETOKSIPROPAN-2-ONA (4)



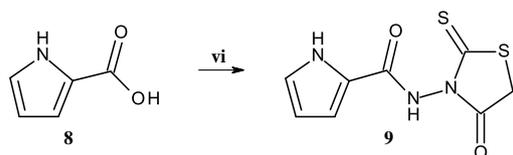
Reagenti in reakcijski pogoji: (ii) 2 ekv. Br₂, CCl₄, 0 °C → r.t., 3 h.

4.1.3 SHEMA 3: SINTEZA *tert*-BUTIL-2-[BIS(*tert*-BUTOKSIKARBONIL)AMINO]-5-FORMIL-IMIDAZOL-1-KARBOKSILATA (7)



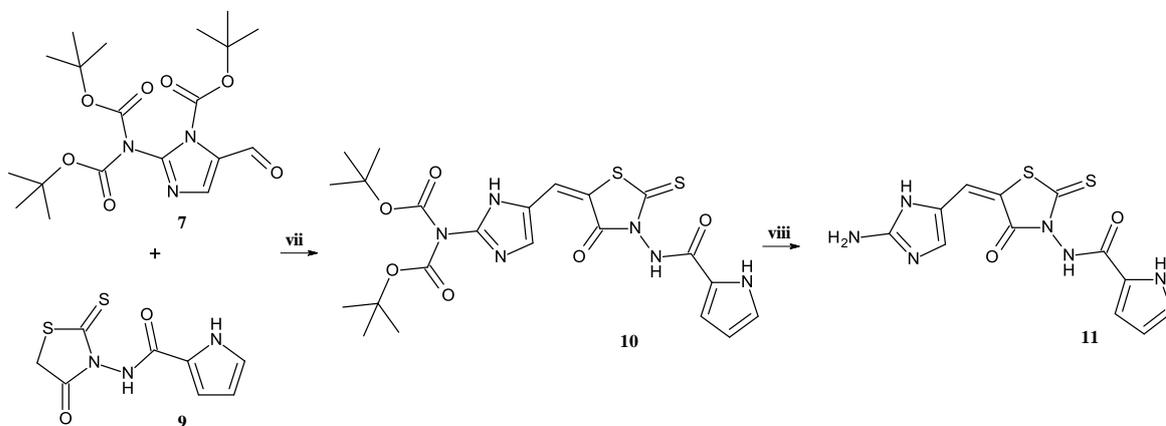
Reagenti in reakcijski pogoji: (iii) THF, refluks, 24 h; (iv) 3 ekv. Boc₂O, DMAP, THF, 0 °C → r.t., 24 h; (v) 1 ekv. I₂, brezvodni aceton, 0 °C → r.t., 4 h.

4.1.4 SHEMA 4: SINTEZA *N*-(4-OKSO-2-TIOKSO-TIAZOLIDIN-3-IL)-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDA (9)



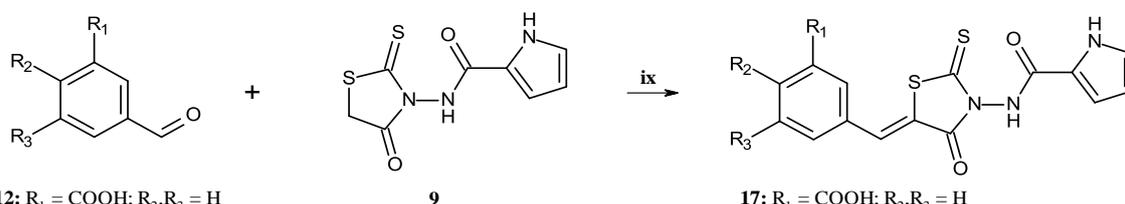
Reagenti in reakcijski pogoji: (vi) 1.) 5 ekv. SOCl₂, DMF, toluen, 0 °C → r.t., 30 min → 70 °C, 1 h; 2.) 1 ekv. *N*-aminorodanina, THF, refluks, 4 h → 60 °C, 48 h.

4.1.5 SHEMA 5: SINTEZA *N*-[(5*E*)-5-[(2-AMINO-1*H*-IMIDAZOL-5-IL)METILEN]-4-OKSO-2-TIOKSO-TIAZOLIDIN-3-IL]-1*H*-PIROL-2-KARBOKSAMIDA (**11**)



Reagenti in reakcijski pogoji: (vii) NaOAc, CH₃COOH, EtOH, r.t., 24 h → -10 °C, 3 dni;
(viii) CF₃COOH, 0 °C, 2 h.

4.1.6 SHEMA 6: SINTEZA BENZILNIH DERIVATOV *N*-(4-OKSO-2-TIOKSO-TIAZOLIDIN-3-IL)-1*H*-PIROL-2-KARBOKSAMIDA (**17**, **18**, **19**, **20**, **21**)



12: R₁ = COOH; R₂, R₃ = H

13: R₁ = OH; R₂ = CH₃O; R₃ = Br

14: R₁ = CH₃CH₂O; R₂ = OH; R₃ = H

15: R₁, R₂ = OH; R₃ = H

16: R₁, R₃ = H; R₂ = COOH

17: R₁ = COOH; R₂, R₃ = H

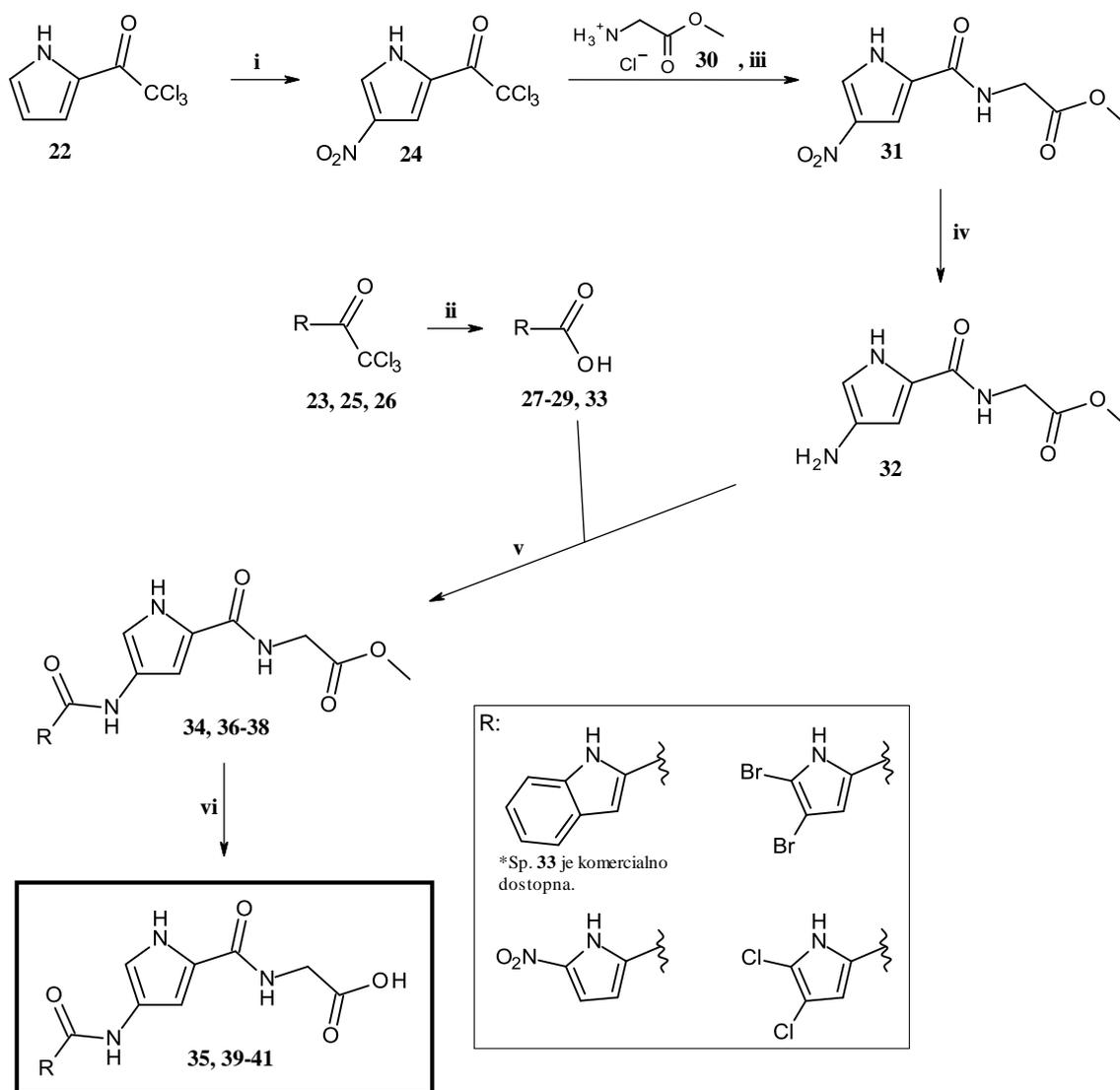
18: R₁ = OH; R₂ = CH₃O; R₃ = Br

19: R₁ = CH₃CH₂O; R₂ = OH; R₃ = H

20: R₁, R₂ = OH; R₃ = H

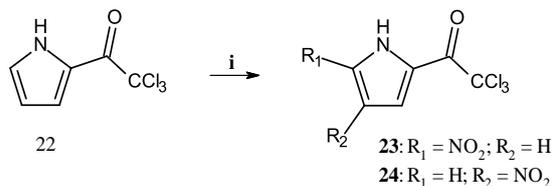
21: R₁, R₃ = H; R₂ = COOH

Reagenti in reakcijski pogoji: (ix) 1 ekv. piperidina, EtOH, r.t., 24 h.

Druga sintezna pot:**Reagenti in reakcijski pogoji:**

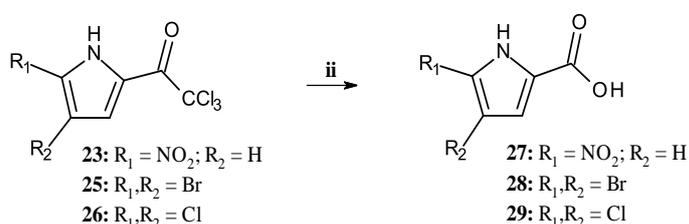
(i) 2,8 ekv. HNO₃, Ac₂O, -20 °C → r.t., 24 h; (ii) 5 ekv. 2M NaOH, THF:H₂O = 2:1, r.t., 24 h; (iii) MeCN, 2,25 ekv. NMM, r.t., 3 dni; (iv) H₂, Pd/C, MeOH, r.t., 1,5 h; (v) 6 ekv. NMM, 1 ekv. HOBt, DMF, 1,3 ekv. EDC, 0 °C → r.t., 3 dni (za sp. **34**); 5 ekv. NMM, 2 ekv. HOBt, DMF, 2,2 ekv. EDC, 1 ekv. DMAP, 0 °C → r.t., 2 dni (za sp. **36** in **38**); 1 ekv. NMM, CH₂Cl₂, 1 ekv. TBTU, 0 °C → r.t., 24 h (za sp. **37**) (vi) 4 ekv. 1M LiOH, THF:H₂O = 2:1, r.t. 2 h (za sp. **35**); 4 ekv. 1M LiOH, THF:H₂O = 2:1, r.t., 2 h (za sp. **39**), 24 h (za sp. **41**); 5 ekv. NMM, 1 ekv. HOBt, DMF, 1,1 ekv. EDC, 0 °C → r.t., 3 dni (za sp. **40**).

4.1.7 SHEMA 7: SINTEZA NITRO DERIVATOV 2,2,2-TRIKLORO-1-(1H-PIROL-2-IL)ETANONA (23, 24)



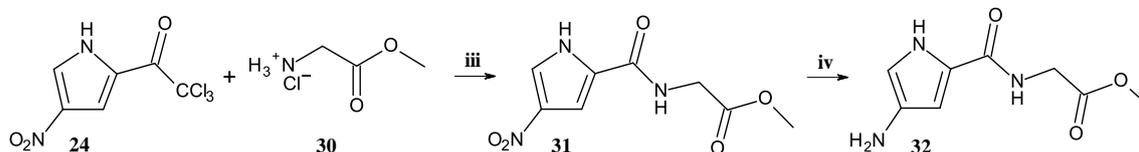
Reagenti in reakcijski pogoji: (i) 2,8 ekv. HNO₃, Ac₂O, -20 °C → r.t., 24 h.

4.1.8 SHEMA 8: SINTEZA DERIVATOV 1H-PIROL-2-KARBOKSILNE KISLINE (27, 28, 29)



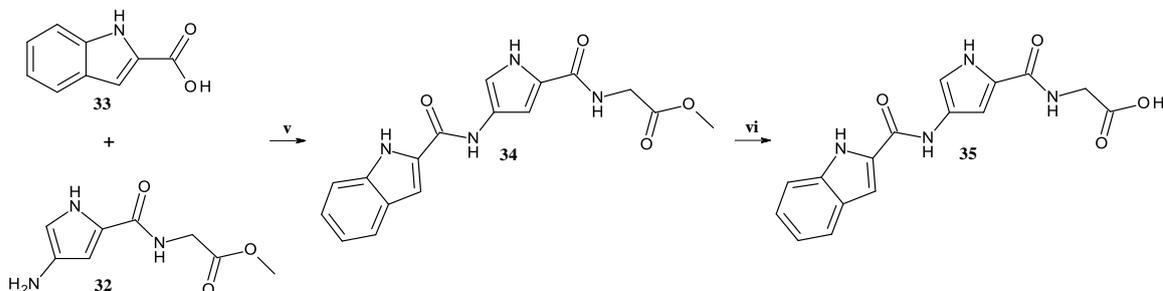
Reagenti in reakcijski pogoji: (ii) 5 ekv. 2M NaOH, THF:H₂O = 2:1, r.t., 24 h.

4.1.9 SHEMA 9: SINTEZA METIL (4-AMINO-1H-PIROL-2-KARBONIL)GLICINATA (32)



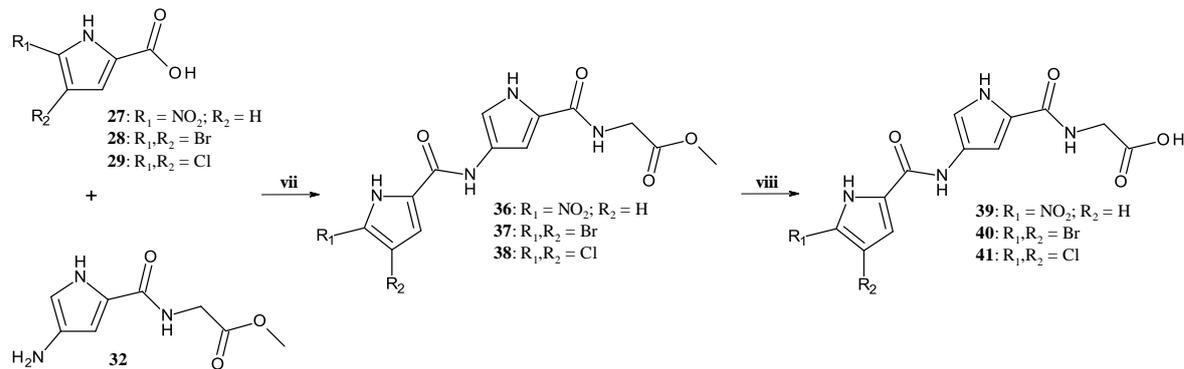
Reagenti in reakcijski pogoji: (iii) MeCN, 2,25 ekv. NMM, r.t., 3 dni; (iv) H₂, Pd/C, MeOH, r.t., 1,5 h.

4.1.10 SHEMA 10: SINTEZA (4-(1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)-1H-PIROL-2-KARBONIL)GLICINA (35)



Reagenti in reakcijski pogoji: (v) 6 ekv. NMM, 1 ekv. HOBt, DMF, 1,3 ekv. EDC, 0 °C → r.t., 3 dni; (vi) 4 ekv. 1M LiOH, THF:H₂O = 2:1, r.t. 2 h.

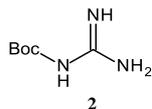
4.1.11 SHEMA 11: SINTEZA DERIVATOV (4-(1*H*-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)-1*H*-PIROL-2-KARBONIL)GLICINA (**39**, **40**, **41**)



Reagenti in reakcijski pogoji: **(vii)** 5 ekv. NMM, 2 ekv. HOBt, DMF, 2,2 ekv. EDC, 1 ekv. DMAP, 0 °C → r.t., 2 dni (za sp. **36** in **38**); 1 ekv. NMM, CH₂Cl₂, 1 ekv. TBTU, 0 °C → r.t., 24 h (za sp. **37**); **(viii)** 4 ekv. 1M LiOH, THF:H₂O = 2:1, r.t., 2 h (za sp. **39**), 24 h (za sp. **41**); 5 ekv. NMM, 1 ekv. HOBt, DMF, 1,1 ekv. EDC, 0 °C → r.t., 3 dni (za sp. **40**).

4.2 SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ

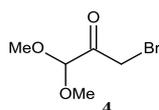
4.2.1 Boc-GVANIDIN (**2**)



26,3 g (275 mmol, 5 ekv.) gvanidinijevega klorida smo raztopili v zmesi 12,1 g (303 mmol, 5,5 ekv.) NaOH in 50 ml vode ter ohladili na 0 °C (ledena kopel). V tako pripravljeno raztopino smo po kapljicah med mešanjem dodali raztopino 12,0 g (55,0 mmol, 1 ekv.) Boc₂O v 100 ml dioksana in pustili mešati pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo pod znižanim tlakom (v nadaljevanju uparili) uparili dioksan in ekstrahirali s 4 × 100 ml EtOAc. Združene organske faze smo sprali z 20 ml nasičene vodne raztopine NaCl ter sušili nad brezvodnim Na₂SO₄. Po filtraciji smo uparili topilo in dobili 8 g spojine **2**.

