

UNIVERZA V LJUBLJANA
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA NEMEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANA
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KRISTINA NEMEC

**SINTEZA DERIVATOV 4-AMINO-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDA S
POTENCIJALNIM ZAVIRALNIM DELOVANJEM NA GIRAZO B**

**SYNTHESIS OF 4-AMINO-1H-PYRROLE-2-CARBOXAMIDE DERIVATIVES
WITH POTENTIAL INHIBITORY ACTIVITY ON GYRASE B**

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko 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 bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani in na inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Biološka testiranja so bila opravljena na Fakulteti za farmacijo.

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Danijelu Kiklju in asist. dr. Roku Frlanu za vso strokovno pomoč in nasvete pri magistrski nalogi. Iskrena hvala tudi družini in vsem bližnjim.

Izjava

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

Ljubljana, 2015

Kristina Nemeč

VSEBINA

1	UVOD.....	1
1.1	Kemoterapevtiki.....	1
1.2	Topoizomeraze.....	3
1.2.1	Topoizomeraze tipa I.....	4
1.2.2	Topoizomeraze tipa II.....	5
1.3	Inhibitorji topoizomeraz tipa II.....	6
1.3.1	Zavralci giraze A	7
1.3.2	Zavralci giraze B	9
2	NAČRT DELA	13
3	MATERIALI IN METODE	16
3.1	Materiali.....	16
3.2	Metode	16
4	EKSPERIMENTALNO DELO	18
4.1	Sinteza pirolnih derivatov	18
4.1.1	Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4-nitro-1 <i>H</i> -pirol-2-il)-1-etanona (23a) in 2,2,2-trikloro-1-(5-nitro-1 <i>H</i> -pirol-2-il)-1-etanona (23b)	19
4.1.2	Sinteza 4-nitro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline (24) in 4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline (32)	19
4.1.3	Sinteza metil 4-nitro-1- <i>H</i> -pirol-2-karboksilata (25) in metil 5-nitro-1- <i>H</i> -pirol-2-karboksilata (29).....	20
4.1.4	Sinteza metil 4-amino-1- <i>H</i> -pirol-2-karboksilata (26), metil 4-amino-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilata (28) in metil 5-amino-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilata (30)	21
4.1.5	Sinteza metil 1-metil-4-nitro-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilata (27)	21
4.1.6	Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)-1-etanon (31).....	22

4.2 Sinteza serinskih derivatov 4-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida: spojini <u>38</u> in <u>21</u>	23
4.2.1 Sinteza metilnega estra L-serina (<u>33</u>).....	24
4.2.2 Sinteza metil 3-hidroksi-2-[(4-nitro-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]propionata (<u>34</u>)	24
4.2.3 Sinteza metil 2-[(4-amino-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]-3-hidroksipropionata (<u>35</u>)	25
4.2.4 Sinteza metil 4-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilata (<u>36</u>)	26
4.2.5 Sinteza 4-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline (<u>37</u>)	26
4.2.6 Sinteza metil 2-((4-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino)-3-hidroksipropionata (<u>38</u>)	27
4.2.7 Sinteza 2-((4-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino)-3-hidroksipropionske kisline (<u>21</u>)	28
4.3 Sinteza glicinskega derivata 4-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida: spojina <u>39</u>	29
4.4 Sinteza glicinskih derivatov 4-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida: spojini <u>42</u> in <u>43</u>	30
4.4.1 Sinteza metil 4-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilata (<u>40</u>)	31
4.4.2 Sinteza 4-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline (<u>41</u>)	32
4.4.3 Sinteza metil ((4-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino)etanoat (<u>42</u>)	32
4.4.4 Sinteza ((4-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino)etanojska kislina (<u>43</u>)	33
4.5 Poskus sinteze serinskih derivatov 5-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida: spojini <u>45</u> in <u>46</u>	34

4.5.1 Sinteza metil 5-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilata (44)	34
4.5.2 Poskus sinteza 5-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksilne kisline (45)	35
4.6 Poskus sinteze 2-aminobenzoatnih derivatov 4-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)-karbonilamino]-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida: spojini 50 in 51	36
4.6.1 Sinteza metil 2-aminobenzoata (48)	36
4.6.2 Poskus sinteze metil 2-[(4-nitro-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamino]benzoata (49)	37
4.7 Poskus sinteze 3-aminobenzoatnih derivatov 4-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)-karbonilamino]-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida: spojin 53 in 22	38
4.7.1 Sinteza metil 3-[(4-nitro-1 <i>H</i> -pirol-2-il)-karbonilamino]benzoata (52)	38
4.7.2 Sinteza metil 3-[(4-amino-1 <i>H</i> -pirol-2-il)-karbonilamino]benzoata (53)	39
4.7.3 Poskus sinteze metil 3-({4-[(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-il)karbonilamido]-1 <i>H</i> -pirol-2-il})karbonilamino)benzoata (54)	40
4.8 Poskus sintez cikličnih oblik 4-amino-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamidnega ogrodja	40
4.8.1 Poskus sinteze metil 7-nitro-1-okso-1,2,3,4-tetrahidropirolo[1,2-a]pirazin-3-karboksilata (55)	40
4.8.2 Poskus sinteze metil 11-nitro-1-okso-2,3,4,5,7,8-heksahidro-1 <i>H</i> -pirolo[1,2-d][1,4,8]okсадиазецин-4-karboksilata (57)	41
4.8.3 Poskus sinteze metil 3-(7-nitro-1-okso-3,4-dihidropirolo[1,2-a]pirazin-2(1 <i>H</i>)-il)benzoata (59)	42
5 REZULTATI IN RAZPRAVA	43
5.1 Razprava sinteznih postopkov	43
5.2 Biološka testiranja	53
6 SKLEP	54
7 LITERATURA	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Mehanizem cepitve in ligacije DNK verige s topoizomerazami tipa I (11).....	4
Slika 2: Predlagani mehanizem katalitskega delovanja topoizomeraz II. Podenoti topoizomeraze II z ATP-azno aktivnostjo sta označeni z zeleno barvo, podenoti z aktivnim mestom za cepitev DNK pa z modro (16).....	6
Slika 3: Kemijske strukture fluorokinolonov ciprofloksacina (1), moksifloksacina (2), delafloksacina (3) in JNJ-Q2 (4) ter kinolonov ozenoksacina (5) in nemonoksacina (6) (19; 24; 25).....	8
Slika 4: Predstavnik novih zaviralcev bakterijske topoizomeraze IIA GSK2140944 (7), barbituratni analog AZD0914 (8) in simociklinon D8 (9) (13; 26).....	9
Slika 5: Kemijske strukture naravnih zaviralcev giraze B novobiocina (10), kibdelomicina (11) in ciklotrialidina GR122222X (12) (32; 36; 38).....	10
Slika 6: Fragmentna zadetka (13) in (14), spojina vodnica (15) in spojina AZD5099 (16) s podanimi IC ₅₀ in MIC vrednostmi (31; 33).....	11
Slika 7: Kemijske strukture benzimidazol-2-il-sečnine VRT-752586 (17), [1,2,4]triazolo-[1,5- <i>a</i>]piridina 18 in imidazo[1,2- <i>a</i>]piridina 19 (40; 41; 42)	12
Slika 8: Zaviralec DNK giraze 20 z označenimi mesti načrtovanih modifikacij	13
Slika 9: Napovedana vezava načrtovanega potencialnega zaviralca 21 z ATP-vezavnim mestom giraze B <i>E. coli</i>	14
Slika 10: Napovedana vezava načrtovanega potencialnega zaviralca 22 z ATP-vezavnim mestom giraze B <i>E. coli</i>	15
Slika 11: Priprava metilnih estrov preko kislinskega klorida (50)	45
Slika 12: Mehanizem alkalne hidrolize metilnega estra (50)	46
Slika 13: Mehanizem tvorbe amidne vezi ob uporabi sklopitvenega reagenta EDC (50)...	48
Slika 14: Mehanizem tvorbe peptidne vezi ob uporabi pomožnega nukleofila HOBT (50).	48
Slika 15: Mehanizem tvorbe amidne vezi ob uporabi sklopitvenega reagenta TBTU (66; 68).....	49
Slika 16: Splošni mehanizem Mitsunobujeve reakcije (50)	51
Slika 17: Primerjava Mitsunobujeve ciklizacije spojine 61 iz literature in našega poskusa sinteze spojine 55 (73).....	52

Slika 18: Predvideni mehanizem ciklizacije z uporabo mezil klorida, ki pa se je izkazala za neuspešno (50)..... 52

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Reakcijski pogoji sinteze spojine 34	25
Preglednica II: Reakcijski pogoji neuspešnih poskusov sinteze spojine 38	27
Preglednica III: Reakcijski pogoji neuspešnih poskusov sinteze spojine 49	37
Preglednica IV: Reakcijski pogoji sinteze spojine 52	39
Preglednica V: Reakcijski pogoji neuspešnih poskusov sinteze spojine 54	40
Preglednica VI: Reakcijski pogoji neuspešnih poskusov sinteze spojine 57	42
Preglednica VII: Rezultati biološkega testiranja.	53

POVZETEK

Odpornost bakterij na protibakterijske učinkovine predstavlja vedno večjo težavo, zato narašča potreba po novih protibakterijskih učinkovinah z novimi mehanizmi delovanja. Podenota B DNK giraze predstavlja zelo aktualno tarčo protibakterijskih učinkovin, zato potekajo zadnja leta intenzivne raziskave za odkritje učinkovitih zaviralcev njene ATP-azne aktivnosti. S takšnimi zaviralci bi dosegli selektivno toksičnost in širok spekter delovanja, saj je DNK giraza nujna za preživetje vseh bakterij.

V okviru magistrske naloge smo načrtovali sintezo več derivatov 2-({4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1*H*-pirol-2-il}karbonilamino)-etanojske kisline (**20**), ki so jo sintetizirali na Fakulteti za farmacijo in je na bioloških testiranjih izkazala zaviralno delovanje na podenoto B DNK giraze *E. coli* z IC₅₀ vrednostjo 61,3 μM. Sintezna pot, s katero smo prvotno želeli pripraviti načrtovane spojine, se je izkazala za neuspešno zaradi različnih vzrokov, najpogosteji pa je bil slaba topnost vmesnih produktov v uporabljenih topilih. Po modifikaciji sintezne poti smo uspešno pripravili tri potencialne zaviralce encima s 4-amino-1*H*-pirol-2-karboksamidnim ogrodjem, in sicer serinski derivat **21** in *N*-metilirana derivata **41** in **43**. Sintetizirani spojini **21** (IC₅₀ ~ 50 μM,) in **43** (IC₅₀ = 10 μM) sta izkazali boljšo zaviralno delovanje na girazo B bakterije *E. coli* kot spojina **20**, spojina **41** pa slabšo (IC₅₀ ~ 150 μM).