Izgled	beli kristali
Izkoristek	91 %
Mr	159,19
TLC	R _f = 0,19; MF: DKM/MeOH = 5/1 + 1 % Et ₃ N
T_T	165 °C [lit. (21)]
¹H-NMR (300 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 1,34 (s, 9H, Boc), 6,82 (br. s, 4H, NH ₂) (21)

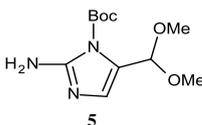
4.2.2 3-BROMO-1,1-DIMETOKSIPROPAN-2-ON (4)



20,0 ml (0,165 mol, 1 ekv.) 1,1-dimetoksiopropan-2-ona smo raztopili v 300,0 ml CCl_4 in prepihali z argonom. Raztopino smo ohladili na $0\text{ }^\circ\text{C}$ ter ji po kapljicah dodali 8,72 ml (0,339 mol, 2 ekv.) Br_2 . Reakcijsko zmes smo pustili mešati pri sobni temperaturi 3 ure. Nato smo dodali 17,8 g (0,212 mol, 1,3 ekv.) NaHCO_3 ter sprali z 200 ml DKM. Dodali smo še 200 ml vode, fazi ločili in organsko fazo sprali z 200 ml nasičene vodne raztopine NaCl ter sušili z brezvodnim Na_2SO_4 . Sušilno sredstvo smo odfiltrirali in uparili topilo. Nato smo izvedli vakuumsko destilacijo in dobili 14,5 g spojine **4**.

Izgled	svetlorumeno olje
Izkoristek	45 %
Mr	197,03
TLC	$R_f = 0,33$; MF: Hex/EtOAc = 3/1
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	δ [ppm]: 3,45 (s, 6H, $2 \times \text{CH}_3\text{O}$), 3,45 (s, 2H, CH_2), 4,73 (s, 1H, CH) (22)

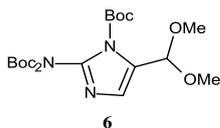
4.2.3 *tert*-BUTIL 2-AMINO-5-(DIMETOKSIMETIL)IMIDAZOL-1-KARBOKSILAT (5)



478 mg (3,00 mmol, 3 ekv.) spojine **2** in 197 mg (1,00 mmol, 1 ekv.) spojine **4** smo raztopili v 2 ml THF ter mešali na oljni kopeli pri temperaturi refluksa ($80\text{ }^\circ\text{C}$) 24 ur. THF smo uparili in produkt očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo kot MF uporabili raztopino 0,3 % Et_3N v EtOAc.

Izgled	oranžnorjava oborina
Izkoristek	40 %
Mr	257,29
TLC	R _f = 0,15; MF: EtOAc + 0,3 % Et ₃ N
T_r	136-138 °C
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm]: 1,53 (s, 9H, Boc), 3,30 (s, 6H, 2 × CH ₃ O), 5,22 (s, 1H, CH), 6,02 (s, 2H, NH ₂), 6,78 (s, 1H, Ar-H)
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ [ppm]: 28,1; 52,8; 85,2; 99,4; 109,4; 135,6; 149,5; 150,8
MS (ESI) HRMS	m/z (%): 258,1 ([M+H] ⁺ , 100) Izračunano za C ₁₁ H ₂₀ N ₃ O ₄ [M+H] ⁺ (m/z): 258,1454; Izmerjena vrednost: 258,1460
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3240, 3180, 3110, 2980, 2950, 2886, 2828, 1735, 1631, 1452, 1385, 1336, 1274, 1249, 1153, 1112, 1054, 978, 907, 843, 765, 711
HPLC	<i>Metoda 1</i> (glej poglavje Materiali in metode) t _R [min] = 12,892; 99 % pri 254 nm

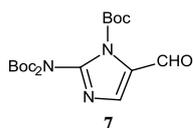
4.2.4 *tert*-BUTIL 2-[BIS(*tert*-BUTOKSIKARBONIL)AMINO]-5-(DIMETOKSIMETIL)IMIDAZOL-1-KARBOKSILAT (6)



Raztopino z 4,77 g (18,5 mmol, 1 ekv.) spojine **5** v 60 ml THF smo ohladili na 0 °C ter dodali 679 mg (5,56 mmol, 0,3 ekv.) DMAP in 12,1 g (55,0 mmol, 3 ekv.) Boc₂O. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 24 ur. Topilo smo uparili in produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF: Hex/EtOAc = 2/1). Dobili smo 5,079 g čiste in 3,46 g nečiste spojine **6**.

Izgled	svetlorumeni kristali
Izkoristek	60 %
Mr	457,52
TLC	R _f = 0,42; MF: EtOAc
T_T	112-116 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm]: 1,34 (s, 18H, 2 × Boc), 1,53 (s, 9H, Boc), 3,20 (s, 6H, CH ₃ O), 5,36 in 5,37 (2 × s, 1H, CH), 7,42 (2 × s, 1H, Ar-H)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm]: 27,2; 27,4; 51,7; 83,2; 86,3; 97,9; 116,8; 136,4; 137,5; 145,9; 148,7
MS (ESI) HRMS	m/z (%): 458,2 ([M+H] ⁺ , 100) Izračunano za C ₂₁ H ₃₆ N ₃ O ₈ [M+H] ⁺ (m/z): 458,2502; Izmerjena vrednost: 458,2491
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3166, 3138, 2977, 2942, 2834, 1745, 1724, 1538, 1456, 1361, 1318, 1249, 1211, 1146, 1109, 1058, 1022, 985, 908, 872, 842, 816, 768
ELEMENTNA ANALIZA	Izračunano za C ₂₁ H ₃₅ N ₃ O ₈ : C 55,13 % H 7,71 % N 9,18 % Izmerjene vrednosti: C 54,67 % H 8,07 % N 9,20 %

4.2.5 *tert*-BUTIL 2-[BIS(*tert*-BUTOKSIKARBONIL)AMINO]-5-FORMIL-IMIDAZOL-1-KARBOKSILAT (7)

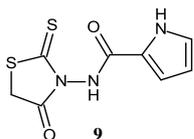


3,628 g (7,930 mmol, 10 ekv.) spojine **6** smo sušili z benzenom in ji dodali 32 ml (4 ml/mmol) brezvodnega acetona, ki smo ga sušili nad brezvodnim Na₂SO₄ in molekularnimi siti, ter ohladili na 0 °C. Dodali smo 201 mg (0,792 mmol, 1 ekv.) I₂ in mešali pri sobni temperaturi 4 ure. Reakcijsko zmes smo nevtralizirali z Na₂S₂O₃ in produkt ekstrahirali v CH₂Cl₂ ter topilo uparili pri 35 °C. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: Hex/EtOAc = 6/1 gradientno do 3/1) in dobili 1,0 g čiste spojine **7**.

Izgled	svetlorumeni kristali
Izkoristek	30 %
Mr	411,45
TLC	R _f = 0,41; MF: Hex/EtOAc = 2/1
T_r	98-100 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm]: 1,37 (s, 18H, 2 × Boc), 1,56 (s, 9H, Boc), 8,52 (s, 1H, Ar-H), 9,77 (s, 1H, CHO)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm]: 27,2; 27,4; 83,9; 87,8; 127,8; 137,7; 139,1; 145,4; 148,6; 184,9
MS (ESI) HRMS	m/z (%): 412,2 ([M+H] ⁺ , 100) Izračunano za C ₁₉ H ₃₀ N ₃ O ₇ [M+H] ⁺ (m/z): 412,2084; Izmerjena vrednost: 412,2076
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3142, 2980, 2935, 1751, 1726, 1688, 1545, 1457, 1399, 1349, 1313, 1277, 1248, 1209, 1146, 1112, 1017, 991, 873, 845, 768, 734
ELEMENTNA ANALIZA	Izračunano za C ₁₉ H ₂₉ N ₃ O ₇ : C 55,46 % H 7,10 % N 10,21 % Izmerjene vrednosti: C 55,53 % H 7,36 % N 10,26 %

4.2.6 N-(4-OKSO-2-TIOKSO-TIAZOLIDIN-3-IL)-1H-PIROL-2-KARBOKSAMID

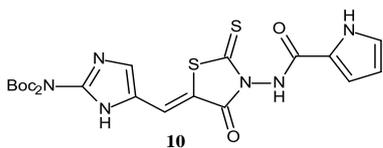
(9)



1,003 g (9,027 mmol, 1 ekv.) pirol-2-karboksilne kisline smo suspendirali v 50 ml brezvodnega toluena in ohladili na 0 °C. Ohlajeni zmesi smo dodali 70,0 µl DMF ter med mešanjem še 3,3 ml (46 mmol, 5 ekv.) SOCl₂. Reakcijsko zmes smo mešali 30 minut pri sobni temperaturi, nato še 1 uro pri 70 °C. Topilo smo uparili do suhega in nastali klorid raztopili v 10 mL brezvodnega THF. Raztopino klorida smo nato po kapljicah dodali k raztopini 1,34 g (9,04 mmol, 1 ekv.) N-aminorodanina v THF ter segrevali pri refluxu. Po 4 urah smo znižali temperaturo na 60 °C in segrevali še 48 ur. Po uparitvi topila smo spojino prekrystalizirali iz zmesi EtOAc in CHCl₃. Oborino smo odfiltrirali z odesavanjem, posušili in dobili 1,394 g čiste spojine 9.

Izgled	svetlooranžni kristali
Izkoristek	64 %
Mr	241,29
TLC	R _f = 0,54; MF: EtOAc
T_r	150-153 °C
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ [ppm]: 4,29 (m, 2H, CH ₂), 6,25 (m, 1H, Ar-H), 6,90 (m, 1H, Ar-H), 6,95 (m, 1H, Ar-H), 9,17 (s, 1H, NH)
MS (ESI) HRMS	m/z (%): 166,0 (100); 240,0 ([M-H] ⁻ , 20) Izračunano za C ₈ H ₆ N ₃ O ₂ S ₂ [M-H] ⁻ (m/z): 239,9901; Izmerjena vrednost: 239,9895
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3327, 3294, 3227, 3147, 2963, 2899, 2362, 1728, 1647, 1530, 1411, 1361, 1240, 1170, 1114, 1078, 1047, 951, 870, 752, 666, 628
HPLC	Metoda 2 (glej poglavje Materiali in metode) t _R [min] = 7,919; 94 % pri 254 nm

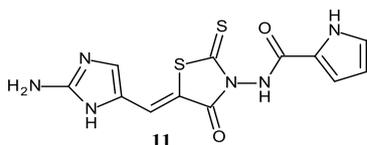
4.2.7 *tert*-BUTIL *N-tert*-BUTOKSIKARBONIL-*N*-[5-[(*E*)-[4-OKSO-3-(1*H*-PIROL-2-KARBONILAMINO)-2-TIOKSO-TIAZOLIDIN-5-ILIDEN]METIL]-1*H*-IMIDAZOL-2-IL]KARBAMAT (10)



306 mg (1,27 mmol, 1 ekv.) spojine **7**, 395 mg (1,27 mmol, 1 ekv.) spojine **9**, 10 mg (0,12 mmol, 0,1 ekv.) NaOAc in 10 μ l (0,17 mmol, 0,13 ekv.) CH₃COOH smo raztopili v 25 ml EtOH in mešali pri sobni temperaturi 24 ur. Po 24 urah smo reakcijsko zmes ohladili na -10 °C ter nastalo oborino odfiltrirali z odsesavanjem, sprali z EtOH in posušili. Dobili smo 530 mg spojine **10**.

Izgled	rumena oborina
Izkoristek	60 %
Mr	534,61
TLC	R _f = 0,58; MF: EtOAc
Tr	razgradnja spojine pri segrevanju nad 215 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 1,42 (s, 18H, 2 × Boc), 6,21 (m, 1H, CH), 7,03 (t, 2H, J = 2,9 Hz; Ar-H), 7,80 (s, 1H, Ar-H), 7,92 (s, 1H, Ar-H), 11,13 (s, 1H, NH), 11,83 (s, 1H, NH), 13,12 (s, 1H, NH-CO)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	27,4 ; 83,7; 109,3; 112,5; 115,2 (116,2); 122,7 (123,6); 125,2 (125,3); 125,8 (126,5); 134,4 (134,6); 140,46 (140,6); 149,57 (149,6); 158,4; 163,6 (163,8); 191,0; 195,0 *Vrednosti v oklepaju veljajo za drugi izomer spojine 10 .
MS (ESI)	m/z (%): 126,1 (100); 535,1 ([M+H] ⁺ , 11)
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3385, 3272, 3036, 2979, 2935, 1685, 1603, 1546, 1497, 1431, 1401, 1347, 1317, 1243, 1162, 1113, 1073, 1044, 962, 895, 860, 818, 749, 674

4.2.8 N-[(5E)-5-[(2-AMINO-1H-IMIDAZOL-5-IL)METILEN]-4-OKSO-2-TIOKSO-TIAZOLIDIN-3-IL]-1H-PIROL-2-KARBOKSAMID (**11**)



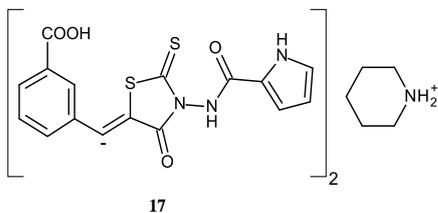
100,0 mg (0,30 mmol) spojine **10** smo dodali 10 ml CF₃COOH. Reakcijsko zmes smo na ledu ohladili na 0 °C in mešali 2 uri. Topili smo uparili in dobili 69,0 mg spojine **11**.

Izgled	oranžnorumena oborina
Izkoristek	69 %
Mr	334,38
TLC	R _f = 0,35; MF: EtOAc
Tr	razgradnja spojine pri segrevanju nad 180 °C
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ [ppm]: 6,16 (dd, 1H, <i>J</i> = 3,8 Hz; 2,6 Hz; CH), 6,91 (dd, 1H, <i>J</i> = 3,7 Hz; 1,2 Hz; Ar-H), 6,94 (dd, 1H, <i>J</i> = 2,4 Hz; 1,3 Hz; Ar-H), 7,31 (s, 1H, Ar-H), 7,50 (s, 1H, Ar-H), NH-pirol, NH-CO, NH-imidazol in NH ₂ izmenljivi
¹³C-NMR (100 MHz, MeOD)	δ [ppm]: 111,0; 114,2; 119,6; 119,8; 121,5; 123,7; 124,9; 125,1; 150,5; 161,5; 165,0; 190,5
MS (ESI)	m/z (%): 174,1 (100); 336,0 ([M+H] ⁺ , 52)
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3146, 2778, 1657, 1608, 1500, 1434, 1401, 1322, 1247, 1177, 1044, 835, 748, 718, 691, 658
HPLC	<i>Metoda 1</i> (glej poglavje Materiali in metode) t _R [min] = 6,584; 97 % pri 254 nm

4.2.9 BENZILNI DERIVATI N-(4-OKSO-2-TIOKSO-TIAZOLIDIN-3-IL)-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDA (17, 18, 19, 20, 21)

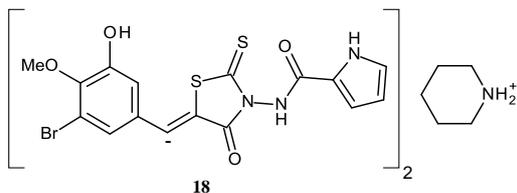
1 ekv. spojine **12**, **13**, **14**, **15**, **16** in 1 ekv. spojine **9** smo raztopili v EtOH, dodali 1 ekv. piperidina in mešali pri sobni temperature 24 ur. Izpadla je oborina, ki smo jo odfiltrirali z odesavanjem ter sprali s hladnim EtOH.

▪ **(Z)-3-((4-OKSO-3-(1 H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)-2-TIOKSOTIAZOLIDIN-5-ILIDEN)METIL)BENZOJSKA KISLINA (17)**



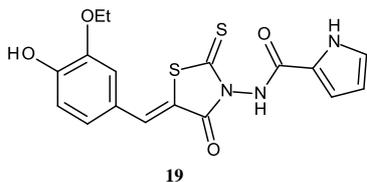
Izgled	rumena oborina
Mr	373,40
TLC	R _f = 0,07; MF: DKM/MeOH = 20/1
T_T	168-172 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm]: 1,56 (m, 1H, piperidin), 1,66 (m, 2H, piperidin), 3,02 (m, 2H, piperidin), 6,22 (s, 1H, CH), 7,06 (s, 2H, Ar-H), 7,63 (t, 1H, J = 7,4 Hz; Ar-H), 7,86 (d, 1H, J = 7,6 Hz; Ar-H), 8,05 (d, 2H, J = 9,7 Hz; Ar-H), 8,22 (s, 1H, Ar-H), 10,6 (br. s, 2H, NH + COOH), 11,97 (s, 1H, NH)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm]: 21,9; 22,4; 43,5; 109,4; 112,9; 119,7; 122,6; 123,8; 129,5; 130,9; 131,7; 132,6; 133,8; 134,5; 136,0; 158,4; 163,6; 167,4; 190,8
MS (ESI) HRMS	m/z (%): 166,0 (100); 372,0 ([M-H] ⁻ , 65) Izračunano za C ₁₆ H ₁₀ N ₃ O ₄ S ₂ [M-H] ⁻ (m/z): 372,0113; Izmerjena vrednost: 372,0113
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3254, 2948, 1738, 1653, 1592, 1551, 1504, 1432, 1400, 1320, 1250, 1168, 1111, 1041, 993, 962, 906, 888, 858, 743, 676, 648, 603
HPLC	Metoda 5 (glej poglavje Materiali in metode) t _R [min] = 7,557; 99 % pri 220 nm

- ***N*-[(5*Z*)-5-[(3-BROMO-5-HIDROKSI-4-METOKSI-FENIL)METILEN]-4-OKSO-2-TIOKSO-TIAZOLIDIN-3-IL]-1H-PIROL-2-KARBOKSAMID (18)**



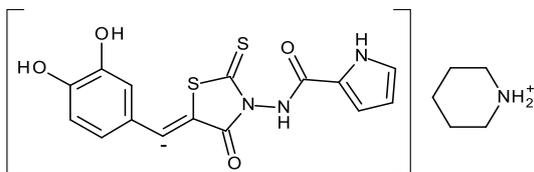
Izgled	svetlo rjavordeča oborina
Mr	454,32
TLC	R _f = 0,28; MF: DKM/MeOH = 20/1
T_T	179-184 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ [ppm]: 1,55 (m, 1H, piperidin), 1,64 (m, 2H, piperidin), 3,01 (m, 2H, piperidin), 3,83 (s, 3H, CH ₃ O), 6,21 (s, 1H, CH), 7,04 (s, 3H, Ar-H), 7,50 (s, 1H, Ar-H), 7,73 (s, 1H, Ar-H), 11,15 (s, 1H, NH ali OH), 11,85 (s, 1H, NH ali OH)
MS (ESI) HRMS	m/z (%): 453,9 (100); 451,9 ([M-H] ⁻ 91) Izračunano za C ₁₆ H ₁₁ BrN ₃ O ₄ S ₂ [M-H] ⁻ (m/z): 451,9374; Izmerjena vrednost: 451,9379
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3213, 2969, 1723, 1644, 1605, 1580, 1553, 1473, 1400, 1362, 1308, 1209, 1164, 1111, 1040, 997, 960, 917, 886, 855, 822, 753, 721, 694, 614, 603
HPLC	<i>Metoda 5</i> (glej poglavje Materiali in metode) t _R [min] = 11,730; 95 % pri 220 nm

▪ **(Z)- N-(5-(3-ETOKSI-4-HIDROKSIBENZILIDEN)-4-OKSO-2-TIOKSOTIAZOLIDIN-3-IL)-1H-PIROL-2-KARBOKSAMID (19)**



Izgled	rumena oborina
Mr	389,45
TLC	R _f = 0,31; MF: DKM/MeOH = 20/1
T_T	235-237 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 1,38 (t, 3H, <i>J</i> = 6,9 Hz, CH ₃ CH ₂ O), 4,11 (q, 2H, <i>J</i> = 7,0 Hz, CH ₃ CH ₂ O), 6,21 (m, 1H, CH), 6,99 (d, 1H, <i>J</i> = 8,3 Hz, Ar-H), 7,04 (m, 2H, Ar-H), 7,21 (dd, 1H, <i>J</i> = 8,4 Hz; 2,1 Hz, Ar-H), 7,26 (d, 1H, <i>J</i> = 1,9 Hz, Ar-H), 7,88 (s, 1H, Ar-H), 10,20 (s, 1H, NH-CO), 11,23 (s, 1H, NH ali OH), 11,86 (s, 1H, NH ali OH)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 14,6; 64,0; 109,4; 112,7; 114,6; 115,9; 116,5; 122,6; 123,8; 124,3; 125,8; 135,9; 147,4; 150,9; 158,4; 163,8; 190,9
MS (ESI) HRMS	m/z (%): 388,0 ([M-H] ⁻ , 100) Izračunano za C ₁₇ H ₁₅ N ₃ O ₄ S ₂ [M-H] ⁻ (m/z): 388,0426; Izmerjena vrednost: 388,0420
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3357, 3145, 2980, 2497, 2391, 1725, 1635, 1605, 1509, 1570, 1512, 1472, 1440, 1411, 1332, 1314, 1280, 1236, 1214, 1179, 1158, 1122, 1109, 1095, 1056, 1036, 1003, 970, 920, 909, 862, 843, 821, 800, 709, 669, 615, 601, 583
HPLC	<i>Metoda 1</i> (glej poglavje Materiali in metode) t _R [min] = 12,466; 97 % pri 254 nm

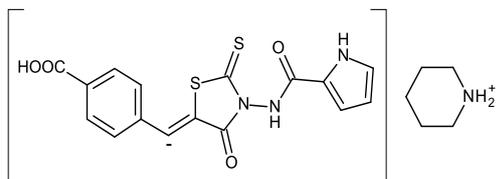
▪ ***N*-[(5*Z*)-5-[(3,4-DIHIDROKSIFENIL)METILEN]-4-OKSO-2-TIOKSO-TIAZOLIDIN-3-IL]-1H-PIROL-2-KARBOKSAMID (20)**



20

Izgled	vinsko rdeča oborina
Mr	361,40
TLC	R _f = 0,06; MF: DKM/MeOH = 20/1
T_T	181-186 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ [ppm]: 1,54 (m, 2H, piperidin), 1,59 (m, 4H, piperidin), 2,89 (m, 4H, piperidin), 6,19 (dd, 1H, <i>J</i> = 3,5 Hz; 2,6 Hz, CH), 6,48 (d, 1H, <i>J</i> = 8,3 Hz; Ar-H), 6,84 (d, 1H, <i>J</i> = 2,5 Hz; Ar-H), 7,01 (m, 3H, Ar-H), 7,57 (s, 1H, Ar-H), 11,81 (s, 1H, NH)
MS (ESI)	m/z (%): 360,0 ([M-H] ⁻ , 100)
HRMS	Izračunano za C ₁₅ H ₁₀ N ₃ O ₄ S ₂ [M-H] ⁻ (m/z): 360,0113; Izmerjena vrednost: 360,0110
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3200, 2970, 2866, 2361, 1707, 1657, 1556, 1519, 1448, 1406, 1313, 1288, 1262, 1245, 1168, 1107, 1046, 1000, 962, 929, 907, 885, 860, 835, 816, 792, 727, 684, 612, 576
HPLC	<i>Metoda 5</i> (glej poglavje Materiali in metode) t _R [min] = 9,157; 96 % pri 220 nm

▪ **(Z)-4-((4-OKSO-3-(1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)-2-TIOKSOTIAZOLIDIN-5-ILIDEN)METIL)BENZOJSKA KISLINA (21)**



21

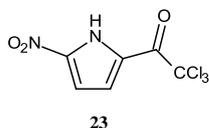
Izgled	rumena oborina
Mr	373,40
TLC	R _f = 0,11; MF: DKM/MeOH = 20/1
T_T	150-155 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 1,54 (m, 2H, piperidin), 1,66 (m, 4H, piperidin), 3,01 (m, 4H, piperidin), 6,22 (dd, 1H, J = 6,22 Hz; 6,22 Hz; CH), 7,05 (s, 1H, Ar-H), 7,10 (d, 1H, J = 2,6 Hz; Ar-H), 7,63 (d, 2H, J = 8,4 Hz; Ar-H), 7,88 (s, 1H, Ar-H), 7,95 (d, 2H, J = 8,3 Hz; Ar-H), 10,1 (br. s, 1H, COOH + NH), 12,06 (s, 1H, NH)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 22,0; 22,4; 43,5; 109,3; 113,2; 119,6; 122,8 ; 123,7; 129,7 ; 130,4; 133,7 ; 134,2; 140,5; 158,5; 163,6; 169,0; 190,8
MS (ESI)	m/z (%): 145,0 (100); 372,0 ([M-H] ⁻ , 73)
HRMS	Izračunano za C ₁₆ H ₁₀ N ₃ O ₄ S ₂ [M-H] ⁻ (m/z): 372,0126; Izmerjena vrednost: 372,0110
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3111, 2949, 2854, 1733, 1667, 1626, 1598, 1519, 1376, 1320, 1250, 1168, 1129, 1038, 778, 737
HPLC	Metoda 5 (glej poglavje Materiali in metode) t _R [min] = 8,950; 95 % pri 254 nm

4.2.10 2,2,2-TRIKLORO-1-(5-NITRO-1-H-PIROL-2-IL)ETANON (23) IN 2,2,2-TRIKLORO-1-(4-NITRO-1 H-PIROL-2-IL)ETANON (24)

Raztopino 9,799 g (46,12 mmol, 1 ekv.) 2-trikloroacetilpirola v 55 ml Ac₂O smo ohladili na -20 °C in ji po kapljicah dodali 5,37 ml (129 mmol, 2,8 ekv.) HNO₃ ter mešali 24 ur. Čez noč se je reakcijska zmes segrela na sobno temperaturo, nato smo zmes zlili na led, oborino prefiltrirali in dvakrat sušili s toluenom. Zmes produktov smo ločili s

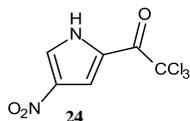
kolonsko kromatografijo, MF: Hex/EtOAc = 1/1 in dobili 3,09 g spojine **23** ter 6,22 g spojine **24**.

▪ **2,2,2-TRIKLORO-1-(5-NITRO-1H-PIROL-2-IL)ETANON (23)**



Izgled	rjavi kristali
Izkoristek	26 %
Mr	257,46
TLC	R _f = 0,42; MF: DKM
T_T	198 °C [lit. (23)]
¹H-NMR (400 MHz, MeOD-d ₄)	δ [ppm]: 7,13 (d, 1H, <i>J</i> = 4,5 Hz; Ar-H [C ₃]), 7,35 (d, 1H, <i>J</i> = 4,5 Hz; Ar-H [C ₄]), NH izmenljiv

▪ **2,2,2-TRIKLORO-1-(4-NITRO-1H-PIROL-2-IL)ETANON (24)**

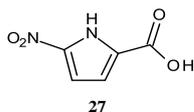


Izgled	svetlorjavi kristali
Izkoristek	52 %
Mr	257,46
TLC	R _f = 0,25; MF: DKM
T_T	177-178 °C [lit. (24)]
¹H-NMR (400 MHz, MeOD-d ₄)	δ [ppm]: 7,76 (d, 1H, <i>J</i> = 1,5 Hz; Ar-H [C ₃]), 8,06 (d, 1H, <i>J</i> = 1,4 Hz; Ar-H [C ₅]), NH izmenljiv

4.2.11 DERIVATI PIROL-2-KARBOKSILNE KISLINE (27, 28, 29)

0,20M raztopini spojine **23**, **25** ali **26** (1 ekv.) v THF smo dodali 2M (5 ekv.) vodno raztopino NaOH in mešali pri sobni temperaturi 24 ur. Nato smo dodali vodo in nakisali do pH = 1. Vodno fazo smo trikrat ekstrahirali z dietil etrom (**27** in **29**) oziroma z EtOAc (**28**). Organsko fazo smo sprali z NaCl, sušili z brezvodnim Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali ter filtratu uparili topilo.

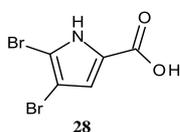
▪ **5-NITRO-1H-PIROL-2-KARBOKSILNA KISLINA (27)**



Spojino **27** smo pripravili po predpisu 4.2.11. Zatehtali smo 1,413 g (5,488 mmol) spojine **23**, odmerili 30,94 ml THF in raztopili 1,098 g (27,45 mmol) NaOH v 13,72 ml vode. Pri ekstrakciji smo uporabili 30 ml vode, 3 × 30 ml dietil etra in 20 ml NaCl. Dobili smo 0,615 g spojine **27**.

Izgled	sivorjava oborina
Izkoristek	72 %
Mr	156,10
TLC	R _f = 0,08; MF: Hex/EtOAc = 1/1
T_T	161-163 °C 160-161 °C [lit. (25)]
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm]: 6,84 (s, 1H, Ar-H [C ₃]), 7,14 (s, 1H, Ar-H [C ₄]), 13,41 (s, 1H, COOH ali NH), 13,84 (s, 1H, COOH ali NH)

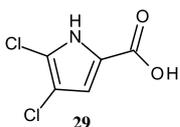
▪ **4,5-DIBROMO-1H-PIROL-2-KARBOKSILNA KISLINA (28)**



Spojino **28** smo pripravili po predpisu 4.2.11. Zatehtali smo 2,0 g (5,4 mmol) spojine **25**, odmerili 24,41 ml THF in raztopili 0,864 g (21,6 mmol) NaOH v 10,8 ml vode. Pri ekstrakciji smo uporabili 30 ml vode, 3 × 30 ml EtOAc in 20 ml NaCl. Dobili smo 0,775 g spojine **28**.

Izgled	rumenorjava oborina
Izkoristek	53 %
Mr	268,89
TLC	R _f = 0,13; MF: DKM/MeOH = 7/1
T_T	197-201 °C 180-182 °C [lit. (26)]
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm]: 6,83 (s, 1H, Ar-H), 12,61 (s, 1H, COOH ali NH), 12,97 (s, 1H, COOH ali NH)

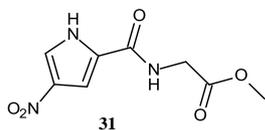
▪ **4,5-DIKLORO-1H-PIROL-2-KARBOKSILNA KISLINA (29)**



Spojino **29** smo pripravili po predpisu 4.2.11. Zatehtali smo 1,741 g (6,166 mmol) spojine **26**, odmerili 37,76 ml THF in raztopili 1,233 g (30,82 mmol) NaOH v 15,41 ml vode. Pri ekstrakciji smo uporabili 30 ml vode, 3 × 30 ml dietil etra in 20 ml NaCl. Dobili smo 0,834 g spojine **29**.

Izgled	siva oborina
Izkoristek	75 %
Mr	179,99
TLC	R _f = 0,39; MF: Hex/EtOAc = 1/1
T_T	167-171 °C 169-171 °C [lit. (26)]
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 6,81 (s, 1H, Ar-H), 12,86 (s, 1H, COOH ali NH), 13,03 (s, 1H, COOH ali NH)

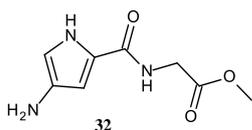
4.2.12 METIL (4-NITRO-1H-PIROL-2-KARBONIL)GLICINAT (31)



Raztopini 1,73 g (6,72 mmol, 1 ekv.) spojine **24** in 1,055 g (8,399 mmol, 1,25 ekv.) glicina (**30**) v 50 ml MeCN smo dodali 1,66 ml (15,1 mmol, 2,25 ekv.) NMM in mešali pri sobni temperaturi 3 dni. Topilo smo uparili, dodali 100 ml EtOAc in sprali z 2 × 30 ml HCl, 20 ml NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Sušilno sredstvo smo odfiltrirali in uparili topilo. Produkt smo očistili s prekristaliziracijo iz hladnega CHCl₃. Po 2 dneh so izpadli kristali bele barve, katere smo odfiltrirali z odsesavanjem. Dobili smo 1,224 g spojine **31**.

Izgled	bela oborina
Izkoristek	69 %
Mr	227,17
TLC	R _f = 0,13; MF: Hex/EtOAc = 1/1
T_r	181-187 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 3,65 (s, 3H, CH ₃), 4,01 (d, 2H, <i>J</i> = 5,7 Hz; NH-CH ₂), 7,49 (d, 1H, <i>J</i> = 1,7 Hz; Ar-H [C ₃]), 7,95 (d, 1H, <i>J</i> = 1,6 Hz; Ar-H [C ₅]), 8,95 (t, 1H, <i>J</i> = 5,9 Hz; CO-NH-CH ₂), 12,81 (s, 1H, NH)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 40,7; 51,9; 105,8; 122,9; 126,3; 136,4; 159,8; 170,3
MS (ESI) HRMS	m/z (%): 228,1 ([M+H] ⁺ , 100) Izračunano za C ₈ H ₁₀ N ₃ O ₅ [M+H] ⁺ (m/z): 228,0620; Izmerjena vrednost: 228,0624
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3349, 3197, 3135, 2957, 1716, 1638, 1568, 1532, 1501, 1470, 1438, 1415, 1371, 1324, 1265, 1218, 1132, 1060, 1016, 968, 857, 799, 748, 724, 641
HPLC	Metoda 2 (glej poglavje Materiali in metode) t _R [min] = 9,165; 99 % pri 254 nm

4.2.13 METIL (4-AMINO-1H-PIROL-2-KARBONIL)GLICINAT (32)

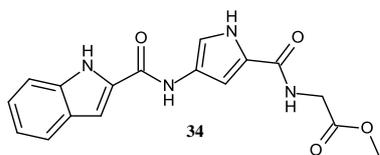


0,946 g (4,164 mmol, 1 ekv.) spojine **31** smo raztopili v 150 ml MeOH in raztopino prepihali z argonom. Nato smo dodali 200 mg (21 % m/m) Pd/C in zmes prepihali z vodikom ter mešali v vodikovi atmosferi pri sobni temperaturi 1,5 ure. Pd/C smo odfiltrirali z odsesavanjem, topilo uparili ter produkt poskušali očistiti s prekristalizacijo iz EtOAc, dietil etra, CHCl₃, DKM in heksana. Ker se spojina ni izoborila, smo vseh 5 organskih faz združili in uparili zmes topil. Dobili smo 0,759 g spojine **32**, ki smo jo zaradi nestabilnosti neposredno uporabili v naslednjih reakcijah.

Izgled	temnorjavi kristali
Izkoristek	92 %
Mr	197,19
TLC	R _f = 0,18; MF: DKM/MeOH = 9/1

Spojina **32** je nestabilna.