Ključne besede: odpornost na protibakterijske učinkovine, DNK giraza B, 4-amino-1*H*-pirol-2-karboksamid

ABSTRACT

Resistance to antibacterial drugs is a rising problem, so the need for new antibacterial drugs with novel mechanisms of actions is increasing. Because subunit B of DNA gyrase represents a poorly exploited target of antibacterial drugs, there has been intensive research for several years to discover effective inhibitors of its ATP-ase activity. Such inhibitors would achieve selective toxicity and broad spectrum of activity, because DNA gyrase is essential for the survival of all bacteria.

In the master thesis we have planned synthesis of several derivatives of 2-({4,5-dibromo-1*H*--pyrrole-2-il)carbonylamino]-1*H*--pyrrole-2-il}carbonylamino)-ethanoic acid (**20**), which was prepared at the Faculty of Pharmacy and demonstrated inhibitory action on DNA gyrase from *E. coli* with IC₅₀ value of 61,3 µM. The synthesis path, initially planned for the synthesis of designed compounds, proved unsuccessful, because of different reasons, the most frequent being poor solubility of intermediate products in the used solvents. Upon modification of the synthesis path we managed to successfully prepare three potential inhibitors of the enzyme with a 4-amino-1*H*-pyrrole-2-carboxamide moiety, i.e. serine derivative **21** and *N*-methylated derivatives **41** and **43**. Synthesized compounds **21** (IC₅₀ ~ 50 µM,) and **43** (IC₅₀ = 10 µM) demonstrated better inhibitory activity on gyrase B from *E. coli* than compound **20**, whereas the activity of compound **41** was weaker (IC₅₀ ~ 150 µM).

Key words: resistance to antibacterial drugs, DNA gyrase, 4-amino-1*H*-pyrrole-2-carboxamide

SEZNAM OKRAJŠAV

Ac	acetil
angl.	angleško
ADP	adenozin-5'-difosfat
ATP	adenozin-5'-trifosfat
Ar	aril
bs	široki singlet
d	dublet
dd	dublet dubleta
ddd	dublet dublet dubleta
DEAD	dietil azodikarboksilat
DIAD	diizopropil azodikarboksilat
DIPEA	<i>N,N</i> -diizopropiletilamin
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DNK	deoksiribonukleinska kislina
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMSO	dimetilsulfoksid
EDC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilkarbodiimid
ekv.	ekvivalent

EtOAc	etilacetat
Hex	heksan
HOBT	hidroksibenzotriazol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IC ₅₀	srednja zavirala koncentracija
MeOH	metanol
MIC	minimalna zavirala koncentracija
MRSA	na meticilin odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
MSSA	na meticilin občutljiv <i>Staphylococcus aureus</i>
MRQR	na meticilin in kinolone občutljiv <i>Staphylococcus aureus</i>
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
Ph	fenil
Py	piridinil
s	singlet
T	temperatura
t	triplet
td	triplet dubleta
TBAI	tetrabutilamonijev jodid
TBTU	<i>O</i> -(1 <i>H</i> -benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev tetrafluoroborat
THF	tetrahidrofuran

TLC tenkoplastna kromatografija

TMS tetrametilsilan

1 UVOD

1.1 Kemoterapevtiki

V boju proti patogenim mikroorganizmom kot so bakterije, virusi, glivice in praživali, ki so odgovorni za številne bolezni, se uporablja zdravilne učinkovine iz skupine kemoterapevtikov. Ti morajo biti selektivno toksični, kar pomeni da so toksični za parazite, pri tem pa niso oz. so minimalno toksični za gostitelja (1).

Antibiotiki, podskupina kemoterapevtikov, so metaboliti mikroorganizmov, ki se uporablja za zdravljenje v glavnem bakterijskih okužb, v manjšem obsegu pa tudi okužb z glivicami, trihomonasi, amebami, trihinami in za zdravljenje rakavih obolenj. Med antibiotike spadajo tudi njihovi polysintezni analogi, ki so strukturno modificirani z namenom razširitve protimikrobnega delovanja, zvišanja jakosti, zmanjšanja toksičnosti itd. ter nekatere spojine, ki se danes pridobivajo popolnoma sintezno, a so bile prvotno izolirane kot metaboliti mikroorganizmov (npr. kloramfenikol). Prvi odkriti kemoterapevtiki so bili sulfonamidi leta 1938, prvi antibiotiki v uporabi pa penicilini v 40. letih 20. stoletja, kar je predstavljalo začetek revolucije na medicinskem področju (1; 2).

Protibakterijske učinkovine lahko delujejo bakteriostatično (zaustavijo rast bakterij) ali baktericidno (ubijejo bakterije), običajno pa izkazujejo oba učinka, in sicer bakteriostatični pri nižjih koncentracijah in baktericidni pri višjih (1). Bakteriostatični antibiotiki imajo zadovoljivo delovanje pri zdravljenju imunokompetentnih pacientov, vendar lahko njihova predčasna ukinitve povzroči ponovno rast patogenih bakterij in ponovitev okužbe. Pri hujših oblikah okužb in pri imunska oslabljenih pacientih, ki se težje sami borijo proti okužbam, pa je primernejša uporaba antibiotikov z baktericidnim delovanjem (2).

Protibakterijske učinkovine razdelimo glede na mehanizem delovanja na:

- zaviralce sinteze bakterijske celične stene: β -laktami, glikopeptidi, bacitracin, cikloserin;
- zaviralce sinteze beljakovin: tetraciklini, aminoglikozidi, makrolidi, kloramfenikol, klindamicin, fusidna kislina, linezolid;
- zaviralce sinteze nukleinskih kislin: kinoloni, rifampicin, metronidazol, nitrofurani;
- zaviralce sinteze folne kisline: sulfonamidi, trimetoprim;

- zaviralce funkcije bakterijske celične membrane: polimiksini (3).

Odpornost bakterij na antibiotike se je pojavila že zelo kmalu po vpeljavi antibiotičnega zdravljenja, kar je bilo predvidljivo in neizbežno, saj ima večina bakterij zaradi kratkega generacijskega časa precej priložnosti za evolucijsko prilagoditev na antibiotike (4; 5). Prvotno je bil ta pojav omejen na okužbe v bolnišnici, kjer je močno povečal obolenost in smrtnost, sedaj pa je vedno pogostejši tudi znotraj celotne skupnosti (4; 6). Poglavitna razloga za pojav odpornosti sta sama uporaba protibakterijskih učinkovin, ki povzroči selekcijo odpornih sevov, in širjenje ter prenos odpornih sevov med ljudmi, živalmi in okoljem (7).

Nekatere bakterije so naravno odporne na nekatere protibakterijske učinkovine (naravna ali podedovana odpornost), kar je posledica spontanih genskih mutacij, ki se dogodijo v odsotnosti selekcijskega pritiska protibakterijske učinkovine. Bolj zaskrbljujoča pa je pridobljena odpornost kot posledica genskih mutacij v prisotnosti protibakterijske učinkovine ali privzema genov za odpornost, ki se lahko prenašajo med bakterijami vertikalno (iz starševske generacije na hčerinsko) ali horizontalno (6; 7). Najpomembnejši horizontalni način prenosa genov za odpornost je konjugacija, pri kateri se med bakterijami v celičnem stiku preko pilusov prenašajo konjugativni plazmidi. Konjugacija lahko poteka med različnimi vrstami bakterij in je zlasti pomembna pri bakterijskih kolonijah z visoko gostoto celic, npr. v črevesju. Transdukcija je manj pogost način horizontalnega prenosa in poteka običajno preko bakteriofagov. Če bakteriofag, ki okuži bakterijo, vsebuje baterijski gen za odpornost, le-tega vključi v genetski material bakterije in s tem ta pridobi odpornost. Transdukcija poteka med bakterijami iste vrste in je klinično pomembna pri stafilocokih in streptokokih. Tretji mehanizem genetskega prenosa je transformacija, ki pa najverjetneje ni klinično pomembna. Ta poteka preko privzema proste DNK, ki običajno nastane iz razpadlih bakterij, v citoplazmo bakterije in njeno vključitvijo v lastno DNK (5; 6).

Glavni biološki mehanizmi odpornosti, ki jih povzročijo izraženi geni za odpornost, so sledeči:

- Proizvodnja encima, ki inaktivira učinkovino. Bakterija lahko proizvaja enega ali več encimov, ki kemijsko razgradijo ali modificirajo protimikrobnoučinkovino, tako da ta izgubi svoj učinek. Eden najpomembnejših primerov je cepitev β -

laktamskih antibiotikov z β -laktamazami, ki jih v največji meri proizvajajo stafilokoki.

- Sprememba tarčnega mesta učinkovine. Bakterije lahko spremenijo tarčo preko mutacij genov za aminokisline v aktivnem mestu, kar močno zmanjša afiniteto učinkovine zanjo. Primer predstavljajo strukturne spremembe penicilin vezičnih beljakovin (PBP, angl. penicillin binding proteins), ki vodijo v odpornost na peniciline.
- Zmanjšano kopičenje učinkovine v bakteriji. Bakterija aktivno črpa protibakterijsko učinkovino iz notranjosti celice v zunanje okolje, s čimer je dosežena prenizka znotrajcelična koncentracija učinkovine, ki nima več protibakterijskega učinka. Ta mehanizem je zelo pogost in je odgovoren za zmanjšano učinkovitost tetraciklinov, makrolidnih antibiotikov in fluorokinolonov. Bakterije lahko tudi zmanjšajo permeabilnost membrane preko zmanjšane sinteze porinov in spremembe lipopolisaharidne strukture.
- Razvoj poti, ki obidejo zaviranje z antibiotikom. Odpornost na sulfonamide, posredovana preko plazmidov, se je tako pojavila kot posledica proizvodnje oblike encima dihidropteroat sintetaze z nizko afiniteto za sulfonamide, a nespremenjeno afiniteto za para-aminobenzojsko kislino (5; 6; 8).

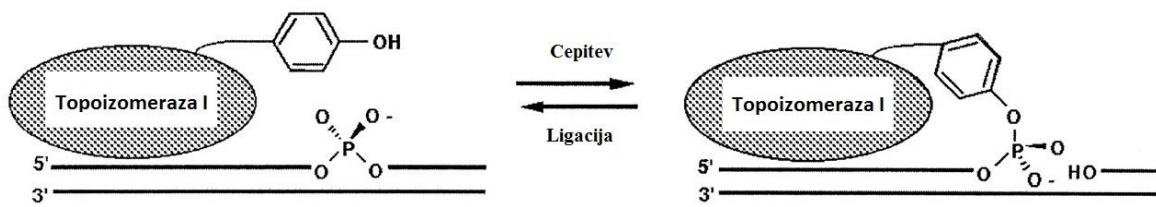
Za preprečevanje širjenja rezistence je potrebna preudarna uporaba antibiotikov s pravilno izbiro učinkovine, doziranja, intervalov doziranja in trajanja zdravljenja, preprečevanje prenosa rezistentnih sevov in okužb z ustreznimi higienskimi ukrepi (umivanje rok, ugotavljanje nosilcev odpornih sevov in njihova osamitev) ter razvoj novih cepiv, še posebej proti multi-rezistentnim bakterijam, s katerimi bi se izognili okužbam. To pa ne bo zadostovalo za rešitev težav odpornosti, saj se bodo mikroorganizmi neprenehoma prilagajali antibiotikom in bo zato potreben nenehen razvoj novih protimikrobnih učinkovin z novimi mehanizmi delovanja (6; 7).

1.2 Topoizomeraze

Topoizomeraze so encimi, ki preko katalize začasne cepitve DNK nadzorujejo njene topološke spremembe. Njihovo delovanje uravnava superzvitje DNK, katenacijo in dekatenacijo krožne DNK ter razvozlanje prepletenih linearnih kromosomov. To je potrebno pri procesih, kot so podvojevanje, prepisovanje, rekombinacija in popravilo

DNK, zato so topoizomeraze nujno potrebne za preživetje vseh organizmov. Razdeljene so v dve večji skupini: topoizomeraze tipa I, ki prekinejo eno verigo v DNK vijačnici, in topoizomeraze tipa II, ki prekinejo obe verigi (9).

Mehanizem cepitve ene oz. obeh verig DNK je enak za vse topoizomeraze in je prikazan na sliki 1. V aktivnem mestu vsake topoizomeraze se nahaja tirozinski ostanek, ki z nukleofilnim napadom na fosfatno skupino nukleinske kisline doseže prekinitev verige vijačnice in nastanek prehodne kovalentne fosfodiesterske vezi med encimom in novonastalim koncem DNK. Ta intermedij lahko spremeni topologijo DNK in proces se zaključi z nukleofilnim napadom terminalne hidroksilne skupine z drugega konca prekinjene verige na fosfodiestersko vez, kar poskrbi za ponovno ligacijo DNK. Ravnotežje cepitev-ligacija je pri vseh topoizomerazah premaknjeno proti ligaciji, kar zagotavlja nizko koncentracijo kompleksov topoizomeraz s cepljeno DNK v celici (9; 10).



Slika 1: Mehanizem cepitve in ligacije DNK verige s topoizomerazami tipa I (11).

1.2.1 Topoizomeraze tipa I

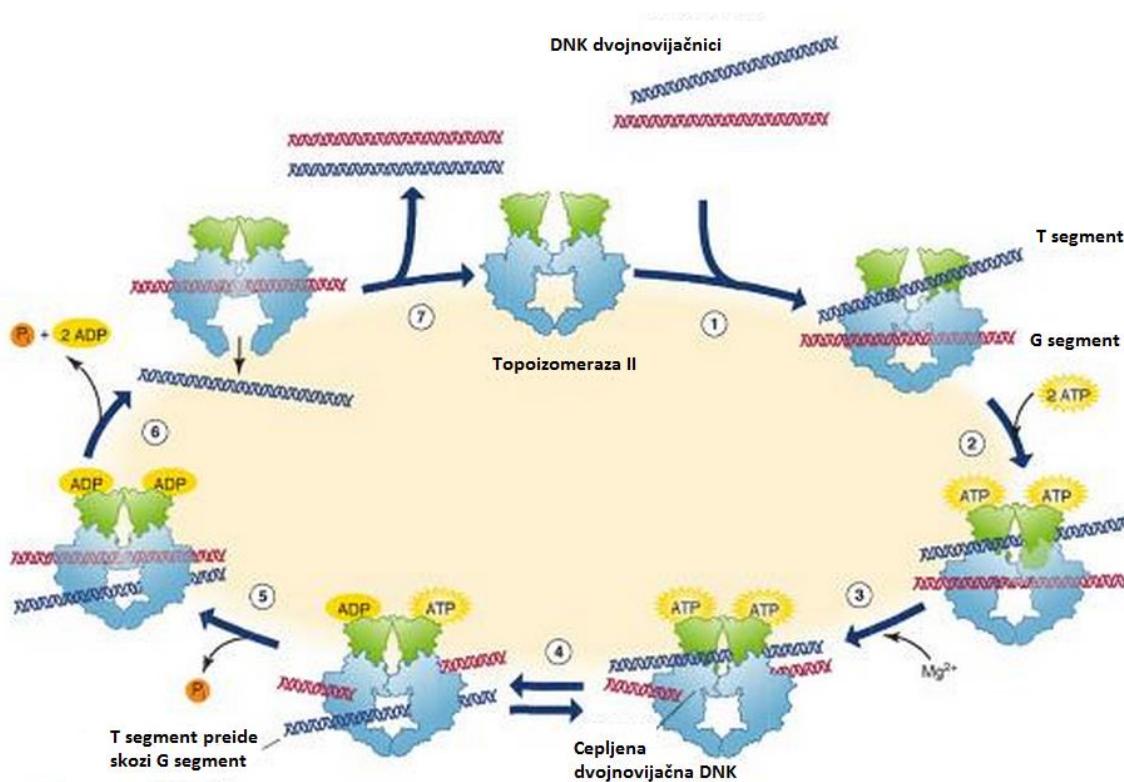
Topoizomeraze tipa I so monomerne in ne potrebujejo visoko energijskih kofaktorjev za delovanje. Delimo jih na topoizomeraze tipa IA, ki delujejo tako, da skozi začasno cepljeno verigo DNK peljejo nasprotno necepljeno verigo DNK, in na tip IB, ki delujejo preko nadzorovane rotacije heliksa okoli cepljenega mesta DNK. Ti encimi so pri prokariontih sposobni sprostiti negativno superzvitje, pri evkariontih pa negativno in pozitivno superzvitje. Bakterijska topoizomeraza I (tipa IA) skupaj z DNK girazo (topoizomeraza tipa II) nadzoruje stopnjo superzvitja DNK (10). Odkriti zaviralci bakterijskih topoizomeraz IA najverjetneje nimajo prihodnosti kot protibakterijske učinkovine, saj so struktурno podobni učinkovinam za zdravljenje tumorjev, ki delujejo na človeške topoizomeraze tipa I, in jim tako primanjkuje bakterijska specifičnost (12).

1.2.2 Topoizomeraze tipa II

Topoizomeraze tipa II potrebujejo ATP in Mg²⁺ za svoje katalitsko delovanje. Prokariotični encimi imajo heterotetramerno strukturo z dvema različnima podenotama, medtem ko so eukariotični encimi homodimerni (9). V bakterijah, med katerimi je najbolj preučevana *E. coli*, imajo dve topoizomerazi tipa IIA, in sicer DNK giraza in topoizomerazo IV, ki predstavlja privlačni tarči za razvoj novih protibakterijskih učinkovin (9; 13).

DNK giraza je sestavljena iz dveh GyrA in dveh GyrB podenot, ki tvorijo tetramerni A₂B₂ kompleks. Podenota A vsebuje aktivno mesto za cepitev in ligacijo DNK, podenota B pa vsebuje mesto za hidrolizo ATP. Je edina topoizomeraza tipa II, ki je sposobna uvedbe negativnega superzvitja DNK preko hidrolize ATP. Topoizomeraza IV je paralogna DNK girazi in je sestavljena iz dveh ParC podenot, ki sta homologni GyrA, in iz dveh ParE podenot, ki sta homologni GyrB podenotom (9). Topoizomeraza IV in DNK giraza imata 40 % ujemanje aminokislinskega zaporedja in še višjo stopnjo homolognosti, a se bistveno razlikujeta pri sposobnosti katalize prehoda verige DNK. Topoizomeraza IV ima višjo specifičnost za katalizo medmolekulnih reakcij (dekatenuacija), DNK giraza pa za znotrajmolekularne reakcije (superzvitje) (14).

Na sliki 2 je prikazan mehanizem delovanja topoizomeraz tipa II. Encim se veže na dva segmenta dvojnovidne DNK, pri čemer označujemo cepljeni segment DNK kot G (angl. gate) segment, preneseni segment pa kot T (angl. transported) segment. Interakcija encima in G segmenta povzroči konformacijsko spremembo encima, ki "zaklene" G segment. Po vezavi ATP molekule na vsako ATPazno podeno pride do "zaklenitve" še T segmenta in cepitve obeh verig G segmenta. Ob hidrolizi ATP molekule pride do prenosa T segmenta skozi cepljeno mesto G segmenta, druga ATP molekula pa se hidrolizira ob ponovni združitvi G segmenta. Po disociaciji ADP molekul pride do sprostitev T segmenta, po ločitvi ATP-aznih podenot pa se sprosti še G segment (15; 16).



Slika 2: Predlagani mehanizem katalitskega delovanja topoizomeraze II. Podenoti topoizomeraze II z ATP-azno aktivnostjo sta označeni z zeleno barvo, podenoti z aktivnim mestom za cepitev DNK pa z modro (16).