4.2.14 METIL (4-(1H-INDOL-2-KARBONILAMINO)-1H-PIROL-2-KARBONIL)GLICINAT (**34**)



90 mg (0,46 mmol, 1 ekv.) spojine **32**, 74 mg (0,46 mmol, 1 ekv.) indol-2-karboksilne kisline, 62 mg (0,46 mmol, 1 ekv.) HOBt in 0,30 ml (2,7 mmol, 6 ekv.) NMM smo raztopili v 5 ml DMF, ohladili na 0 °C in dodali 96 mg (0,62 mmol, 1,3 ekv.) EDC. Po 3 dneh smo uparili topilo in dodali 100 ml EtOAc. Organsko fazo smo sprali z 10 % vodno raztopino citronske kisline (2 × 25ml), 1M NaOH in nasičeno vodno raztopino NaCl (25 ml) ter sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Sušilno sredstvo smo odfiltrirali in filtratu uparili topilo ter prekristalizirali produkt iz mešanice dietil eter/Hex, da smo dobili 64 mg spojine **34**.

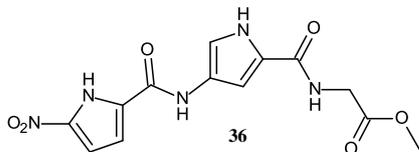
Izgled	mlečno bela oborina
Izkoristek	41 %
Mr	340,34
TLC	R _f = 0,17; MF: EtOAc
Tr	razpad pri segrevanju nad 260 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm]: 3,66 (s, 3H, CH ₃), 3,98 (s, 2H, NH-CH ₂), 6,98 (s, 1H, Ar-H), 7,05 (dd, 1H, J = 7,3 Hz; 7,3 Hz; Ar-H), 7,19 (dd, 1H, J = 7,6 Hz; 7,6 Hz; Ar-H), 7,30 (s, 2H, Ar-H), 7,45 (d, 1H, J = 8,2 Hz, Ar-H), 7,65 (d, 1H, J = 8,1 Hz; Ar-H), 8,57 (s, 1H, CO-NH-CH ₂), 10,34 (s, 1H, CO-NH), 11,35 (s, 1H, NH), 11,66 (s, 1H, NH)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm]: 40,6; 51,7; 102,6; 102,8; 112,3; 112,4; 119,8; 121,6; 123,0; 123,4; 123,8; 127,2; 131,7; 136,6; 158,3; 160,9; 170,8
MS (ESI) HRMS	m/z (%): 339,1 ([M-H] ⁻ , 100) Izračunano za C ₁₇ H ₁₅ N ₄ O ₄ [M-H] ⁻ (m/z): 339,1093; Izmerjena vrednost: 339,1088
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3373, 3316, 3230, 1735, 1635, 1588, 1531, 1402, 1368, 1304, 1217, 1125, 780, 742
HPLC	Metoda 2 (glej poglavje Materiali in metode) t _R [min] = 13,659; 97 % pri 254 nm

4.2.15 DERIVATI METIL (4-(1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)-1H-PIROL-2-KARBONIL)GLICINATA (36, 37, 38)

Predpis za spojini 36 in 38:

0,09M raztopini spojine **27** ali **29** (1 ekv.) v DMF smo dodali 1 ekv. spojine **32**, 1 ekv. HOBt in 5 ekv. NMM. Zmes smo ohladili na 0 °C in dodali 1,1 ekv. EDC ter mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Po 24 urah reakcija še ni potekla, zato smo dodali 1 ekv. HOBt, 1,1 ekv. EDC in 1 ekv. DMAP ter mešali nadaljnih 24 ur. Nato smo izvedli ekstrakcijo z CH₂Cl₂, sprali z 10 % vodno raztopino citronske kisline in odfiltrirali oborino, ki se je pojavila v vodni fazi. Matičnico smo ponovno ekstrahirali z CH₂Cl₂ in organsko fazo sprali z NaHCO₃.

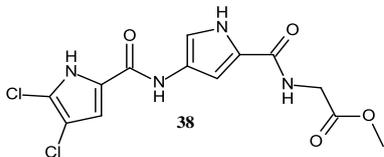
▪ **METIL (4-(5-NITRO-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)-1H-PIROL-2-KARBONIL)GLICINAT (36)**



Spojino **36** smo pripravili po predpisu 4.2.15. Zatehtali smo 158,32 mg (1,0143 mmol) spojine **27**, 200 mg (1,01 mmol) spojine **32**, $2 \times 136,89$ mg HOBt, $2 \times 173,2$ mg (1,117 mmol) EDC, 92,94 mg DMAP in odmerili 0,56 ml NMM ter 11,12 ml DMF. Pri ekstrakciji smo uporabili 2×100 ml CH_2Cl_2 , 2×20 ml 10 % vodne raztopine citronske kisline, 2×20 ml NaHCO_3 . Dobili smo 120 mg spojine **36**.

Izgled	temnorumena oborina
Izkoristek	35 %
Mr	335,28
TLC	R _f = 0,08; MF: EtOAc
Tr	razgradnja pri segrevanju nad 175 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 3,65 (s, 3H, CH ₃), 3,97 (d, 2H, <i>J</i> = 5,9 Hz; NH-CH ₂), 6,92 (dd, 1H, <i>J</i> = 2,7 Hz; 1,6 Hz; Ar-H), 7,00 (d, 1H, <i>J</i> = 4,2 Hz; Ar-H), 7,20 (d, 1H, <i>J</i> = 4,3 Hz; Ar-H), 7,27 (dd, 1H, <i>J</i> = 2,9 Hz; 1,5 Hz; Ar-H), 8,58 (t, 1H, <i>J</i> = 6,0 Hz; CO-NH-CH ₂), 10,37 (s, 1H, CO-NH), 11,40 (s, 1H, NH), 13,53 (s, 1H, NH)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 40,6; 51,7; 102,4; 111,2; 112,4; 112,5; 123,2; 123,3; 131,1; 138,7; 155,8; 160,8; 170,7
MS (ESI) HRMS	m/z (%): 334,1 ([M-H] ⁻ , 100) Izračunano za C ₁₃ H ₁₂ N ₅ O ₆ [M-H] ⁻ (m/z): 334,0788; Izmerjena vrednost: 334,0787
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3374, 3277, 3222, 3138, 2957, 1740, 1722, 1626, 1591, 1503, 1458, 1399, 1367, 1295, 1269, 1250, 1209, 1125, 1057, 1020, 983, 970, 947, 832, 808, 771, 755, 699, 634
HPLC	Metoda 4 (glej poglavje Materiali in metode) t _R [min] = 10,383; 96 % pri 254 nm

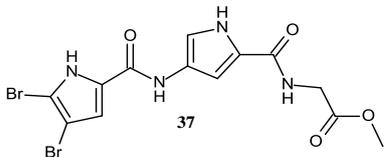
▪ **METIL (4-(4,5-DIKLORO-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)-1H-PIROL-2-KARBONIL)GLICINAT (38)**



Spojino **38** smo pripravili po predpisu 4.2.15. Zatehtali smo 136,92 mg (0,76069 mmol) spojine **29**, 150 mg (0,761 mmol) spojine **32**, $2 \times 102,78$ mg HOBt, $2 \times 129,90$ mg (0,83676 mmol) EDC, 123,88 mg DMAP in odmerili 0,42 ml NMM ter 8,34 ml DMF. Pri ekstrakciji smo uporabili 2×100 ml CH_2Cl_2 , 2×20 ml 10 % vodne raztopine citronske kisline, 2×20 ml NaHCO_3 . Dobili smo 153 mg spojine **38**.

Izgled	rjava oborina
Izkoristek	56 %
Mr	359,16
TLC	Rf = 0,16; MF: EtOAc
Tr	269-274 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 3,65 (s, 3H, CH ₃), 3,96 (d, 2H, <i>J</i> = 5,9 Hz; NH-CH ₂), 6,87 (dd, 1H, <i>J</i> = 2,9 Hz; 1,3 Hz; Ar-H), 7,06 (d, 1H, <i>J</i> = 2,2 Hz; Ar-H), 7,20 (dd, 1H, <i>J</i> = 2,7 Hz; 1,5 Hz; Ar-H), 8,54 (t, 1H, <i>J</i> = 6,0 Hz; CO-NH-CH ₂), 9,98 (s, 1H, NH), 11,32 (s, 1H, NH), 12,83 (s, 1H, NH)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 40,6; 51,7; 102,5; 108,1; 109,9; 112,3; 115,2; 123,1; 123,4; 124,9; 156,2; 160,8; 170,8
MS (ESI) HRMS	m/z (%): 357,0 ([M-H] ⁻ , 100) Izračunano za C ₁₃ H ₁₁ Cl ₂ N ₄ O ₄ [M-H] ⁻ (m/z): 357,0157; Izmerjena vrednost: 357,0153
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3378, 3239, 3119, 2958, 1738, 1662, 1637, 1583, 1507, 1432, 1404, 1313, 1202, 1123, 980, 812, 756, 695, 629
ELEMENTNA ANALIZA	Izračunano za C ₁₃ H ₁₂ Cl ₂ N ₄ O ₄ : C 43,47 % H 3,37 % N 15,60 % Izmerjene vrednosti: C 43,47 % H 3,49 % N 14,97 %

▪ **METIL (4-(4,5-DIBROMO-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)-1H-PIROL-2-KARBONIL)GLICINAT (37)**



Raztopini spojine 79,95 mg (0,5122 mmol, 1 ekv.) **28** v 5,62 ml CH₂Cl₂ smo dodali 101 mg (0,512 mmol, 1 ekv.) spojine **32** in 0,056 ml (0,51 mmol, 1 ekv.) NMM. Zmes smo ohladili na 0 °C in dodali 164,44 mg (1 ekv.) TBTU ter mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Med reakcijo je nastala oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in matičnico sprali z 2 × 20 ml 10 % vodne raztopine citronske kisline. V vodni fazi se je zmes oborila, zato smo jo odfiltrirali s presesavanjem, organsko fazo smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄ ter uparili topilo. Dobili smo 117 mg spojine **37**.

Izgled	sivorjava oborina
Izkoristek	51 %
Mr	448,07
TLC	R _f = 0,18; MF: EtOAc
T_r	280-284 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 3,65 (s, 3H, CH ₃), 3,96 (s, 2H, NH-CH ₂), 6,87 (s, 1H, Ar-H), 7,10 (s, 1H, Ar-H), 7,21 (s, 1H, Ar-H), 8,55 (s, 1H, CO-NH-CH ₂), 9,97 (s, 1H, CO-NH), 11,32 (s, 1H, NH), 12,62 (s, 1H, NH)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 40,6; 51,7; 98,0; 102,5; 105,0; 112,3; 112,8; 123,0; 123,5; 128,18; 156,1; 160,8; 170,8
MS (ESI)	m/z (%): 446,9 (100); 444,9 ([M-H] ⁻ , 55)
HRMS	Izračunano za C ₁₃ H ₁₁ Br ₂ N ₄ O ₄ [M-H] ⁻ (m/z): 444,9147; Izračunana vrednost: 444,9153
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3390, 3200, 2954, 1743, 1633, 1591, 1531, 1435, 1406, 1375, 1313, 1204, 1126, 973, 810, 764
HPLC	Metoda 1 (glej poglavje Materiali in metode) t _R [min] = 12,007; 96 % pri 254 nm

4.2.16 DERIVATI 4-KARBOKSAMIDO-1H-PIROL-2-KARBONILGLICINA (35, 39, 40, 41)

Predpis za spojine 35, 39 in 41:

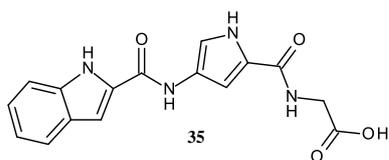
0,11M raztopini spojine **34**, **36** ali **38** (1 ekv.) v THF smo dodali 1M raztopino LiOH (4 ekv.) v vodi; THF/voda = 2/1. Reakcijska zmes se je mešala pri sobni temperaturi 2 uri (**35**, **39**) oz. 24 ur (**41**).

Izolacija spojine **35**: Zmesi smo dodali EtOAc, dvakrat sprali z 1M NaOH, vodno fazo nakisali do pH = 1 in dvakrat ekstrahirali z EtOAc, združene organske frakcije sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Sušilno sredstvo smo odfiltrirali in uparili topilo. Surovi produkt smo suspendirali v EtOH in segrevali, da se je raztopila. Raztopino etanola smo pustili 2 uri pri sobni temperaturi in jo nato dali v hladilnik. Po enem dnevu kristali niso izpadli, zato smo dodali dietil eter. Zmes smo postavili v zamrzovalnik in po 10 minutah je izpadla oborina, katero smo odfiltrirali z odsesavanjem.

Izolacija spojine **39**: Zmesi smo dodali 1M NaOH in dvakrat sprali z EtOAc. Vodno fazo smo nakisali do pH = 1 in spojino dvakrat ekstrahirali v EtOAc. Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Sušilno sredstvo smo odfiltrirali in uparili topilo. Vodno fazo smo naalkalili z NaHCO₃ do pH = 4 in uparili vodo. Suhi preostanek smo nato raztopili v 0,01M HCl in vodno fazo dvakrat ekstrahirali z EtOAc. Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Sušilno sredstvo smo odfiltrirali in uparili topilo.

Izolacija spojine **41**: Zmesi smo dodali 1M NaOH in dvakrat sprali z EtOAc. Vodno fazo smo nakisali do pH = 1 in še dvakrat ekstrahirali v EtOAc. Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Sušilno sredstvo smo odfiltrirali in skoncentrirali. V zmes smo po kapljicah dodali DKM, izpadli so kristali, ki smo jih shranili v zamrzovalniku. Naslednji dan smo oborino odfiltrirali z odsesavanjem, matičnico sprali z DKM ter ponovno postavili v zamrzovalnik. Takoj so izpadli kristali, katere smo odfiltrirali z odsesavanjem in sušili pod vakuumom.

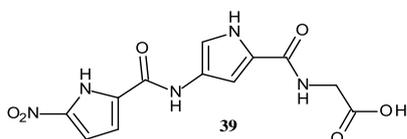
▪ (4-(1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)-1H-PIROL-2-KARBONIL)GLICIN (35)



Spojino **35** smo pripravili po predpisu 4.2.16. Zatehtali smo 40,0 mg (0,118 mmol) spojine **34**, 11,30 mg (0,470 mmol) LiOH, odmerili 0,5 ml vode ter 1,13 ml THF. Za izolacijo spojine smo uporabili 2×10 ml 1M NaOH in ter 3×20 ml EtOAc. Dobili smo 32 mg spojine **35**.

Izgled	svetlorjavi kristali
Izkoristek	80 %
Mr	326,31
TLC	R _f = 0,33; MF: EtOAc + 0,3 % TFA
T_T	spojina razpade pri segrevanju nad 210 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 3,88 (d, 2H, <i>J</i> = 5,9 Hz; NH-CH ₂), 6,96 (dd, 1H, <i>J</i> = 2,7 Hz; 1,5 Hz; Ar-H), 7,06 (m, 1H, Ar-H), 7,20 (m, 1H, Ar-H), 7,30 (s, 2H, Ar-H), 7,46 (d, 1H, <i>J</i> = 8,3 Hz; Ar-H), 7,66 (d, 1H, <i>J</i> = 8,1 Hz; Ar-H), 8,44 (t, 1H, <i>J</i> = 5,8 Hz; CO-NH-CH ₂), 10,34 (s, 1H, CO-NH), 11,33 (s, 1H, NH), 11,67 (s, 1H, NH), 12,59 (s, 1H, COOH)
MS (ESI)	m/z (%): 325,1 ([M-H] ⁻ ; 100)
HRMS	Izračunano za C ₁₆ H ₁₃ N ₄ O ₄ [M-H] ⁻ (m/z): 325,0937; Izmerjena vrednost: 325,0929
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3295, 3206, 1725, 1627, 1590, 1527, 1409, 1369, 1311, 1264, 1205, 1125, 808, 761, 732, 642
HPLC	Metoda 2 (glej poglavje Materiali in metode) t _R [min] = 13,044; 99 % pri 254 nm

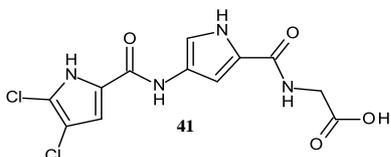
▪ **(4-(5-NITRO-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)-1H-PIROL-2-KARBONIL)GLICIN**
(**39**)



Spojino **39** smo pripravili po predpisu 4.2.16. Zatehtali smo 87 mg (0,26 mmol) spojine **36**, 24,85 mg (1,038 mmol) LiOH odmerili 1,04 ml vode ter 2,35 ml THF. Za izolacijo spojine smo uporabili 20 ml 1M NaOH, in 3×40 ml EtOAc. Dobili smo 69 mg spojine **39**.

Izgled	oranžna oborina
Izkoristek	83 %
Mr	321,25
TLC	R _f = 0,23; MF: EtOAc + 0,3 % TFA
T_r	razgradnja pri segrevanju nad 280 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 3,88 (d, 2H, <i>J</i> = 6,0 Hz; NH-CH ₂), 6,91 (dd, 1H, <i>J</i> = 2,6 Hz; 1,6 Hz; Ar-H), 7,00 (d, 1H, <i>J</i> = 4,4 Hz; Ar-H), 7,20 (d, 1H, <i>J</i> = 4,3 Hz; Ar-H), 7,26 (dd, 1H, <i>J</i> = 3,0 Hz; 1,6 Hz; Ar-H), 8,48 (t, 1H, <i>J</i> = 6,0 Hz; CO-NH-CH ₂), 10,37 (s, 1H, NH), 11,40 (s, 1H, NH), 12,44 (s, 1H, COOH), 13,54 (s, 1H, NH)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 40,6; 102,2; 111,2; 112,4; 123,2; 123,5; 131,1; 138,6; 155,7; 160,7; 171,7
MS (ESI) HRMS	m/z (%): 320,1 ([M-H] ⁻ , 100) Izračunano za C ₁₂ H ₁₀ N ₅ O ₆ [M-H] ⁻ (m/z): 320,0631; Izmerjena vrednost: 320,0624
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3401, 3336, 3288, 2944, 1689, 1633, 1606, 1584, 1544, 1455, 1397, 1362, 1297, 1250, 1117, 1038, 802, 744, 677
HPLC	Metoda 4 (glej poglavje Materiali in metode) t _R [min] = 9,520; 95 % pri 254 nm

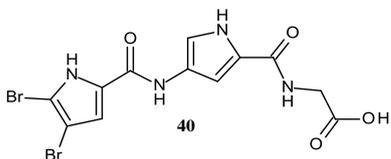
▪ **(4-(4,5-DIKLORO-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)-1H-PIROL-2-KARBONIL)GLICIN (41)**



Spojino **41** smo pripravili po predpisu 4.2.16. Zatehtali smo 113 mg (0,315 mmol) spojine **38**, 30,04 mg (1,258 mmol) LiOH in odmerili 1,25 ml vode ter 2,84 ml THF. Za izolacijo spojine smo uporabili 20 ml 1M NaOH, in 2 × 40 ml EtOAc. Dobili smo 24 mg spojine **41**.

Izgled	svetlorjava oborina
Izkoristek	22 %
Mr	345,14
TLC	R _f = 0,15; MF: EtOAc + 0,3 % TFA
T_r	257-261 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ [ppm]: 3,87 (d, 2H, <i>J</i> = 5,7 Hz; NH-CH ₂), 6,86 (dd, 1H, <i>J</i> = 2,8 Hz; 1,6 Hz; Ar-H), 7,07 (s, 1H, Ar-H), 7,20 (dd, 1H, <i>J</i> = 2,6 Hz; 1,6 Hz; Ar-H), 8,44 (t, 1H, <i>J</i> = 5,9 Hz; CO-NH-CH ₂), 9,98 (s, 1H, NH), 11,31 (s, 1H, NH), 12,57 (s, 1H, COOH), 12,85 (s, 1H, NH)
MS (ESI)	m/z (%): 343,0 ([M-H] ⁻ , 100)
HRMS	Izračunano za C ₁₂ H ₉ Cl ₂ N ₄ O ₄ [M-H] ⁻ (m/z): 343,0001; Izmerjena vrednost: 343,0011
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3391, 3203, 1740, 1632, 1585, 1528, 1405, 1314, 1203, 1124, 1019, 975, 808, 758

4.2.17 (4-(4,5-DIBROMO-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)-1H-PIROL-2-KARBONIL)GLICIN (40)



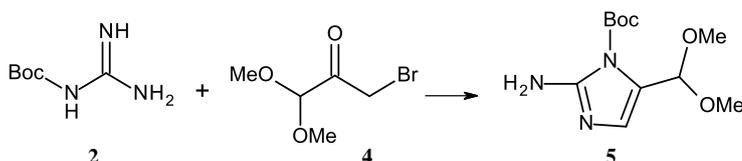
Raztopini 204,5 mg (0,7607 mmol, 1 ekv.) spojine **28** v 8,34 ml DMF smo dodali 150 mg (0,761 mmol, 1 ekv.) spojine **32**, 102,78 mg (0,76068 mmol, 1 ekv.) HOBt in 0,42 ml (3,8 mmol, 5 ekv.) NMM. Zmes smo ohladili na 0 °C in dodali 129,9 mg (0,8368 mmol, 1,1 ekv.) EDC ter mešali pri sobni temperaturi 3 dni. Topilo smo uparili, dodali 100 ml EtOAc in dvakrat sprali z 2 × 20 ml 10 % vodne raztopine citronske kisline ter 2 × 20 ml 1M NaOH. Združene organske faze smo sprali z 20 ml nasičene vodne raztopine NaCl in sušili z brezvodnim Na₂SO₄. Sušilno sredstvo smo odfiltrirali in skoncentrirali pod znižanim tlakom. Čez noč smo zmes pustili v hladilniku, da se je izoborila. Dobili smo 43 mg spojine **40**.

Izgled	svetlorjavi kosmiči
Izkoristek	13 %
Mr	434,04
TLC	RF = 0,23; MF: ETOAC + 0,3 % TFA
T_r	> 300 °C
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm]: 3,87 (d, 2H, <i>J</i> = 5,8 Hz; NH-CH ₂), 6,85 (dd, 1H, <i>J</i> = 2,9 Hz; 1,7 Hz; Ar-H), 7,10 (d, 1H, <i>J</i> = 2,3 Hz; Ar-H), 7,20 (dd, 1H, <i>J</i> = 2,9 Hz; 1,5 Hz; Ar-H), 8,43 (t, 1H, <i>J</i> = 6,1 Hz; CO-NH-CH ₂), 9,96 (s, 1H, NH), 11,29 (s, 1H, NH), 12,44 (s, 1H, COOH), 12,79 (s, 1H, NH)
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d₆)	δ [ppm]: 40,61; 102,23; 111,21; 112,37; 123,16; 123,46; 131,07; 138,63; 155,69; 160,68; 171,68
MS (ESI) HRMS	m/z (%): 432,9 (100); 430,9 ([M-H] ⁻ , 50) Izračunano za C ₁₂ H ₉ Br ₂ N ₄ O ₄ [M-H] ⁻ (m/z): 430,8991; Izmerjena vrednost: 430,8982
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3412, 3351, 3250, 3150, 2962, 1705, 1613, 1568, 1531, 1442, 1401, 1303, 1238, 1203, 1127, 969, 855, 806, 759, 635
HPLC	Metoda 3 (glej poglavje Materiali in metode) t _R [min] = 11,704; 95 % pri 254 nm

Prišli so do naslednjih ugotovitev:

- Vzrok, da daje reakcija z Ac-gvanidinom tako nizek izkoristek v primerjavi z Boc-gvanidinom, je v slabši nukleofilnosti Ac-gvanidina.
- Elektronski efekt Boc skupine igra veliko vlogo pri poteku ciklizacije.
- Zamenjava topila ne vpliva na izkoristek reakcije z Boc-gvanidinom (22).

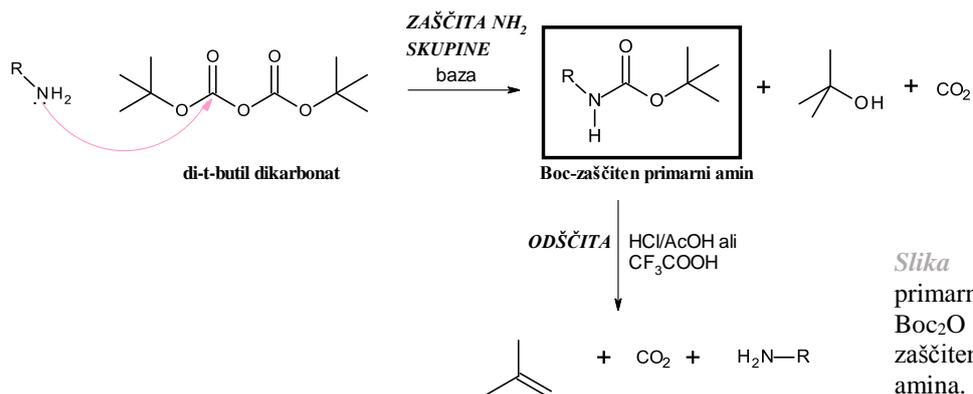
Sinteze spojine **5** smo se lotili s konvergentnim pristopom. Najprej smo sintetizirali izhodna Boc-gvanidin in 3-bromo-1,1,-dimetoksipropan-2-on, ki smo ju nato ciklizirali v imidazolni obroč (Slika 13).



Slika 13: Shema sinteze *tert*-butil-2-amino-5-(dimetoksimetil)imidazol-1-karboksilata.

Boc-zaščita

Ker smo želeli sintetizirati substituiran imidazolni obroč s prosto amino skupino na mestu 2, smo za zaščito izhodnega gvanidinijevega klorida (**1**) uporabili Boc₂O. Uporaba Boc zaščitne skupine je zelo pogosta pri zaščiti primarnih in sekundarnih aminov, saj je Boc zaščiten amin po eni strani obstojen pri hidrogenolizi, pri reakcijah z bazami in nukleofilnimi reagenti, po drugi strani pa je neobstojev v kislih pogojih, zato je odstranjevanje Boc zaščite dokaj preprosto (28). Zaščita amino skupine z Boc₂O poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije. Gre za reakcijo N-aciliranja, kjer nukleofil R-NH₂ napade karbonilni ogljik Boc₂O. Nastane tetraedrični intermediat, ki se pretvori v stabilen ester karbaminske kisline. Istočasno lahko poteče stranska reakcija med Boc₂O in vodo, pri čemer nastaneta *t*-butanol in CO₂. Slika 14 prikazuje splošno reakcijo zaščite aminov z Boc₂O ter odščito dobljenih Boc-zaščitenih primarnih aminov (29č).

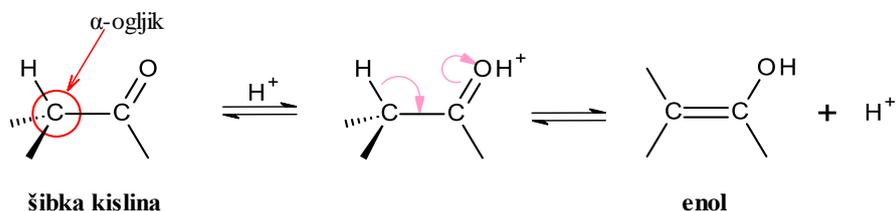


Slika 14: Zaščita primarnega amina z Boc_2O in odščita Boc-zaščitenega primarnega amina. Povzeto po (29č).

Boc-gvanidin (**2**) smo pripravili po postopku opisanem v članku (21). S počasnim dodajanjem Boc_2O reakcijski zmesi in hlajenjem smo zmanjšali možnost nastanka di-Boc produkta, ki lahko poteče zaradi prevelike območne koncentracije Boc_2O v reakcijski zmesi. Stranski reakciji smo se izognili tudi z dodatkom večje količine gvanidinijevega klorida (5 ekv.).

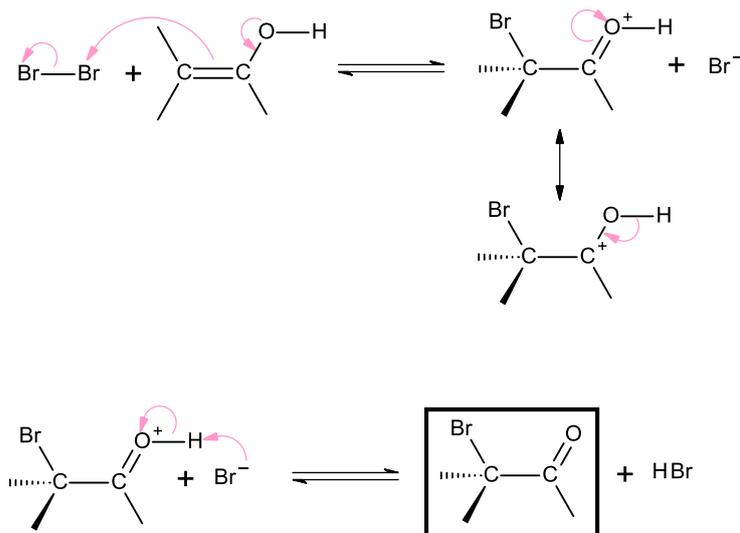
Bromiranje α -ogljika ketonov

Pri sintezi spojine **4** gre za bromiranje ketonov na α mestu. Karbonilne spojine z vodikom na α -ogljiku so šibko kisle ($\text{pK}_a \sim 20$). V prisotnosti kisline ali baze pride do enolizacije, tj. nastanka enola (Slika 15) (30).



Slika 15: Kislinsko katalizirana pretvorba keto-oblike v enol. Povzeto po (30).

Karbonilne spojine, ki vsebujejo α -vodik, lahko sodelujejo v reakcijah halogeniranja v prisotnosti baze ali kisline. Halogeniranje lahko sicer poteče tudi brez dodatka katalizatorja, saj so sledi kisline ali baze vedno prisotne, kar je dovolj za katalizo tvorbe enola ali enolatnega iona (31b). Bromiranje ketona poteče v treh stopnjah. Slika 16 prikazuje 2. in 3. stopnjo kislinsko katalizirane reakcije. V prvi stopnji kislina protonira karbonilni kisik, sledi odcep kislega protona na α -ogljiku in nastanek nukleofilnega enola (Slika 15). V drugi stopnji elektronski par enola napade brom, tvori se kationski intermedat, ki je resonančno stabiliziran z dvema oblikama. V tretji stopnji daje odcep protona z OH^+ skupine α -halogeniran produkt, istočasno pa poteče tudi regeneracija kisline (32).



Slika 16: Bromiranje ketonov na α mestu, 2. in 3. stopnja kislinsko katalizirane reakcije. Povzeto po (32).

V sintezi 3-bromo-1,1-dimetoksiopropan-2-ona smo kot topilo najprej uporabili zmes MeOH in MeCN v razmerju 1:1. Pri teh pogojih je namesto ketona nastal bromiran dimetilacetal – spojina 3-bromo-1,1,2,2-tetrametoksiopropan. Nato smo 3-bromo-1,1-dimetoksiopropan-2-on pripravili po postopku opisanem v literaturi (22), pri katerem smo za topilo vzeli tetraklorometan. Produkt smo izolirali z vakuumsko destilacijo in dobili 14,5 g spojine **4** (45 %).

Sintezo imidazola iz Boc-gvanidina in 3-bromo-1,1-dimetoksiopropan-2-ona smo izvajali v THF kot topilu. Izvedli smo sedem reakcij pri različnih temperaturnih pogojih (Tabela 1). V vseh reakcijah je nastal želen produkt, vendar so bile večinoma razlike le v časovnem poteku reakcije. Potek reakcij smo spremljali s TLC in ocenili, da je reakcija, pri kateri je nastala spojina **5**, potekla najboljše. Spojino **5** smo kasneje analizo ovrednotili in uporabili v drugi stopnji sinteze spojine **7**.

Reakcijski pogoji	Čas
refluks 80 °C	24 h
-20 °C 1,5 h → r.t. 1 h → 40 °C	6 dni
-20 °C	1,5 h
-20 °C 0,5 h → r.t.	5 dni
-20 °C → r.t.	24 h
0 °C → r.t.	24 h
MW 110 °C	10 min

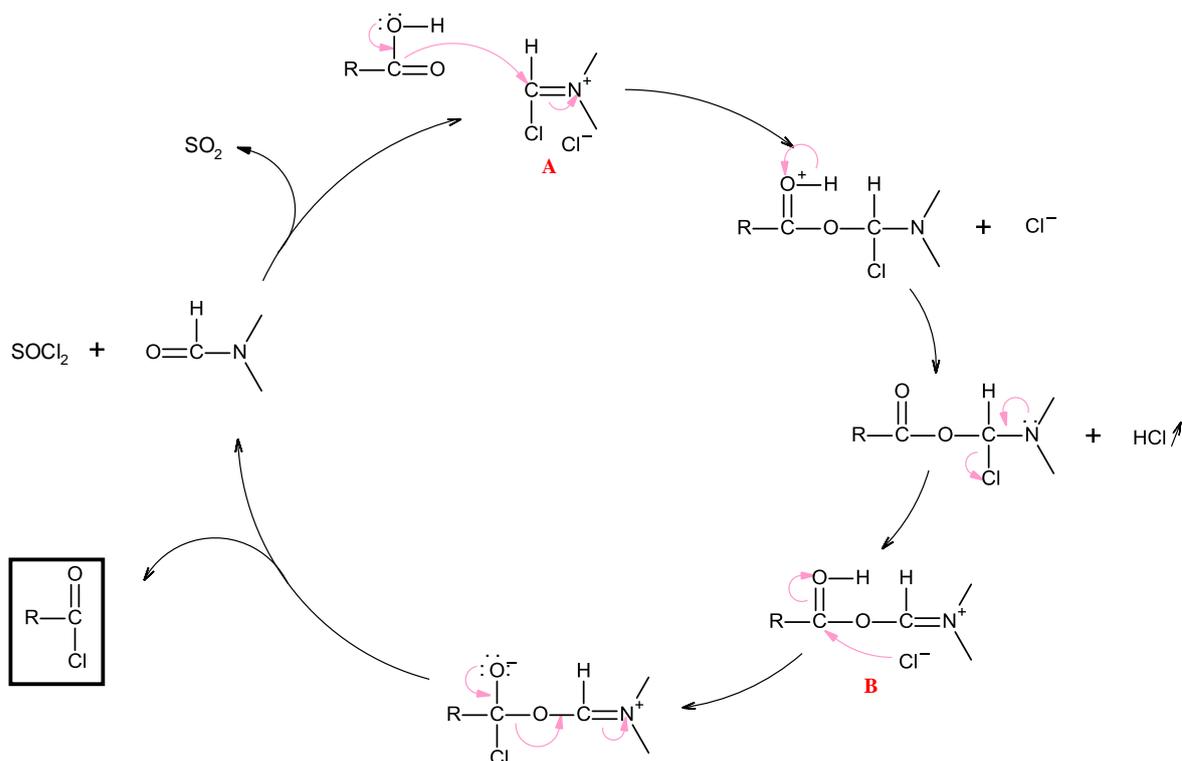
Tabela 1: Sinteza imidazola pri različnih reakcijskih pogojih.