1.3 Inhibitorji topoizomeraz tipa II

DNK giraza in topoizomeraza IV sta privlačni tarči protibakterijskih učinkovin, zaradi številnih razlogov:

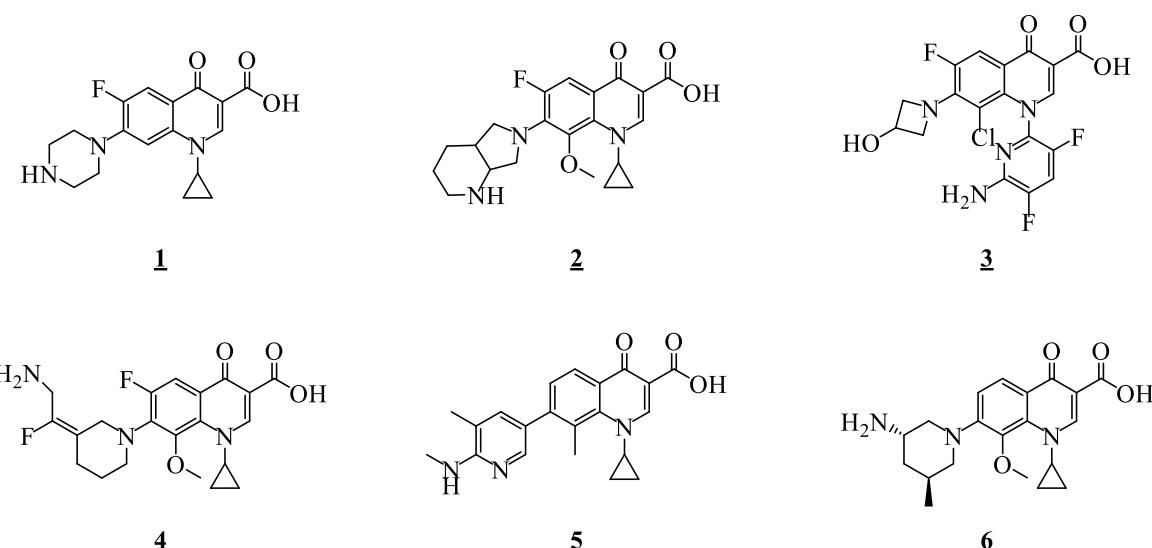
- nujni sta za preživetje bakterij, saj sta vpleteni v procese DNK podvojevanja in delitve celice;
- bistveni sta za vse bakterije;
- zaviranje njihovega delovanja ima običajno baktericidni učinek;
- strukturno se bistveno razlikujeta od sesalskih encimov, kar zagotavlja bakterijsko specifičnost;
- znotraj encimov so bila identificirana številna tarčna mesta;
- njuna strukturna podobnost običajno omogoča zaviranje obeh encimov (12).

DNK giraza je edina topoizomeraza tipa II pri *Mycobacterium tuberculosis* in predstavlja klinično validirano tarčo za razvoj novih protituberkuloznih učinkovin, ki bi lahko omogočile skrajšanje zdravljenja in preprečile širitev odpornih sevov tuberkuloze (13).

1.3.1 Zaviralcí giraze A

Fluorokinoloni zavirajo tako DNK girazo (GyrA podenoto) kot topoizomereazo IV (ParC podenoto), in sicer prvo predvsem pri Gram negativnih, drugo pa predvsem pri Gram pozitivnih bakterijah. Spadajo med protibakterijske učinkovine s širokim spektrom delovanja, saj imajo različne bakterijske vrste strukturno podobne topoizomeraze tipa II (13). Z zaviranjem prehoda T segmenta in ligacije G segmenta DNK stabilizirajo kovalentni kompleks encima s cepljeno DNK. Poleg tega fluorokinoloni pri terapevtskih koncentracijah pospešujejo ločitev podenot encima od cepljene DNK, ki se tako ne more več podvojevati in prepisovati (15). Zaviranje podvojevanja DNK naj bi nadalje povzročilo poškodbe DNK, sintezo nepravilnih proteinov, oksidativne poškodbe in sprožitev mehanizmov celične smrti (13).

Leta 1965 je prišel na trg prvi nefluoriran zaviralec giraze, nalidiksična kislina, ki je bila odkrita kot stranski produkt sinteze klorokina in se je uporabljala za zdravljenje okužb urinarnega trakta z Gram negativnimi bakterijami (2; 17). V drugo generacijo prištevamo fluorirana kinolona z razširjenim protibakterijskim spektrom norfloksacin in ciprofloksacin (**1**, slika 3), v tretjo levofloksacin, ki ima višjo aktivnost proti Gram pozitivnim bakterijam, v četrto pa moksifloksacin (**2**, slika 3) in trovafloksacin z izboljšanimi farmakokinetičnimi lastnostmi (17; 18). Zaradi vedno večje odpornosti na fluorokinolone je postal privlačen razvoj novih kinolonov. Trenutno se pričenjajo oz. potekajo klinične študije faze 3 za fluorokinolona delafloksacin (**3**, slika 3) in JNJ-Q2 (**4**, slika 3) ter nefluoriranana kinolona ozenoksacin (**5**, slika 3) in nemonoksacin (**6**, slika 3) (19; 20; 21; 22; 23).

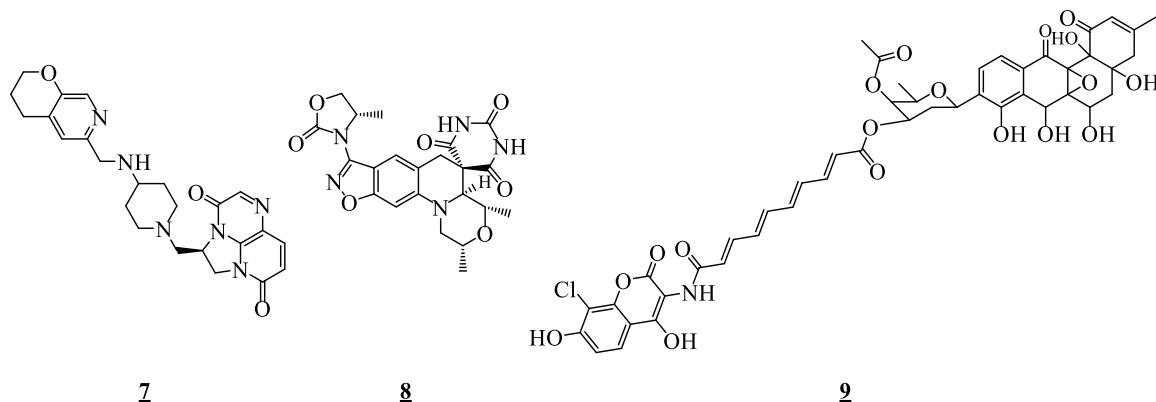


Slika 3: Kemijeske strukture fluorokinolonov ciprofloksacina (**1**), moksifloksacina (**2**), delafloksacina (**3**) in JNJ-Q2 (**4**) ter kinolonov ozenoksacina (**5**) in nemonoksacina (**6**) (19; 24; 25).

Med nove zaviralce GyrA in ParC podenote, tako imenovane NBTI (angl. novel bacterial topoisomerase inhibitors), prištevamo piperidine, 4-aminopiperidine in cikloheksilamine (13). Ker imajo drugačno vezavno mesto kot fluorokinoloni, se izognejo navzkrižni odpornosti s fluorokinoloni, a so bili na žalost številni NBTI ukinjeni med kliničnim razvojem zaradi zaviranja hERG (angl. human Ether-à-go-go related gene) kanalov. S povečanjem polarnosti učinkovine so raziskovalci kardiotoksičnost sicer zmanjšali, a so s tem zmanjšali tudi aktivnost proti Gram-negativnim bakterijam (26). Podjetju GlaxoSmithKline PLC je uspelo razviti 4-aminopiperidin GSK2140944 (**7**, slika 4), ki se nahaja v fazi 2 kliničnih študij za zdravljenje okužb dihalnega sistema in okužb kože in mehkih tkiv z Gram-pozičivimi patogeni (vključno z MRSA sevi) ter Gram-negativnimi patogeni, ki so odporni na dosedanje učinkovine (27; 28). V fazo 2 kliničnih študij vstopa tudi barbituratni analog AZD0914 (**8**, slika 4) podjetja AstraZeneca, in sicer za zdravljenje nezapletene gonoreje, za kar ji je FDA odobrila status *fast track*, ki omogoča hitrejši razvoj zdravila (26; 29).

Možno izhodišče za razvoj novih zaviralcev DNK giraze predstavlja tudi simociklinon D8 (**9**, slika 4), ki se sicer veže tudi na človeško topoizomerazo II. Pridobljen je iz vrste *Streptomyces antibioticus* in je sestavljen iz aminokumarinskega in poliketidnega dela, za katera so raziskovalci ugotovili, da se vežeta vsak v svoj žep na GyrA podenoti na do sedaj

nepoznan način, kar odpira vrata razvoju novih zaviralcev z novoodkritim načinom vezave (13; 30).



Slika 4: Predstavnik novih zaviralcev bakterijske topoizomeraze IIA GSK2140944 (**7**), barbituratni analog AZD0914 (**8**) in simociklinon D8 (**9**) (13; 26).

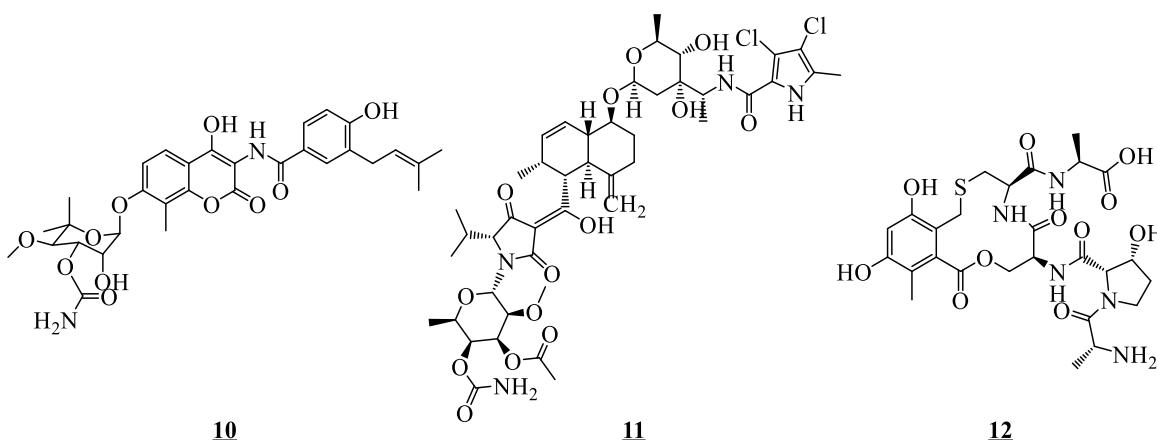
1.3.2 Zaviralci giraze B

ATP-azna aktivnost podenote B še vedno ostaja premalo farmacevtsko izkoriščena, zato bi se z razvojem njenih zaviralcev izognili navzkrižni odpornosti s fluorokinoloni, ki ciljajo GyrA podenoto (31). Poleg fluorokinolonov so aminokumarini edini zaviralci DNK giraze, ki so dosegli klinično uporabo. So naravni antibiotiki, izolirani iz vrste *Streptomyces*, med katere spadajo novobiocin (**10**, slika 5), klorobiocin in kumermicin A₁. Njihovo vezavno mesto se delno prekriva z vezavnim mestom za ATP na podenoti GyrB, zaradi česar preprečijo vezavo ATP in tako delujejo kot kompetitivni zaviralci DNK giraze, šibkeje pa zavirajo tudi topoizomerazo IV (podenoto ParE) (32). Edini aminokumarin sproščen na trg, novobiocin, je bil uveden v 60-ih letih za zdravljenje infekcij s *Staphylococcus aureus*, vključno z MRSA sevi, a je bil zaradi toksičnosti in uvedbe cefalosporinov, doksiciklina ter novejših penicilinov sčasoma odpoklican s trga (32; 33). Dandanes se ga uporablja pretežno le še v veterinarski medicini (34; 35).

Kibdelomicin (**11**, slika 5), pridobljen iz vrste *Kibdelosporangium*, je strukturno nov močan zaviralec topoizomeraz tipa II. Zavira ATPazno delovanje DNK giraze in šibkeje topoizomeraze IV ter ima širok spekter delovanja proti Gram-pozitivnim bakterijam, deluje pa tudi proti Gram-negativni *H. influenzae*. Nezmanjšana aktivnost proti sevom *S. aureus* odpornim na novobiocin oz. na ciprofloksacin je nakazala nov način vezave v DNK girazo (36). Kokristalizacija kibdelomicina z N-končnima domenama *S. aureus* giraze B in

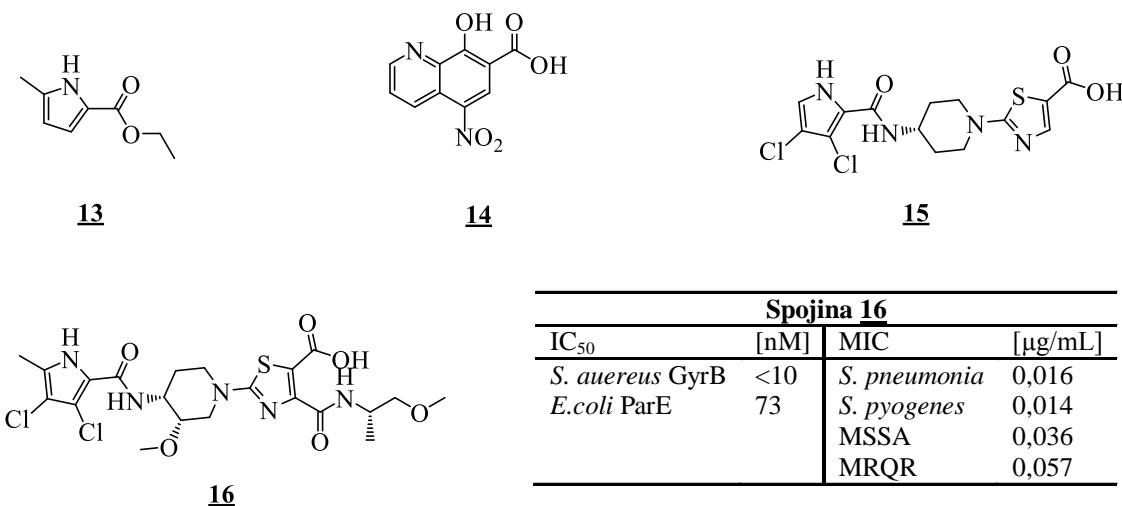
topoizomeraze IV je osvetlila način vezave v obliki črke U (37). Poleg preprečitve navzkrižne rezistence bi se z razvojem zaviralcev z novim načinom vezave lahko izognili tudi težavam s toksičnostjo, ki jih opazimo pri aminokumarinih (36).

Med močne naravne zaviralce giraze B prištevamo tudi ciklotialidine, ki pa imajo šibko protibakterijsko delovanje, najverjetneje zaradi slabe penetracije v bakterijske celice (13). Na njihovi osnovi so bili razvite različne fenolne in resorcinolne spojine, ki zavirajo DNK giraze B, a nobena še ni dosegla kliničnih raziskav (38).



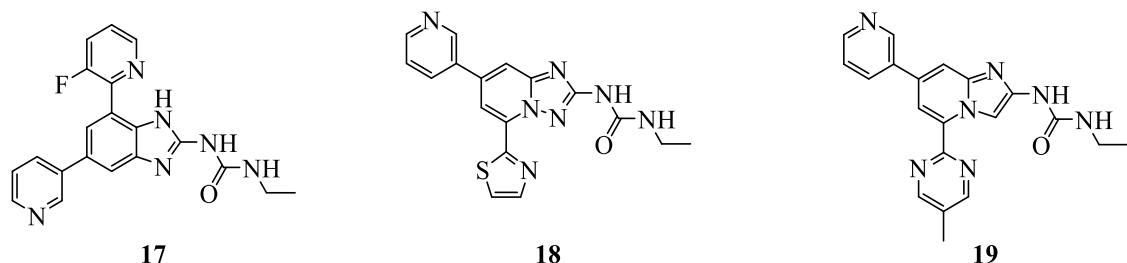
Slika 5: Kemijske strukture naravnih zaviralcev giraze B novobiocina (10), kibdelomicina (11) in ciklotialidina GR122222X (12) (32; 36; 38).

Pri podjetju AstraZeneca so z metodo načrtovanja učinkovin na osnovi fragmentov (FBLG – fragment-based lead generation) s pomočjo NMR rešetanja identificirali pirolni fragment (13, slika 6), ki se veže na ATP vezavno mesto GyrB *E. coli*. Ta fragment, ki je tudi del kibdelomicina in klorobiocina, je predstavljal osnovo za razvoj pirolamidnih zaviralcev DNK giraze. S ponovitvijo NMR rešetanja zapoljenega GyrB adeninskega žepa so identificirali spojino (14, slika 6), ki se veže na drugo vezavno mesto v žepu, kar je nakazalo možnost dodatnih interakcij med žepom in zaviralci, s čimer bi jim povečali jakost vezave. Poleg tega vezava na mesto, ki ni del ATP vezavnega mesta, zmanjša možnost inhibicije drugih encimov, ki uporabljajo ATP. Spojino vodnico (15, slika 6) so optimizirali do spojine AZD5099 (16, slika 6) (31; 33). Ta je dosegla fazo I kliničnih študij za intravensko zdravljenje okužb z Gram-pozičivimi bakterijami, a je bil zaradi toksičnosti in težav z učinkovitostjo razvoj ukinjen (33; 39).



Slika 6: Fragmentna zadetka (**13**) in (**14**), spojina vodnica (**15**) in spojina AZD5099 (**16**) s podanimi IC₅₀ in MIC vrednostmi (31; 33).

N-(Benzimidazol-2-il) sečnina VRT-752586 (**17**, slika 7), odkrita pri podjetju Vertex Pharmaceuticals, deluje na GyrB podenoto DNK giraze in na ParE podenoto topoizomeraze IV. Pri testiranju na živalih je izkazala dobre farmakokinetične lastnosti in učinkovitost pri živalskih modelih okužbe. Visoka jakost delovanja proti odpornim sevom stafilokokov, enterokokov, streptokokov in respiratornih Gram-negativnih bakterij (*H. influenzae* in *M. catarrhalis*) nakazuje na njeno možno uporabo tako v bolnišničnem okolju kot znotraj celotne skupnosti (40). Pri podjetju Evotec so z zamenjavo benzimidazolnega ogrodja benzimidazol-2-il-sečnin raziskovalci sintetizirali imidazolo[1,2-*a*]piridine in [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]piridine. Prvi so sicer imeli nižje IC₅₀ vrednosti, a so se zaradi enostavnnejše sinteze odločili za triazolo-piridine. Na sliki 7 je prikazan optimiziran predstavnik [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]piridinov (**18**), ki pa ima še vedno nižjo jakost zaviranja giraze B kot benzimidazol-2-il-sečnine (41). Ti dve skupini zaviralcev so preučevali tudi pri podjetju Pfizer, kjer so razvili 5-(2-pirimidinil)-imidazo[1,2-*a*]piridin (**19**, slika 7) (42). Poleg omenjenih spojin so razvili še heterociklične *N*-etylsečnine z izokinolinskim (Actelion), piridinskim (AstraZeneca) in benzotiazolnim (Prolis) ogrodjem (43).

MIC *S. auereus*: 0,12 µg/mLMIC *S.aureus*: 1 µg/mLMIC *S.aureus*: 0,5 µg/mL

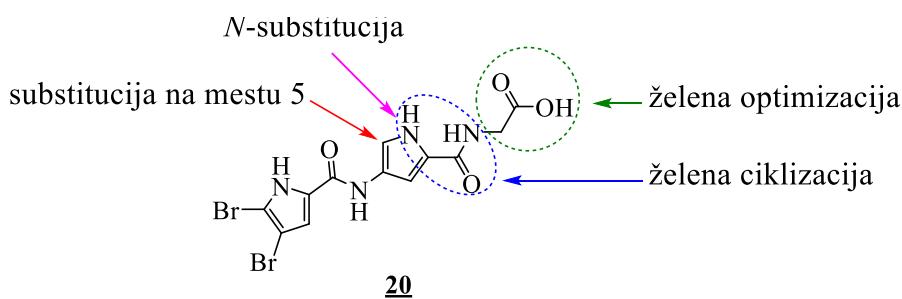
Slika 7: Kemijske strukture benzimidazol-2-il-sečnine VRT-752586 (**17**), [1,2,4]triazolo[1,5-*a*]piridina **18** in imidazo[1,2-*a*]piridina **19** (40; 41; 42).

Mnogo močnih zaviralcev podenote B DNK giraze je bilo odkritih tudi med pripadniki pirazolotiazolov, pirolopirimidinov, bitiazolov, azaindolov, indazolov in aminopirazinamidov (13).