5.1.2 SINTEZA AMIDNE VEZI

Najpogostejše metode za pripravo amidov so reakcije aminov s kislinskimi halogenidi, kislinskimi azidi, kislinskimi anhidridi, aktiviranimi estri ter sinteza s t.i. sklopitvenimi reagenti (angl. coupling reagents).

Sinteza s kislinskimi halogenidi

Pri sintezi spojine **9** smo amidno vez tvorili iz kislinskega klorida v dvostopenjski reakciji. Karboksilne kisline so slabo reaktivne spojine in zaradi slabo izstopajoče OH skupine v sintezi amida ne reagirajo kot elektrofilni. Elektrofilnost karbonilne skupine lahko povečamo z uvedbo elektron-privlačne skupine (Cl), ki je tudi dobro izstopajoča skupina. Za pretvorbo kisline v kislinski klorid smo uporabili tionil klorid (SOCl_2) z dimetilformamidom (DMF) kot katalizatorjem. Slika 17 prikazuje mehanizem z DMF katalizirane pretvorbe. SOCl_2 in DMF skupaj tvorita t.i. Vilsmeier-Haackov reagent (A). Karboksilna kislina reagira z intermedijem A po mehanizmu nukleofilne substitucije, pri kateri izstopi Cl. Produkt substitucije je mešani anhidrid B. Klorid napade karbonilni ogljik intermedijata B in pri tem nastane kislinski klorid. Istočasno poteka regeneracija katalizatorja DMF (33a).



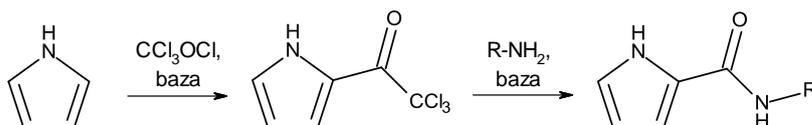
Slika 17: Mehanizem aktivacije karboksilne kisline s SOCl_2 in DMF kot katalizatorjem. Prirejeno po (33a).

Tvorbo amidne vezi spojine **9** smo izvedli v dveh stopnjah. Najprej smo sintetizirali kislinski klorid tako, da smo karboksilni kislini dodali SOCl_2 . Po poteku reakcije smo uparili topilo in katalizator DMF. V drugi stopnji tvorbe amidne vezi smo acilkloridu dodali *N*-aminorodanin. Ko je reakcija potekla, smo uparili topilo in produkt čistili s

kolonsko kromatografijo. Nato smo spojino dodatno očistili s prekrystalizacijo iz EtOH in CHCl_3 , kjer se je izoborilo 0,675 g spojine **9**.

Sinteza s triklorometil ketoni

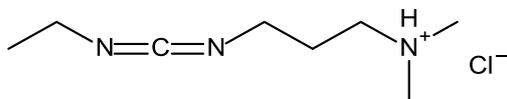
Trikloroacetilna skupina je ravno tako kot kislinski klorid aktivirana oblika karboksilne kisline. Tvorba amidne vezi poteče le med trikloroacetilno skupino in primarnimi alifatskimi amini ob prisotnosti močne baze. Slika 18 prikazuje splošno reakcijsko shemo nastanka trikloroacetil pirola in sintezo amida.



Slika 18: Reakcijska shema nastanka amidne vezi med trikloroacetilpirolom in primarnim aminom.

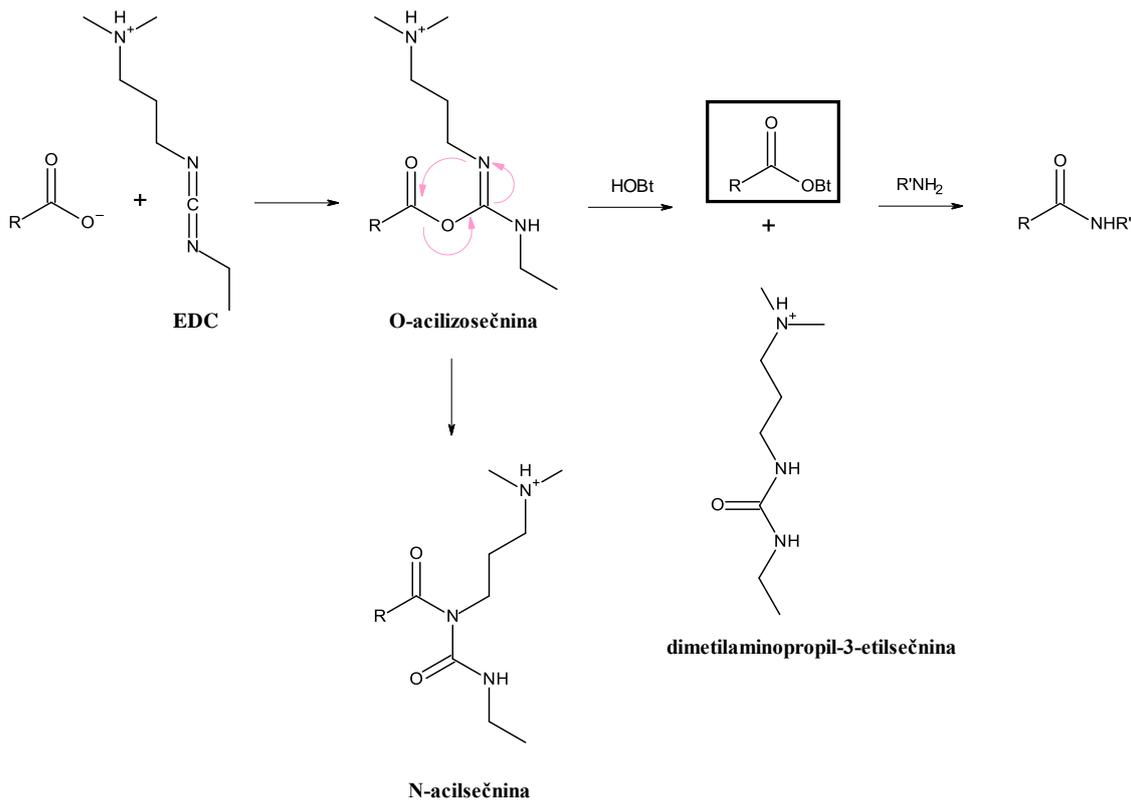
Sinteza s sklopitvenimi reagenti

1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid (Slika 19), v nadaljevanju EDC, je poleg dicikloheksil karbodiimida (DCC) eden izmed najbolj uporabljenih sklopitvenih reagentov pri sintezi peptidne vezi.



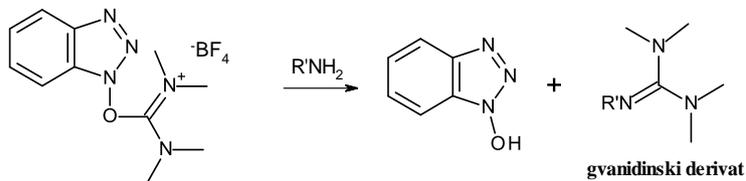
Slika 19: Kemijska struktura reagenta EDC.

Gre za t.i. »one pot« reakcijo, kjer poteče *in situ* aktivacija karboksilne kisline. EDC reagira s karboksilno kislino, pri čemer nastane kot intermediat O-acil-izosečnina. Ta nato neposredno reagira z aminom do amida in stranskega produkta, sečnine. Ob tem pogosto pride do racemizacije in prenosa acetilne skupine ter s tem nastanka nereaktivne N-acilsečnine. Stranski reakciji se lahko izognemo z ohladitvijo reakcijske zmesi na $0\text{ }^\circ\text{C}$ še preden dodamo amin. Lahko dodamo tudi DMAP ali HOBt, ki sta selektivna nukleofila in reagirata z O-acilsečnino še preden pride do prenosa acetilne skupine. DMAP in HOBt tvorita s kislino in EDC intermediat, ki je dovolj aktiviran za reakcijo z aminom. Stranski produkt dimetilaminopropil-3-etilsečnina je dobro topen v vodi in se ga znebimo s spiranjem z vodo. Slika 20 prikazuje reakcijo z dodatkom HOBt (34).



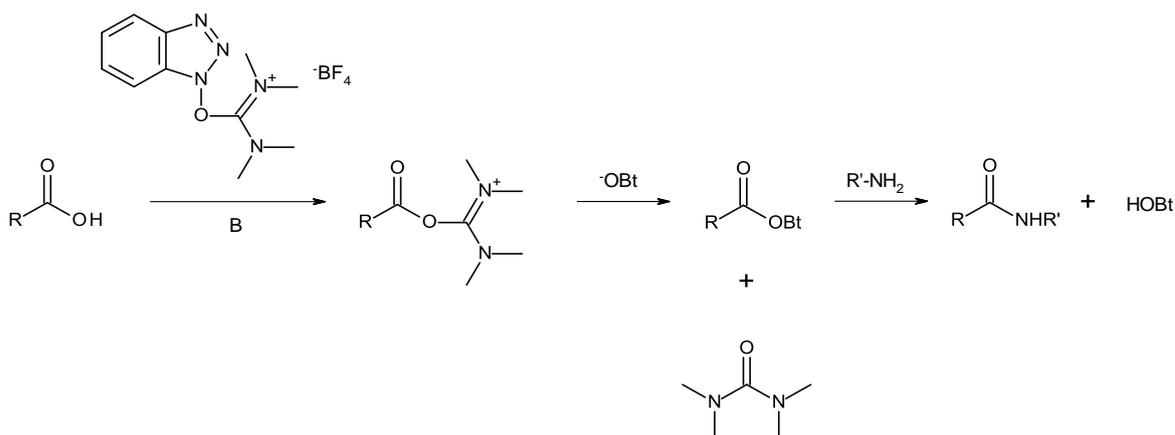
Slika 20: Aktivacija karboksilne kisline z EDC in HOBt ter stranski produkti reakcije. Prirejeno po (34).

Kot alternativo EDC, lahko uporabimo reagent 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev tetrafluoroborat (v nadaljevanju TBTU) iz skupine uronijevih soli. TBTU lahko z aminom tvori stranski produkt gvanidin (Slika 21).



Slika 21: Nastanek gvanidinskega derivata. Povzeto po (34).

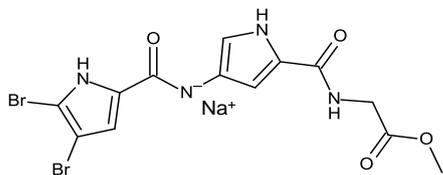
Nastanku stranskega produkta se izognemo z dodatkom HOBt. Slika 22 prikazuje reakcijo aktivacije karboksilne kisline z TBTU in posledično nastanek amidne vezi (34).



Slika 22: Sinteza peptidne vezi s sklopitvenim reagentom TBTU. Povzeto po (34).

Pri sintezi spojin z amidno vezjo (**34**, **36** in **38**) smo uporabili sklopitvena reagentna HOBt in EDC, bazo NMM ter DMF kot topilo. Reakciji sinteze spojin **36** in **38** sprva nista potekli, zato smo dodali enako količino HOBt in EDC ter še 1 ekv. DMAP. Spojine smo izolirali z ekstrakcijo v EtOAc. S spiranjem organske faze s ciktronsko kislino smo se znebili nezreagirane izhodnega amina, s spiranjem z NaOH pa izhodne kisline. V primeru spojine **34** se nam je malo le-te raztopilo tudi v citrinski kislini in NaOH, v primeru spojin **36** in **38** pa se je skoraj 30 % spojine izoborilo v citrinski kislini.

Sinteze spojine **37** smo se lotili na enak način kot je opisano zgoraj. Izolacija je potekala brez težav, vendar smo kljub temu iz $^1\text{H-NMR}$ spektra razbrali, da smo v resnici sintetizirali kislino in ne ester. Kisel vodik v NH skupini med obema piroloma se je med spiranjem z NaOH odcepil, nastala je sol in ta je prešla v vodno fazo (Slika 23). Kot kaže, je v bazični vodni fazi že med izolacijo potekla hidroliza estra. Dobili smo 117 mg kisline – spojine **40** (51 %).

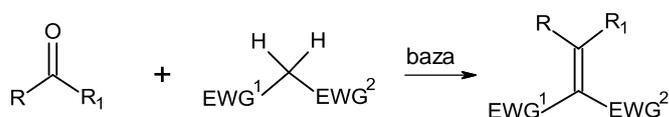


Slika 23: Natrijeva sol spojine **37**.

Spojino **37** smo nato sintetizirali s sklopitvenim reagentom TBTU. Nastalo oborino, za katero smo sklepali, da je stranski produkt – sečninski derivat, smo odfiltrirali s presesavanjem. Produkt smo nato izolirali z ekstrakcijo v EtOAc. Pri ekstrakciji smo dobili le 8 % spojine **37**. Izkazalo se je, da je tudi začetna oborina spojina **37**.

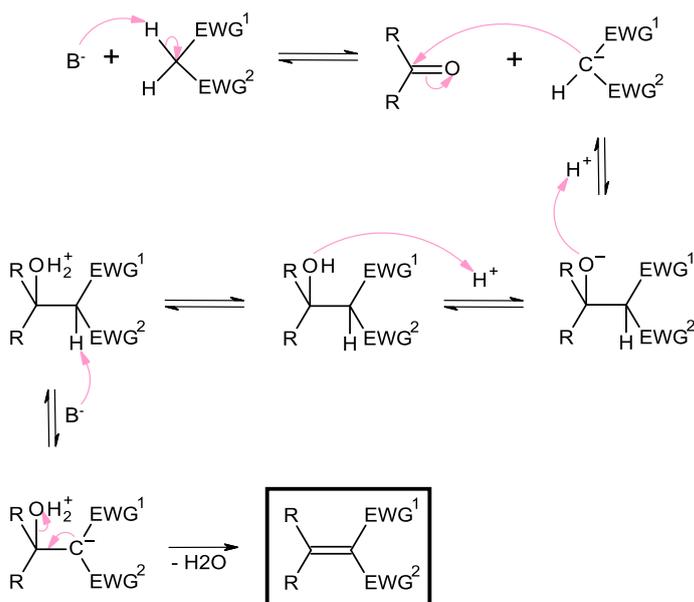
5.1.3 KNOEVENAGLOVA KONDENZACIJA

Knoevenaglova kondenzacija je reakcija kondenzacije med aktivirano metilensko skupino in karbonylna skupino aldehida ali ketona, pri čemer nastane α,β -nenasičena dikarbonylna skupina (Slika 24). Od aldolne se Knoevenaglova kondenzacija razlikuje v tem, da je aktivna metilirana skupina aktivirana z dvema elektron-privlačnima skupinama (EWG) kot so NO_2 , CN , COR , COOH , CO_2NR_2 , SO_2OR , SO_2NR_2 , SO_2R , SOR , SR , $\text{PO}(\text{OR})_2$, aril, heteroaril, ki povečata kislost α -protona. Dvojna aktivacija metilenske skupine omogoči, da lahko Knoevenaglova kondenzacija poteče pri milejših pogojih od aldolne (31c).



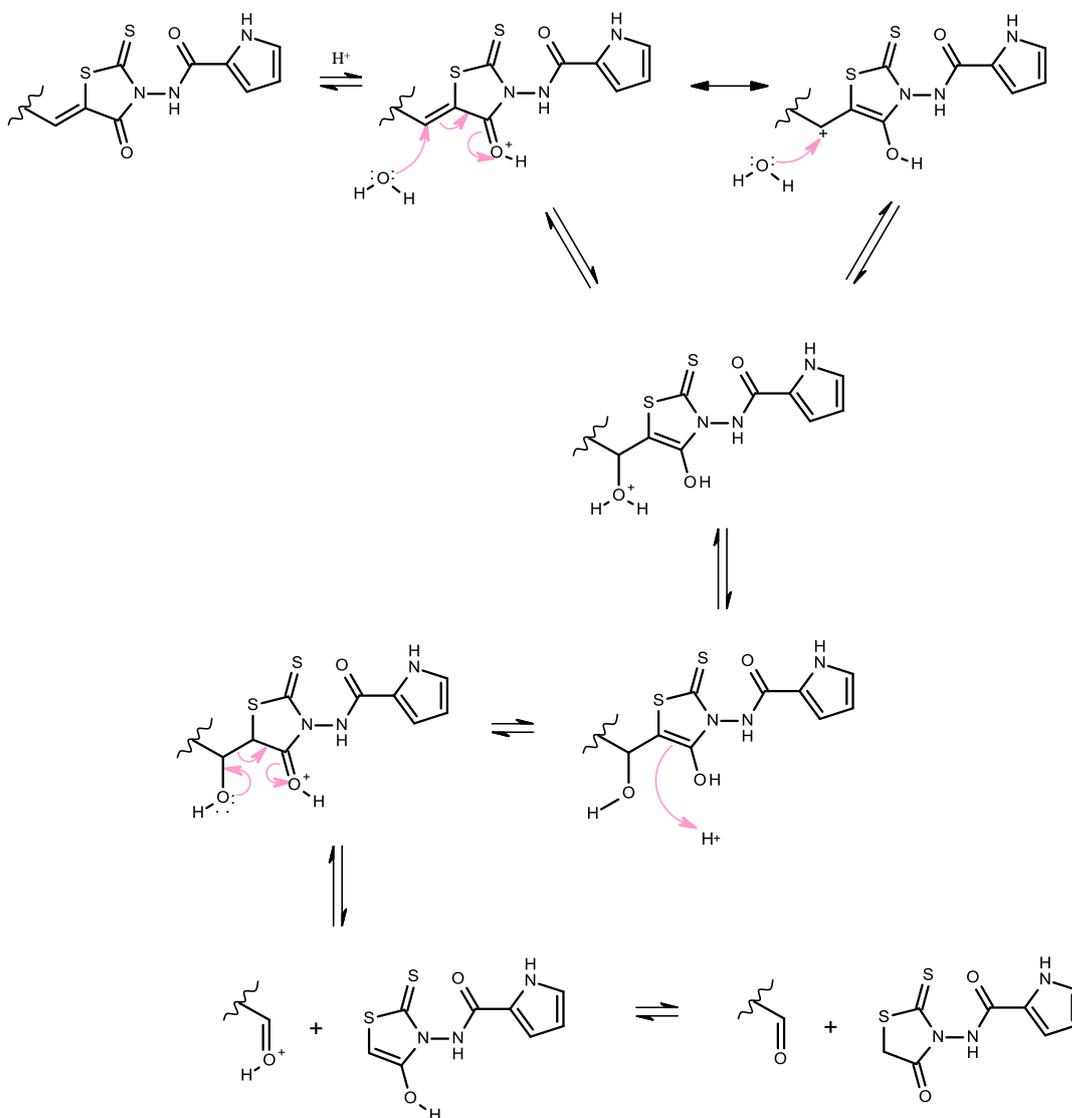
Slika 24: Splošna shema Knoevenaglove kondenzacije. Povzeto po (31c).