2 NAČRT DELA

Namen magistrskega dela je sintetizirati spojine s 4-amino-1*H*-pirol-2-karboksamidnim ogrodjem s pomočjo posnemanja pirolamidnega zaviralca DNK giraze **20**. Ta je bil pripravljen na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in je pri biološkem testiranju na girazno aktivnost bakterije *E. coli* izkazal aktivnost z IC₅₀ vrednostjo 61,3 μM. Sidranje je izvedel asist. dr. Rok Frlan na podlagi objavljene kristalne strukture *N*-končne domene giraze B *E. coli* K-12 v kompleksu z zavircem 4-{[4'-metil-2'-(propanoilamino)-4,5'-bi-1,3-tiazol-2-il]amino}benzojsko kislino (38). Nekaj spojin, ki so izkazale najboljše ocenjene vezavne energije, bomo poskusili sintetizirati. Na sliki 8 so označena mesta spojine **20**, ki jih bomo poskusili modificirati. Načrtovane spojine tako obsegajo:

- derivate serina in aminobenzojske kisline (označeno zeleno),
- ciklične oblike 4-amino-1*H*-pirol-2-karboksamidnega ogrodja (označeno modro),
- derivat z *N*-substituiranim 4-amino-1*H*-pirol-2-karboksamidnim ogrodjem (označeno vijolično),
- derivat s 5-amino-1*H*-pirol-2-karboksamidnim ogrodjem (označeno rdeče).



IC₅₀ *E. coli*: 61,3 μM

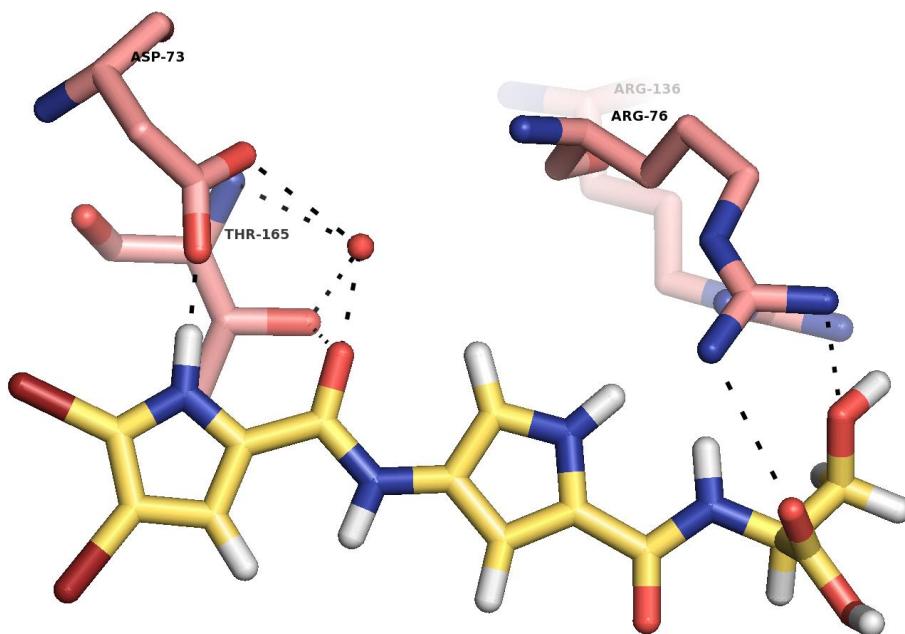
Slika 8: Zaviralec DNK giraze **20** z označenimi mesti načrtovanih modifikacij.

Napovedane interakcije med girazo B in načrtovani potencialni zaviralci:

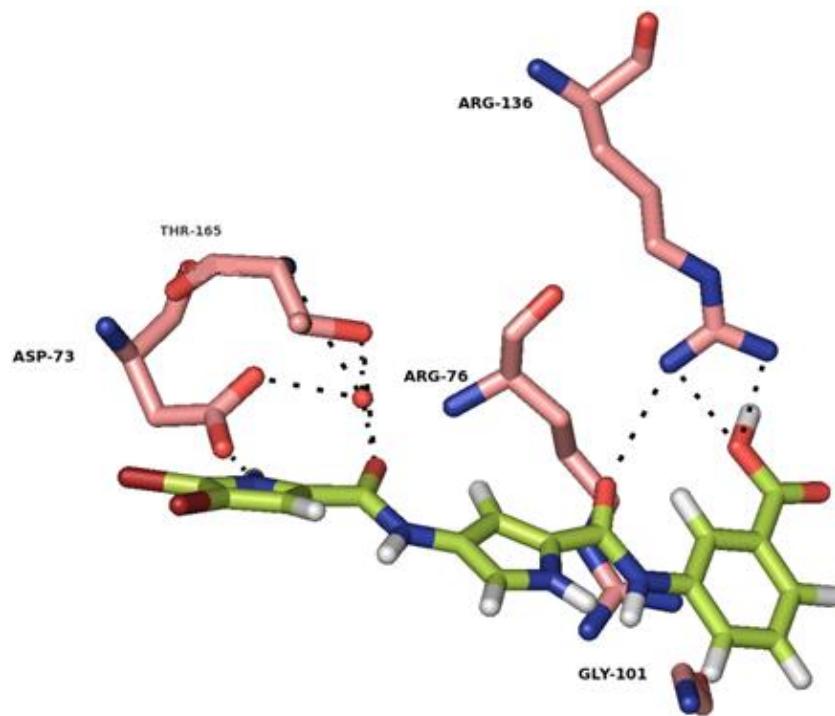
- Hidrofobne interakcije dibromopirola v adeninskem žepu. Bromova atoma sta lipofilna, kar ojača hidrofobne interakcije.
- Vodikova vez med Asp73 in pirolno amino skupino.
- Vodikova vez med Asp73 in kisikom amida, vezanega na dibromopirolni obroč. Slednji naj bi se z Asp73 povezal tudi preko molekule kristalne vode, ki naj bi tvorila vodikove vezi z obema.

- Vodikova vez med Arg136 in karboksilno skupino.
- Hidroksilna skupina pri načrtovanih serinskih derivatih predvidoma tvori vodikovo vez z Arg76.

Slike 9 in 10 prikazujeta napovedano vezavo načrtovanega serinskega derivata (**21**) in načrtovanega derivata 3-aminobenzojske kisline (**22**) v ATP-vezavno mesto giraze B *E. coli*. Sintetiziranim končnim spojinam bomo določili zaviralno aktivnost na girazo B *E.coli*.



Slika 9: Napovedana vezava načrtovanega potencialnega zaviralca **21** z ATP-vezavnim mestom giraze B *E. coli*.



Slika 10: Napovedana vezava načrtovanega potencialnega zaviralca **22** z ATP-vezavnim mestom giraze B *E. coli*.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Reagenti in topila

Laboratorijsko delo je obsegalo delo z reagenti in topili proizvajalcev Acros Organics, Sigma-Aldrich, Merck in Fluka. Brezvodni DCM in THF smo pripravili tik pred uporabo z destilacijo v argonovi atmosferi. Brezvodni DMF pa je bil predhodno pripravljen in shranjen nad molekularnimi siti.

3.2 Metode

Kromatografske metode

- *Tenkoplastna kromatografija (TLC)*: Za spremljanje poteka reakcij smo uporabili TLC Silica gel 60 F₂₅₄ aluminijaste plošče proizvajalca Merck. Za detekcijo nekaterih spojin smo se poslužili orositvenih reagentov (nihidrin in bromkrezol zeleno).
- *Kolonska kromatografija*: Uporabili smo jo za čiščenje določenih spojin, pri čemer smo za stacionarno fazo uporabili silikagel s premerom delcev 0,040 – 0,063 nm proizvajalca Merck. Uporabljene mobilne faze so navedene pri opisu sinteznega postopka posameznih spojin.
- *Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)*: Izvedli smo jo na sistemu Agilent Technologies 1100 z G1365B UV-VIS detektorjem (detekcija pri 220 nm in 254 nm) z uporabo kolone Agilent Eclipse Plus C18 (150 x 4.6 mm), termostatirane na 25 °C. Volumen injiciranja je znašal 5 µL in pretok mobilne faze 1,0 mL/min. Kot mobilno fazo smo uporabili acetonitril v bidestilirani vodi s sledečim gradientom:
 - 0 – 15 min: od 40 % do 95 % acetonitrila
 - 15 – 17,5 min: 95 % acetonitrila
 - 17,5 – 23,5 min: 95 % do 40 % acetonitrila.

Spektroskopske metode

- *Jedrska magnetna resonanca (NMR):* ^1H in ^{13}C spektri so bili posneti na spektrometru Bruker Advance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Kot interni standard je bil uporabljen TMS, vzorce pa smo raztopili v devteriranih topilih CDCl_3 , DMSO-d_6 in MeOD-d_4 . Spektre smo obdelali s programom NMRNotebook 2.70 proizvajalca NMRtec S.A.S.
- *Infrardeča spektroskopija (IR):* IR spektre spojin smo posneli na spektrometru *Nexus FT-IR* z ATR tehniko ali kot tablete s KBr s transmisijsko tehniko na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.
- *Masna spektroskopija (MS):* Masne spektre so posneli na Watters Micromass Q-TOF Premier masnem spektrometru v Centru za masno spektrometrijo Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani.

Določanje temperature tališča

Temperaturo tališč spojin smo določali s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico proizvajalca Leica na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Elementna analiza

Elementno analizo elementov C, H in N so izvedli z analizatorjem *Perkin-Elmer 2400 CHN* na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

Optična sučnost

Optično sučnost smo izmerili s polarimetrom *Perkin-Elmer 241 MC* na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pri valovni dolžini 589 nm in dolžini kivete 1 dm.

Poimenovanje in risanje spojin

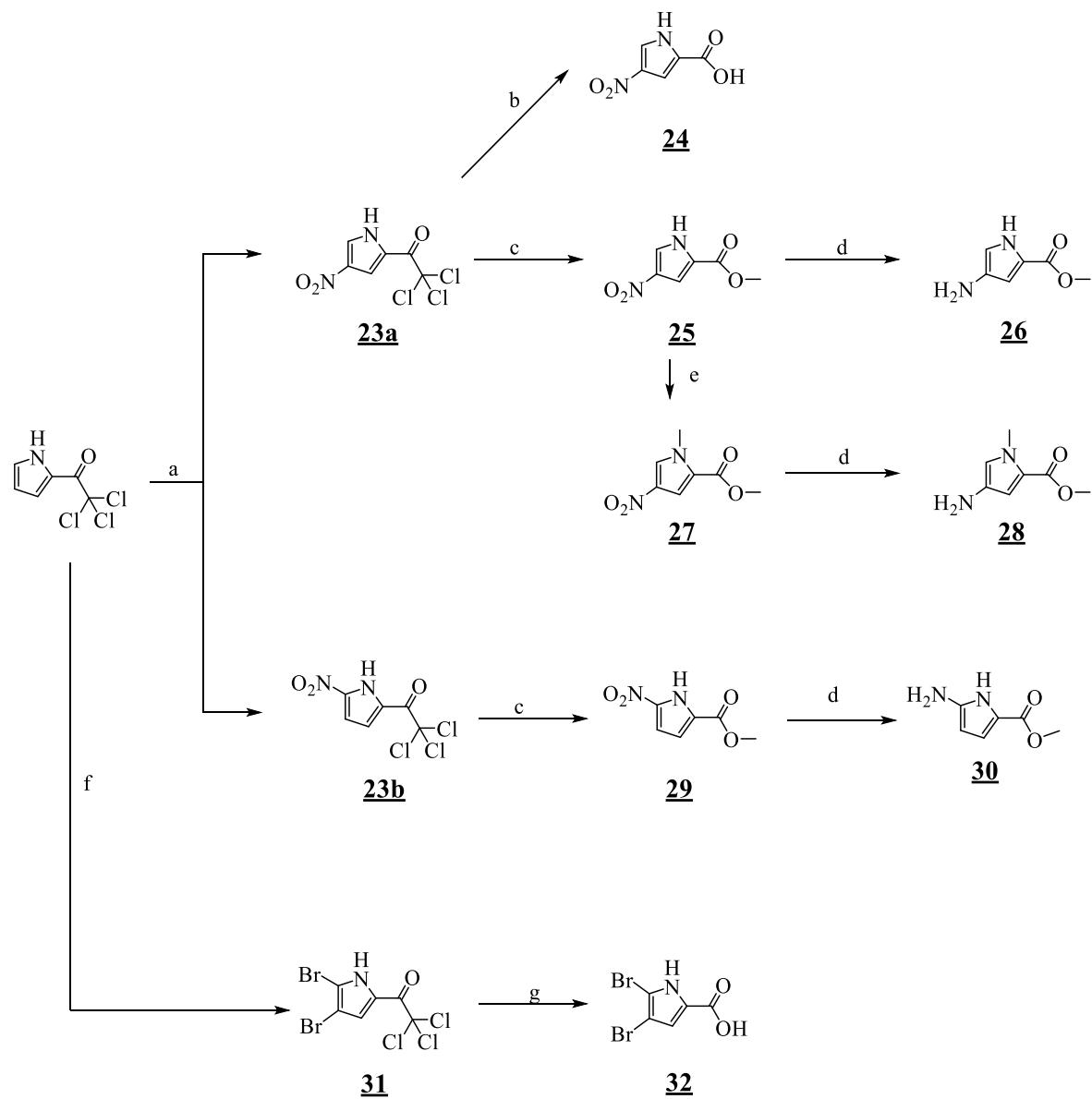
Za risanje spojin smo uporabljali ChemBioDraw Ultra 13.0 proizvajalca CambridgeSoft, za njihovo poimenovanje pa ChemDoodle 7.0 proizvajalca iChemLabs.

Biološko testiranje spojin

Biološko ovrednotenje girazne aktivnosti končnih spojin na *E. coli* je bilo izvedeno na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Sinteza pirolnih derivatov



(a) HNO_3 , Ac_2O , $-40^\circ\text{C} \rightarrow$ sobna T, Ar, 24 h; (b) 1 M NaOH , 1,4-dioksan, sobna T, 1 h;
 (c) NaOMe , MeOH , sobna T, 24 h; (d) H_2 , Pd/C , MeOH , sobna T, 24 h; (e) MeI , 60 %
 NaH , TBAI , DMF , Ar, 0°C , 24 h; (f) Br_2 , CHCl_3 , Ar, 72 h; (g) 1 M NaOH , THF , sobna T,
 1 h.

4.1.1 Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4-nitro-1*H*-pirol-2-il)-1-etanona (**23a**) in 2,2,2-trikloro-1-(5-nitro-1*H*-pirol-2-il)-1-etanona (**23b**)

Raztopino 2,2,2-trikloro-1-(1*H*-pirol-2-il)-1-etanona (18,8 g, 88,5 mmol) v acetanhidridu (142 mL) smo ohladili na -40 °C, jo prepihali z argonom in ji postopoma preko kapalnika dodajali 65 % dušikovo (V) kislino (35 mL). Reakcijsko zmes smo počasi segreli na sobno temperaturo in jo mešali čez noč v argonovi atmosferi. Naslednji dan smo dodali led (300 mL), oborjeni produkt odnučali in posušili. Tako po koncu nučanja smo preostali produkt ekstrahirali iz matičnice z DKM (2 × 50 mL). Združeni organski fazi smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (2 × 50 mL), posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in filtrat uparili pod znižanim tlakom. Obe frakciji (kristali in produkt iz ekstrakta) sta vsebovali zmes 4-nitro in 5-nitro derivata, zato smo ju združili. Produkta smo nato ločili in očistili s kolonsko kromatografijo (MF: DKM/EtOAc = 98/2). Reakcijo smo izvedli po literaturnem postopku (44).

2,2,2-trikloro-1-(4-nitro-1*H*-pirol-2-il)-1-etanon (23a**)**

Izgled	rumeni kristali
Izkoristek	30 %
TLC Rf	0,24 (MF: DKM)
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 9,77 (bs, 1H, Py ₂ -NH), 7,95 (dd, <i>J</i> ₁ = 3,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,4 Hz, 1H, Py ₂ -H), 7,85 (dd, <i>J</i> ₁ = 2,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,4 Hz, 1H, Py ₂ -H)

2,2,2-trikloro-1-(5-nitro-1*H*-pirol-2-il)-1-etanon (23b**)**

Izgled	rjavi kristali
Izkoristek	15 %
TLC Rf	0,43 (MF: DKM)
¹H NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 7,35 (d, 1H, <i>J</i> = 4,5 Hz, Py ₂ -H), 7,13 (d, 1H, <i>J</i> = 4,5 Hz, Py ₂ -H) Py ₂ -NH izmenljiv

4.1.2 Sinteza 4-nitro-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline (**24**) in 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline (**32**)

Izhodno spojino smo raztopili v topilu (40 mL), dodali 1 M NaOH (40 mL) ter mešali na sobni temperaturi eno uro. Reakcijsko zmes smo skoncentrirali pod znižanim tlakom, da je ves 1,4-dioksan uparel, in sprali z EtOAc (2 × 20 mL). Vodno raztopino smo nakisali s koncentrirano HCl do pH 2 in ekstrahirali produkt v EtOAc (2 × 20 mL). Združeni

organski fazi smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (2×20 mL), posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in filtrat uparili pod znižanim tlakom.

Spojino **24** smo pripravili iz spojine **23a** (1,42 g, 5,53 mmol) v 1,4-dioksanu kot topilu.

4-nitro-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline (24)

Izgled	belo-rumeni kristali
Izkoristek	100 %
TLC Rf	0,00 (MF: DKM)
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 12,99 (bs, 1H, COOH), 12,01 (bs, 1H, Py ₂ -NH), 8,03 (d, 1H, J = 1,8 Hz, Py ₂ -H), 7,21 (d, 1H, J = 1,8 Hz, Py ₁ -H)

Spojino **32** smo pripravili iz spojine **31** (3,00 g, 8,10 mmol) v THF kot topilu.

4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilna kislina (32)

Izgled	svetlo rjavi kristali
Izkoristek	100 %
TLC Rf	0,14 (MF: DKM/MeOH = 7/1)
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 12,97 (bs, 1H, COOH), 12,61 (bs, 1H, Py ₁ -NH), 6,83 (s, 1H, Py ₁ -H)

4.1.3 Sinteza metil 4-nitro-1-*H*-pirol-2-karboksilata (**25**) in metil 5-nitro-1-*H*-pirol-2-karboksilata (**29**)

Izhodno spojino (1 ekv.) smo raztopili v MeOH (100 mL), dodali NaOMe (1,5 ekv.) in mešali na sobni temperaturi čez noč. Po uparitvi topila pod znižanim tlakom smo surovi produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF: DKM/MeOH = 20/1, gradientno proti DKM/MeOH = 7/1).

Spojino **25** smo pripravili iz spojine **23a** (570 mg, 2,21 mmol).

metil 4-nitro-1*H*-pirol-2-karboksilat (25)

Izgled	beli kristali
Izkoristek	91 %
TLC Rf	0,72 (MF: DKM/MeOH = 7/1)
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 8,05 (s, 1H, Py ₂ -H), 7,24 (s, 1H, Py ₂ -H), 3,81 (s, 3H, CH ₃) Py ₂ -NH izmenljiv
¹³C NMR (100 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 160,46, 137,13, 125,02, 123,34, 110,02, 52,37

Spojino **29** smo pripravili iz spojine **23b** (700 mg, 2,71 mmol).

metil 5-nitro-1<i>H</i>-pirol-2-karboksilat (29)	
Izgled	svetlo rumeni kristali
Izkoristek	90 %
TLC Rf	0,76 (MF: DKM/MeOH = 7/1)
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 14,07 (bs, 1H, Py ₂ -NH), 7,15 (d, 1H, J = 4,3 Hz), 6,89 (d, 1H, J = 4,3 Hz), 3,84 (s, 3H, CH ₃)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 159,67, 139,79, 126,10, 115,28, 110,85, 52,11

4.1.4 Sinteza metil 4-amino-1-*H*-pirol-2-karboksilata (**26**), metil 4-amino-1-metil-1-*H*-pirol-2-karboksilata (**28**) in metil 5-amino-1*H*-pirol-2-karboksilata (**30**)

Reakcijo redukcije nitro skupine do amina smo izvedli po splošnem postopku katalitskega hidrogeniranja. Raztopino izhodne spojine v MeOH (40 mL) smo prepihali z argonom, ji dodali 10 % Pd na ogljiku, prepihali z H₂ in nato mešali v H₂ atmosferi čez noč. Pd smo nato odstranili s presesavanjem skozi guč, MeOH uparili pod znižanim tlakom, produkt posušili do suhega zaostanka na vakuumski črpalki in nadaljevali sintezni postopek brez vmesnega čiščenja spojine, saj naj bi bile spojine nestabilne na koloni (45; 46).