Knoevenaglove reakcije izvajamo v šibko bazičnem (npr. v prisotnosti piperidina) ali nevtralnem mediju (npr. kataliza z NaOAc) (33c). Baza odcepi kisel proton metilenske skupine in jo tako aktivira. Nastali karboanion nato napade elektrofilni ogljik aldehida/ketona in ob tem nastane enoladni anion. Kislina nato dvakrat protonira kisik enolatnega aniona. Zaradi odcepitev še enega kislega protona ob obeh elektron-privlačnih skupin pride do eliminacije vode in nastanka dvojne vezi (35b). Slika 25 prikazuje opisani mehanizem.

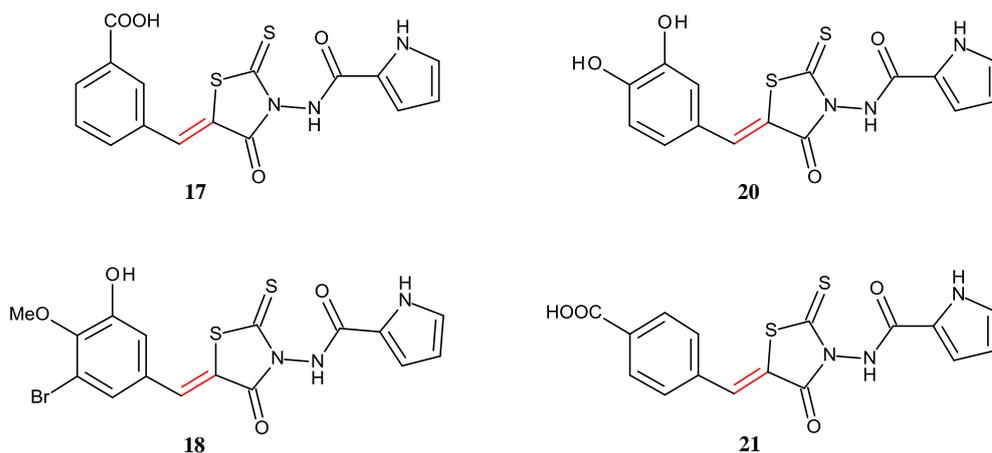


Slika 25: Mehanizem Knoevenaglove kondenzacije. Prirejeno po (35b).

Pri končnih spojinah s tiazolidinskim obročem (**17**, **18**, **20**, **21**), katerih sinteza je potekala po mehanizmu Knoevenaglove kondenzacije, so se pojavile težave s HPLC analizo le-teh. Že med pripravo vzorcev so se v topilu slabo raztapljale, na kromatogramu pa smo opazili veliko signalov, kar je sicer kazalo na nečistost spojin, vendar v NMR spektru nismo zaznali nobenih nečistot. Tako smo morali uporabiti različne HPLC metode, preden smo prišli do optimalne *Metode 5*. Težave so se najverjetneje pojavile zato, ker končne spojine delujejo kot Michaelovi akceptorji in lahko reagirajo s topili. Sklepamo, da je prišlo do reakcije med dvojno vezjo in vodo ter s tem do ponovnega nastanka izhodnih spojin. Slika 26 prikazuje mehanizem reakcije med dvojno vezjo Michaelovega akceptorja in vodo. Slika 27 pa prikazuje spojine **17**, **18**, **20** in **21**, ki bi lahko delovale kot Michaelovi akceptorji.



Slika 26: Reakcija dvojne vezi z vodo do nastanka alhida in N-(4-okso-2-tiokso-tiazolidin-3-il)-1H-pirol-2-karboksamida. Prirejeno po (36).



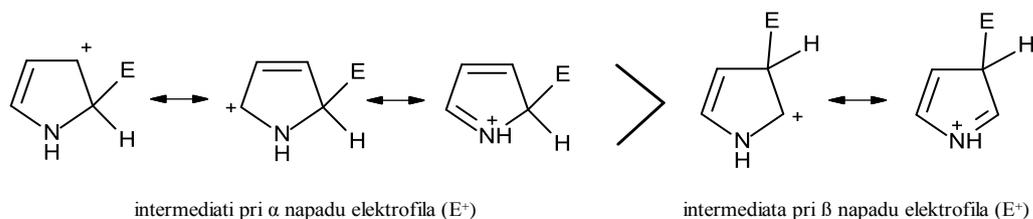
Slika 27: Michaelovi akceptorji.

5.1.4 UVAJANJE NITRO SKUPINE NA PIROL

Večino aromatskih spojin tako z visoko kot nizko reaktivnostjo lahko nitriramo, saj imamo na voljo več različnih reagentov. Za nitiranje benzena, enostavnih alkilbenzenov in heterocikličnih aromatskih spojin največkrat uporabimo mešanico koncentrirane dušikove (V) kisline (v nadaljevanju HNO_3) in žveplove (VI) kisline. Reakcijo nitiranja visoko reaktivnih spojin ali spojin občutljivih na kisle pogoje pa izvajamo s HNO_3 , HNO_3 v vodi, očetni kislini, acetanhidridu ali kloroformu (31a). Slika 28 prikazuje reakcijo nastanka šibkega elektrofilnega reagenta AcONO_2 , ki nastane, če HNO_3 raztopimo v acetanhidridu (37). Mili pogoji so nujni pri reaktivnih spojinah (aminih, fenolih, pirolih), saj bi pri reakciji z močnimi kislinami prišlo do oksidacije teh substratov in nadaljne polimerizacije (31a, 38).

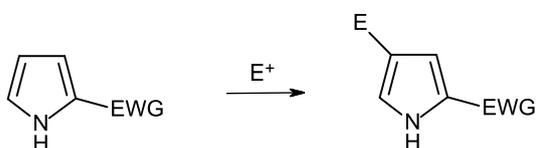
Slika 28: Enačba reakcije nastanka šibkega elektrofilnega reagenta AcONO_2 . Povzeto po (37).

Nitiranje pirola poteka po mehanizmu elektrofilne aromatske substitucije. Najprej poteče elektrofilna adicija na aromatskem ogljiku, sledi eliminacija H. Nitiranje nesubstituiranega pirola s šibkim elektrofilnim reagentom (AcONO_2) favorizira produkt z NO_2 na mestu 2. Substitucija na C2 atomu daje stabilnejše intermedie (stabiliziran s tremi resonančnimi strukturami) od intermedieata s substitucijo na C3 atomu (stabiliziran le z dvema resonančnima strukturama) (Slika 29).



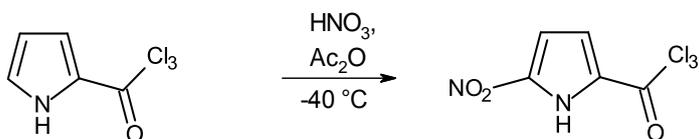
Slika 29: Prikaz resonančnih struktur intermedija elektrofilne aromatske substitucije na pirolu z elektrofilom vezanim na mestih 2 ali 3. Povzeto po (39).

Močno elektron-privlačna skupina na pirolu lahko spremeni regioselektivnost napada elektrofila. Ker ima elektron-privlačna skupina na mestu 2 deaktivacijske lastnosti in selektivno usmerja na *meta* mesto, nastane v reakciji spojina z NO_2 skupino na mestu 4 na pirolnem obroču (Slika 30) (39).



Slika 30: Usmerjanje elektron-privlačne skupine na mesto 4. Prirejeno po (38).

Nitriranje pirola z elektron-privlačno skupino na C2 torej lažje poteče na mestu 4. Ker gre za močno eksotermno reakcijo, je potrebno reakcijsko zmes ohladiti na nizke temperature, pod takimi pogoji pa nastane več 5-produkta (38). V literaturi so ugotovili, da lahko s spreminjanjem temperature vplivamo na regioselektivnost reakcije. Trikloroacetil pirol so nitrirali z HNO_3 v Ac_2O pri $-40\text{ }^\circ\text{C}$ in dobili 5-nitro regioizomer kot glavni produkt z 61 % izkoristkom (Slika 31), pri višjih temperaturah so dobili zmes 4-nitro in 5-nitro regioizomerov, vendar izkoristka nista bila definirana (23, 40).



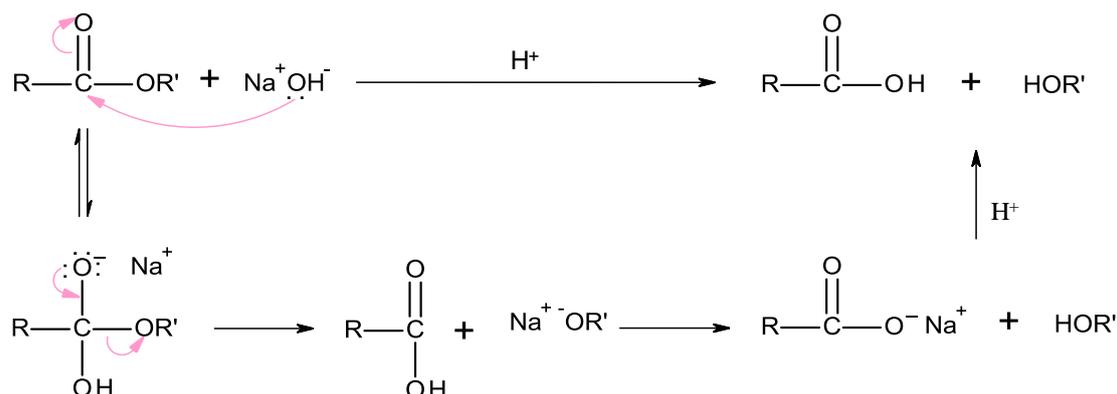
Slika 31: Reakcija nastanka 5-nitro regioizomera. Povzeto po (23).

Reakcijo nitriranja, katere produkta sta bili spojini **23** in **24**, smo izvajali pri temperaturi $-20\text{ }^\circ\text{C}$, ki se je čez noč dvignila na sobno temperaturo. Reakcija pri tej temperaturi favorizira nastanek 4-nitro produkta z izkoristkom 52 %, saj je bil izkoristek 5-nitro produkta le 26 %. Produkta smo ločili z kolonsko kromatografijo (MF: Hex/EtOAc = 1/1). Najprej se je eluiral 5-nitro produkt, nato pa 4-nitro spojina.

5.1.5 HIDROLIZA ESTRA DO KARBOKSILNE SKUPINE

Hidroliza estrov je lahko kislinsko ali bazično katalizirana (33b). Običajno izvajamo hidrolizo estrov v bazičnih pogojih. Termin alkalno katalizirana hidroliza estra ni povsem pravilen, saj karboksilna kislina, ki nastane, protonira ves ekvivalent baze in baza se kot katalizator ne regenerira. Drugo ime za alkalno hidrolizo estrov je tudi saponifikacija in daje kot produkt kislino v obliki soli. V primerih, ko je spojina občutljiva na alkalne pogoje, uporabimo kislinsko katalizo. Hidroliza estrov samo v vodi ne poteče, saj je OR slabo izstopajoča skupina (31č).

Alkalna hidroliza je primer nukleofilne substitucije na karbonilnem ogljiku, kjer pride do cepitve vezi karbonil-kisik (B_{AC}2 mehanizem, kjer B pomeni bazično uravnana hidroliza, AC definira cepitev karbonil-kisik vezi, številka 2 pa 2. red reakcije) (33). OH nukleofil napade karbonilni ogljik estra, cepi se π-vez in nastane tetraedrični intermediat. Nestabilen intermediat nato razpade in izstopi OR'. Nastala kislina protonira alkoksidni ion, ki reagira kot baza, kar vodi do nastanka soli in alkohola (Slika 32) (29b, 31č, 33b).



Slika 32: B_C2 mehanizem bazično uravnane hidrolize karboksilnega estra. Povzeto po (33b).

Odščitno estrov spojin **35**, **39**, **41** smo izvedli v bazičnih pogojih. Uporabili smo močno bazo 1M LiOH, kot topilo pa mešanico vode in THF. Z uporabo mešanice anorganskega in organskega topila omogočimo boljši stik med reagentoma, saj je en reagent dobro topen v organski fazi drugi pa v vodni, zato reakcija lažje poteče.

5.1.6 REDUKCIJA NITRO SKUPINE DO AMINA

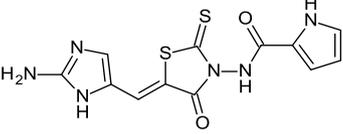
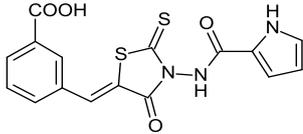
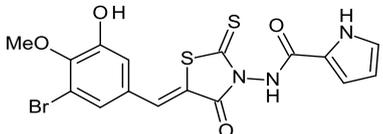
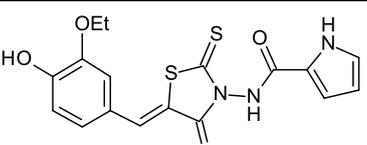
Katalitsko hidrogeniranje običajno uporabljamo za hidrogenacijo alkinov do z-alkenov, hidrogenacijo alkenov do alkanov, redukcijo nitro do amino skupine in hidrogenolizo benzilnih estrov, etrov, aminov ter benzil karbamatov. Najuporabnejša metoda za redukcijo nitro skupine je prav katalitsko hidrogeniranje (29a, 29c). Le-to

običajno poteka v vodikovi atmosferi, kjer kot katalizator uporabimo Pd ali Pt na trdnem mediju, fino uprašenem ogljiku. Take katalizatorje imenujemo skeletni katalizatorji, ki imajo zaradi številnih por veliko specifično površino. Vodik se adsorbira na površino katalizatorja in slednji cepi vez H-H (35a). Adicija vodika običajno poteče hitro in z visokimi izkoristki. Ker je reakcija močno eksotermna, vzdržujemo nizko temperaturo.

Spojino **32** smo sintetizirali z 92 % izkoristkom po predpisu 4.2.13 v poglavju Sintezni postopki in rezultati analiz (4.2). Potek reakcije smo spremljali s TLC (MF: DKM/MeOH = 9/1). Po 1,5 ure, ko je reakcija popolnoma potekla, smo poskušali spojino očistiti s prekristalizacijo, in sicer iz petih različnih topil (EtOAc, dietil eter, kloroform, DKM in Hex). Produkt se nam ni izoboril v nobenem izmed izbranih topil, zato smo vse faze združili in uparili topila.

5.2 SEZNAM KONČNIH SPOJIN TER KOMENTAR BIOLOŠKEGA TESTIRANJA

V magistrski nalogi smo sintetizirali deset končnih spojin, katere smo testirali na zaviranje giraze B bakterije *E. coli*. Tabela 2 prikazuje seznam spojin in rezultate biološkega testiranja.

Struktura končne spojine in njena oznaka	RA [%]	IC ₅₀ [μM]
11 	neaktivna	neaktivna
17 	91 (100 μM); 112 (10 μM)	neaktivna
18 	69 (100 μM); 64 (10 μM)	ni bila določena
19 	58 (100 μM); 76 (10 μM)	neaktivna

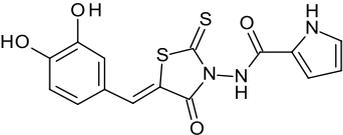
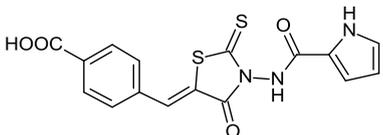
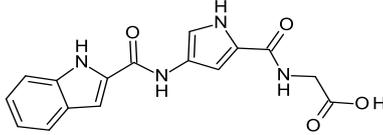
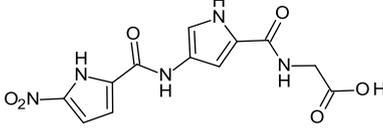
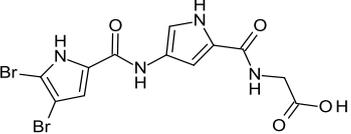
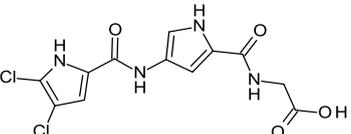
Struktura končne spojine in njena oznaka	RA [%]	IC ₅₀ [μM]
20 	90 (100 μM); 52 (10 μM)	ni bila določena
21 	66 (100 μM); 56 (10 μM)	ni bila določena
35 	96 (100 μM); 126 (10 μM)	neaktivna
39 	neaktivna	neaktivna
40 	13 (100 μM); 57 (10 μM)	61,3 μM
41 	neaktivna	neaktivna

Tabela 2: Seznam spojin in rezultati testiranja na zaviranje giraze B *E. coli*. RA pomeni rezidualno aktivnost. 100% - ni inhibicije, 0% - popolna inhibicija. IC₅₀ pomeni srednjo inhibitorno koncentracijo.

Poleg končnih spojin smo testirali tudi njihove zaščitene derivate, ki so bili prav tako neaktivni. Z rezultati smo ugotovili, da tiazolidinski obročni sistem ni primeren kot distančnik, saj so bile vse spojine z omenjenim obročem neaktivne. Neaktivni so bili tudi vsi derivati 1H-pirol-3-amina, razen spojine **40**. Ta je izkazovala zelo šibko inhibicijo giraze B bakterije *E. coli* (IC₅₀ = 61,3 μM). Spojino **40** smo nato testirali še na inhibicijo giraze B bakterije *S. aureus* ter na inhibicijo topoizomeraze IV bakterijskih sevov *E. coli* in *S. aureus*. Spojina na teh sevih ni bila aktivna. Aktivnost spojine **40** smo poskusili potrditi še s testom površinske plazmonske resonance (angl. Surface Plasmon Resonance, SPR), ki jo uporabljamo za karakterizacijo intermolekularnih interakcij (19). Rezultati SPR meritev so pokazali, da spojina **40** agregira. Visoka disociacijska konstanta (K_d = 708 μM)

nakazuje, da je vezava na encim bistveno šibkejša kot smo jo prvotno izmerili oz. je ta neselektivna. Tabela 3 prikazuje rezultate encimske aktivnosti in SPR testa. Rezultati *in vitro* testiranja protibakterijske aktivnosti na bakterijah *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis* in *P. aeruginosa* so pokazali, da spojina **40** nima zaznavnega protibakterijskega delovanja.

Tabela 3:
Rezultati testiranja spojine **40**.

<i>E. coli</i> giraza B	<i>S. aureus</i> giraza B RA [%]	<i>E. coli</i> topoizomeraza IV RA [%]	<i>S. aureus</i> topoizomeraza IV RA [%]
IC ₅₀ = 61,3 μM	120 (100 μM); 84 (10 μM)	101 (100 μM); 101 (10 μM)	104 (100 μM); 105 (10 μM)
SPR (K_d): 708 μM			

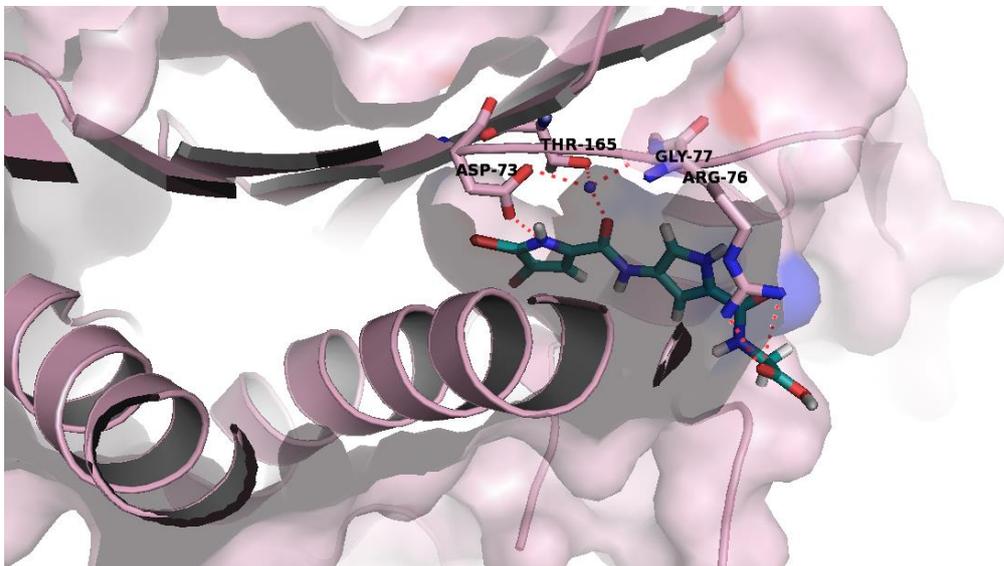
5.3 MOLEKULSKO MODELIRANJE

Pri sidranju (angl. docking) gre za sidranje molekule v tarčo, katere tridimenzionalno strukturo poznamo. Strukturo tarče, ki ima že vezan ligand, običajno poiščemo v RCSB Protein Data Bank. Sidranje poteka tako, da program najprej postavi spojino v aktivno mesto, sledi ocena vezavnih energij. Program kasneje razporedi različne načine vezave spojine od tiste, ki tvori največ interakcij z aktivnim mestom do tiste, ki tvori najmanj. Temu lahko sledi sinteza izbranih spojin ter *in vitro* testiranje.

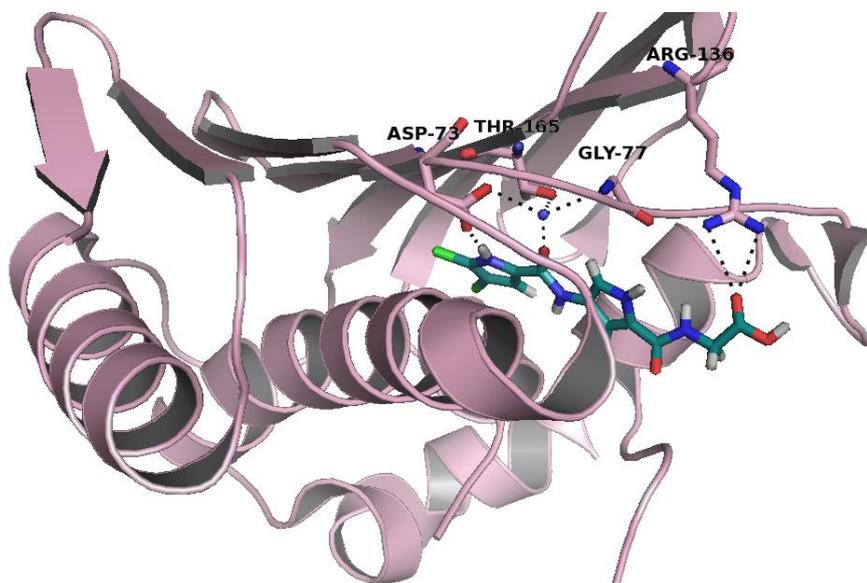
Kristalna struktura giraze B bakterije *E. Coli*, ki smo jo uporabili za sidranje, se nahaja v Protein Data Bank pod imenom 4DUH. V aktivnem mestu ima vezan 4,5'-bitiazolni derivat, katerega smo pri načrtovanju spojin vzeli kot izhodišče. Končne spojine je v aktivno mesto giraze B sidral asist. dr. Rok Frlan, mag. farm. s programom paketa *OpenEye Scientific Software*.

Za zaviralno delovanje na encim GyrB je potrebno, da spojina tvori vodikovi vezi z Asp73 ter vodo, ki je koordinirana z Asp73, Gly77 in Thr165. Potrebne so hidrofobne interakcije z rigidnim distančnikom in zapolnitev hidrofobnega žepa. Dodatna vodikova vez z Arg136 pripomore k močnejšemu delovanju, k močnejši vezavi pa dodatno prispeva H-vez z Gly101.

Spojini **40** in **41** tvorita H-vezi z Asp73 in vodo. Spojina **41** tvori dodatno vez z Arg136 za razliko od spojine **40**, ki tvori interakcije z Arg76. Sklepali bi, da bo spojina **41** zaradi interakcije z Arg136 in boljšega prileganja v aktivnem mestu GyrB bolj učinkovita od spojine **40**. Nobena od spojin ne tvori interakcij z Gly101 (Slika 33, Slika 34).



Slika 33: Spojina **40** v aktivnem mestu GyrB.



Slika 34: Spojina **41** v aktivnem mestu GyrB.

Substituent glicin, ki je vezan na mestu 5 pirolnega obroča, je verjetno predolg in bi ga bilo potrebno zamenjati s krajšim akceptorjem vodikove vezi, ki bi lahko tvoril močnejše interakcije z Arg136.

6 SKLEP

Sintetizirali smo deset potencialnih protimikrobnih učinkovin z zaviralnim delovanjem na encim DNA girazo B, in sicer šest derivatov 3-amino-2-tioksotiazolidin-4-ona (sp. **11**, **17**, **18**, **19**, **20** in **21**) in štiri derivate 1H-pirol-3-amina (sp. **35**, **39**, **40** in **41**).

- Na potek reakcije in posledično strukturo produkta pri sintezi substituiranega imidazola lahko vplivamo predvsem z izbiro pravilne zaščitne skupine na gvanidinu. Za sintezo imidazola s prosto amino skupino smo zato uporabili Boc-gvanidin.
- Pri sintezi z estrom zaščitenih derivatov končnih spojin **34**, **36**, **37** in **38** so se pojavile težave pri izolaciji le-teh. Nekaj spojine **34** se nam je raztopilo pri spiranju z NaOH in citrsko kislino, spojine **36**, **37** in **38** pa so se nam pri spiranju s citrsko kislino izoborile.

Spojina **40**, ki smo jo pripravili po istem sinteznem postopku kot spojini **36** in **38**, nam je pri ekstrakciji hidrolizirala do kisline. Spojine s kislim protonom lahko pri spiranju z NaOH hitro tvorijo sol in preidejo v vodno fazo, kjer poteče hidroliza estra.

- Končne spojine s tiazolidinskim obročem lahko reagirajo kot Michaelovi akceptorji, zato smo tudi imeli težave pri izbiri HPLC metode.
- Od reakcijskih pogojev, t.j. temperature pri reakciji nitriranja pirola, je odvisno kateri substituiran produkt bo nastal. Pri $T = -40\text{ }^{\circ}\text{C}$ nastane več 5-nitro produkta. Pri $T > -40\text{ }^{\circ}\text{C}$ pa se povečuje procent 4-nitro produkta.
- Vse končne spojine, ki smo jih testirali na girazi B *E. coli*, so bile neaktivne razen spojine **40**, ki je derivat 1H-pirol-3-amina. Spojino **40** smo testirali še na girazi bakterijskega seva *S. aureus* in na topoizomerazi IV *E. coli* ter *S. aureus*, kjer se je prav tako izkazala za neaktivno. Da se spojina **40** veže neselektivno na encim je potrdil test SPR.
- Spojina **41** se je izkazala za neaktivno, vendar se je pri molekularnem sidranju bolje prilegala aktivnemu mestu v primerjavi z aktivno spojino **40**.
- Pri nadaljnjem načrtovanju potencialnih zaviralcev giraze B predlagamo ohranitev 1H-pirol-3-amina kot rigidnega distančnika. Glicinski substituent na mestu 5 bi bilo priporočljivo zamenjati s krajšo verigo z akceptorjem vodikove vezi. Potrebno bi

bilo uvesti še en donor vodikove vezi na pirolnem obroču, ki bi tvoril interakcije z Gly101 in s tem pripomogel k močnejši vezavi spojine v aktivno mesto.

Dobljeni rezultati nam povedo, da lahko z molekulskim modeliranjem le napovemo afiniteto vezave liganda v aktivnem mestu proteina, ne moremo pa trditi, da bo sintetizirana spojina tudi biološko aktivna.

7 LITERATURA

1. Kar A.: *Medicinal Chemistry*, 4th ed., New Age International, New Delhi, 2007: 735-79.
2. de J. Sosa A, Byarugaba DK, Amabile C, Hsueh PR, Kariuki S, Okeke IN: *Antimicrobial Resistance in Developing Countries*, Springer, New York, 2009: 15-26.
3. Walsh C: Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature* **2000**; *406*: 775-81.
4. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA: *Medical Microbiology*, 7th ed., Elsevier/Saunders, Philadelphia, 2013: 165-73.
5. Patrick GL: *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 4th ed., OUP Oxford, New York, 2009: 454-5.
6. http://ecdc.europa.eu/sl/eaad/Documents/Primary%20care%20-%20Factsheet_SLO.PDF, dostopano junij 2014
7. Tenover FC: Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am J Med* **2006**; *119*: S3-S10.
8. Alekshun MN, Levy SB: Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* **2007**; *128*: 1037-50.
9. Wright GD: Bacterial resistance to antibiotics: Enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev* **2005**; *57*: 1451-70.
10. Lukač-Bajalo J, Štrukelj B: *Osnove farmacevtske biotehnologije*, Fakulteta za f, Ljubljana, 2003: 7.
11. Tortora GJ, Funke BR, Case CL: *Microbiology: An Introduction*, 11th ed., Pearson, 2013: 579-85.
12. Scott G: Antibiotic resistance. *Medicine* **2009**; *37*: 551-6.
13. Reece RJ, Maxwell A, Wang JC: DNA Gyrase: Structure and Function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **1991**; *26*: 335-75.
14. Sharma A, Mondragón A: DNA topoisomerases. *Curr Opin Struct Biol* **1995**; *5*: 39-47.
15. Tomašić T, Mašič LP: Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Curr Top Med Chem* **2014**; *14*: 130-51.

16. Gubaev A, Klostermeier D: DNA-induced narrowing of the gyrase N-gate coordinates T-segment capture and strand passage. *PNAS* **2011**; *108*: 14085-90.
17. Brvar M, Perdih A, Oblak M, Mašič LP, Solmajer T: In silico discovery of 2-amino-4-(2,4-dihydroxyphenyl)thiazoles as novel inhibitors of DNA gyrase B. *Bioorg Med Chem Lett* **2010**; *20*: 958-62.
18. Lambert PA: Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Adv Drug Deliv Rev* **2005**; *57*: 1471-85.
19. Brvar M, Perdih A, Renko M, Anderluh G, Turk D, Solmajer T: Structure-Based Discovery of Substituted 4,5'-Bithiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors. *J Med Chem* **2012**; *55*: 6413-26.
20. http://www.inspiralis.com/files/e_coli_gyrase_plate_kit.pdf, dostopano maj 2014
21. Schmuck C, Bickert V, Merschky M, Geiger L, Rupprecht D, Dudaczek J, et al: A Facile and Efficient Multi-Gram Synthesis of N-Protected 5-(Guanidinocarbonyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic Acids. *Eur. J. Org. Chem* **2008**; *2008*: 324-9.
22. Ando N, Terashima S: A novel synthesis of the 2-amino-1H-imidazol-4-carbaldehyde derivatives and its application to the efficient synthesis of 2-aminoimidazole alkaloids, oroidin, hymenidin, dispacamide, monobromodispacamide, and ageladine A. *Tetrahedron* **2010**; *66*: 6224-37.
23. Schmuck C, Dudaczek J: New guanidinium-based carboxylate receptors derived from 5-amino-pyrrole-2-carboxylate: synthesis and first binding studies. *Tetrahedron Lett* **2005**; *46*: 7101-5.
24. Rane RA, Bangalore P, Borhade SD, Khandare PK: Synthesis and evaluation of novel 4-nitropyrrole-based 1,3,4-oxadiazole derivatives as antimicrobial and anti-tubercular agents. *Eur J Med Chem* **2013**; *70*: 49-58.
25. Rinkes IJ: Untersuchungen über Pyrrolderivate. 1. Mitteilung. *Recl Trav Chim Pays-Bas* **1934**; *53*: 1167-74.
26. Wang MZ, Xu H, Liu TW, Feng Q, Yu SJ, Wang SH, et al: Design, synthesis and antifungal activities of novel pyrrole alkaloid analogs. *Eur J Med Chem* **2011**; *46*: 1463-72.
27. Little LT, Webber ES: A Simple and Practical Synthesis of 2-Aminoimidazoles. *J Org Chem* **1994**; *59*: 7299-305.
28. Nantz M, Zweifel G: *Modern Organic Synthesis: An Introduction*, W. H. Freeman, New York, 2007: 60.

29. Solomons TWG, Fryhle C, Snyder S: *Organic Chemistry*, 11th ed., Wiley Global Education, 2012: (a) 318-9, (b) 790-1, (c) 911, (č) 1081.
30. Carey FA, Sundberg RJ: *Advanced Organic Chemistry: Part A: Structure and Mechanisms*, 5th ed., Springer, 2007: 601.
31. Smith MB: *March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure*, 7th ed., Wiley, New Jersey, 2013: (a) 593, (b) 671, (c) 1157, (č) 1190-1.
32. McMurry J: *Organic Chemistry*, 7th ed., Thomson, 2008: 846-8.
33. Bruckner R, Harmata M: *Organic Mechanisms: Reactions, Stereochemistry and Synthesis*, Springer, Berlin Heidelberg, 2010: (a) 275-7, (b) 287-290, (c) 571.
34. Montalbetti CAGN, Falque V: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**; *61*: 10827-52.
35. Hathaway BA: *Organic Chemistry the Easy Way*, Barron's Educational Series, 2006: (a) 78-9, (b) 273-5.
36. <http://instruct.uwo.ca/chemistry/373f/Nifty%20Stuff/Michael%20Reaction.htm>, dostopano september 2014
37. Hoggett JG: *Nitration and Aromatic Reactivity*, Cambridge University Press, 1971: 79-82.
38. Tanemura K, Suzuki T, Nishida Y, Satsumabayashi K, Horaguchi T: A mild and efficient method for the mononitration of aromatic compounds by cerium (III) ammonium nitrate in acetic anhydride. *J. Chem. Res* **2003**; *2003*: 497-9.
39. Joule JA, Mills K: *Heterocyclic Chemistry At A Glance*, Wiley-Blackwell, 2007: 50-1.
40. Marques MA, Doss RM, Urbach AR, Dervan PB: Toward an Understanding of the Chemical Etiology for DNA Minor-Groove Recognition by Polyamides. *Helv. Chim. Acta* **2002**; *85*: 4485-517.