Spojino **26** smo pripravili iz spojine **25** (342 mg, 2,01 mmol).

metil 4-amino-1<i>H</i>-pirol-2-karboksilat (26)	
TLC Rf	0,40 (MF: DKM/MeOH = 7/1)

Spojino **28** smo pripravili iz spojine **27** (182 mg, 0,99 mmol).

metil 4-amino-1-metil-1<i>H</i>-pirol-2-karboksilat (28)	
TLC Rf	0,43 (MF: DKM/MeOH = 7/1)

Spojino **30** smo pripravili iz spojine **29** (342 mg, 2,01 mmol).

metil 5-amino-1<i>H</i>-pirol-2-karboksilat (30)	
TLC Rf	0,49 (MF: DKM/MeOH = 7/1)

4.1.5 Sinteza metil 1-metil-4-nitro-1*H*-pirol-2-karboksilata (**27**)

Raztopino spojine **25** (310 mg, 1,82 mmol, 1 ekv.) in reagenta TBAI (67 mg, 0,18 mmol, 0,1 ekv.) v brezvodnem DMF (5 mL) smo prepihali z argonom, jo ohladili na ledeni kopeli in dodali 60 % NaH (~ 91 mg, 2,3 mmol, 1,3 ekv.). Po 10 minutnem mešanju v argonovi

atmosferi smo dodali še MeI (227 µL, 3,64 mmol, 2 ekv.) in mešali še en dan. Reakcijski zmesi so nato dodali EtOAc (100 mL), jo sprali z destilirano vodo (2×10 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (2×10 mL), posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali ter filtrat uparili pod znižanim tlakom. Sledilo je čiščenje s kolonsko kromatografijo (MF: H/EtOAc = 6/1, gradiente proti H/EtOAc = 2/1).

metil 1-metil-4-nitro-1*H*-pirol-2-karboksilat (27)

Izgled	rumena amorfna snov
Izkoristek	65 %
TLC Rf	0,33 (MF: H/EtOAc = 6/1)
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 7,62 (d, J = 2,0 Hz, 1H, Py ₂ -H), 7,45 (d, J = 2,0 Hz, 1H, Py ₂ -H), 4,02 (s, 3H, Py ₂ -NCH ₃), 3,89 (s, 3H, COOCH ₃)

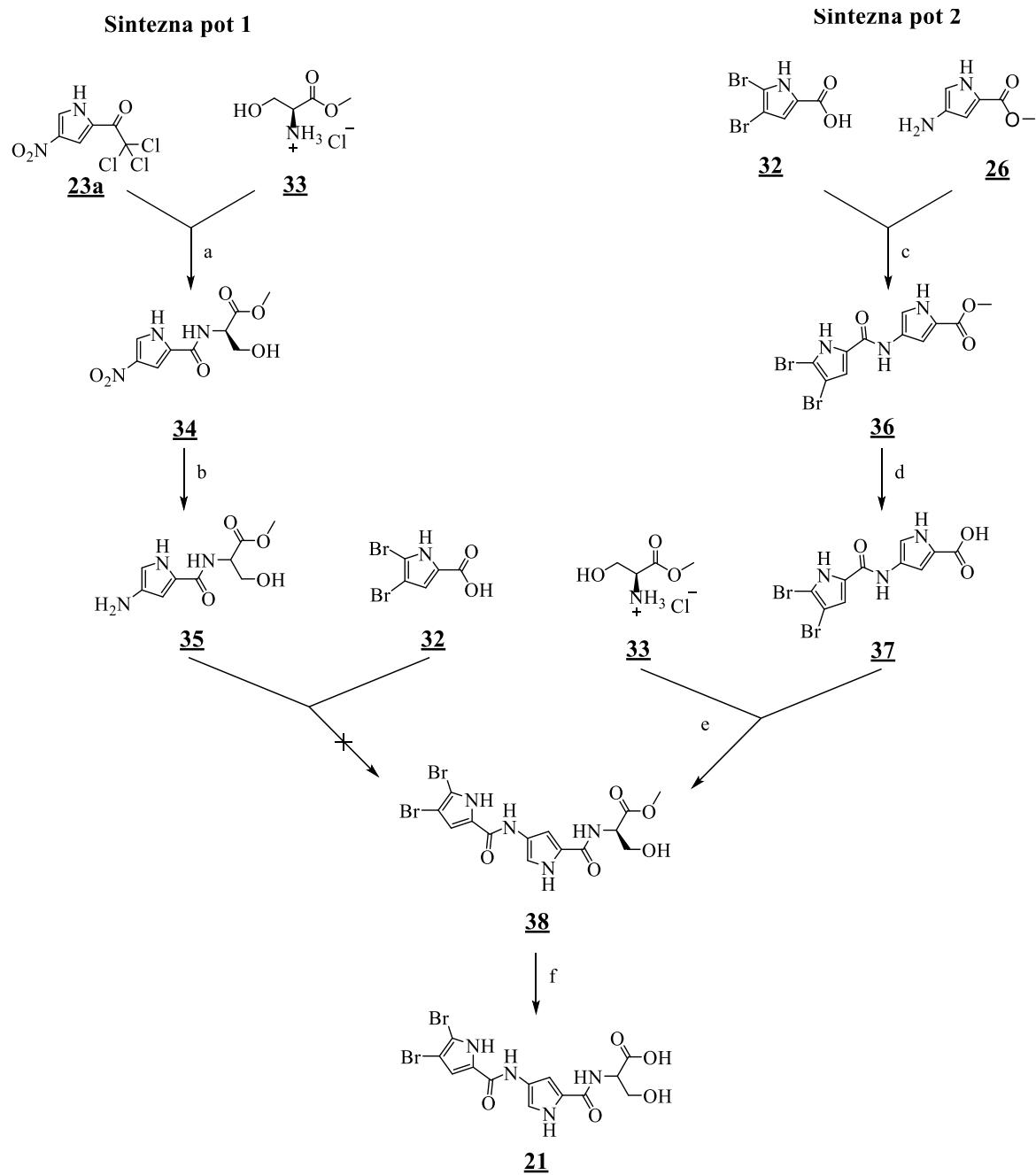
4.1.6 Sinteza 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)-1-etanon (31)

2,2,2-trikloro-1-(1*H*-pirol-2-il)-1-etanon (12,0 g, 56,7 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v kloroformu (300 mL) in prepihali z argonom. Nato smo preko kapalnika počasi dodali Br₂ (6,43 mL, 125 mmol, 2,2 ekv.) in mešali v argonovi atmosferi 3 dni. Reakcijski zmesi smo dodali nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (100 mL), odfiltrirali nastalo oborino in ločili fazi. Organsko fazo smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (2×50 mL), posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali, filtrat uparili pod znižanim tlakom do suhega zaostanka in produkt prekristalizirali iz kloroforma. Reakcijo smo izvedli po literaturnem postopku (47).

2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)-1-etanon (31)

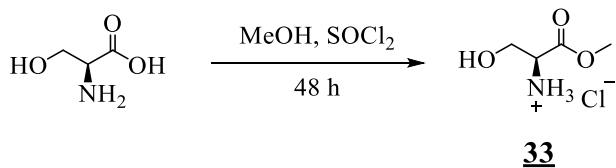
Izgled	temno rjavi kristali
Izkoristek	45 %
TLC Rf	0,45 (MF: H/E = 6/1)
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 13,77 (bs, 1H, Py ₁ -NH), 7,42 (d, J = 2,4 Hz, 1H, Py ₁ -H)

4.2 Sinteza serinskih derivatov 4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)-karbonilamino]-1*H*-pirol-2-karboksamida: spojini 38 in 21



(a) Et₃N, acetonitril, sobna T, 48 h; (b) H₂, Pd/C, MeOH, sobna T, 24 h; (c) NMM, EDC, HOBT, DMF/DKM (2/1), Ar, 0 °C, 1 h → sobna T, 24 h; (d) 0,5 M vodna raztopina LiOH, THF, sobna T, 24 h; (e) NMM, EDC, HOBT, DMF, Ar, 0 °C, 1 h → sobna T, 24 h; (f) 1 M vodna raztopina LiOH, THF, sobna T, 24 h.

4.2.1 Sinteza metilnega estra L-serina (**33**)



L-Serin (2,00 g, 19,0 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v MeOH (80 mL), ohladili na ledeni kopeli, počasi dodali SOCl_2 (2,02 mL, 28,6 mmol, 1,5 ekv.) in mešali en dan. Ker je bil po tem času serin še vedno prisoten v reakcijski zmesi, smo dodali še SOCl_2 (1,38 mL, 19,0 mmol, 1 ekv.) in mešali še en dan na sobni temperaturi. Po uparitvi topila pod znižanim tlakom smo produkt prekristalizirali iz dietiletra. Reakcijo smo izvedli po prilagojenem literaturnem postopku (48).

metilni ester L-serina (**33**)

Izgled	beli kristali
Izkoristek	77 %
TLC Rf	R_f (DKM/MeOH = 7/1) = 0,36
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 8,52 (bs, 2H, NH_2), 5,62 (t, J = 5,2 Hz, 1H, OH), 4,13 (t, J = 3,5 Hz, 1H, CH), 3,82 (m, 2H, CH_2), 3,75 (s, 3H, CH_3)

4.2.2 Sinteza metil 3-hidroksi-2-[(4-nitro-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]propionata (**34**)

Spojini **23a** (1 ekv.) in **33** (1,1 ekv.) smo raztopili v acetonitrilu in dodali bazo. Reakcijski pogoji in izkoristki reakcij so prikazani v preglednici I. Najuspešnejši je bil sledeči postopek: spojini **23a** (600 mg, 2,33 mmol, 1 ekv.) in **33** (400 mg, 2,56 mmol, 1,1 ekv.) smo raztopili v acetonitrilu (7 mL), bučko prepihali z argonom, dodali Et_3N (649 μL , 4,66 mmol, 2,2 ekv.) in mešali v argonovi atmosferi na sobni temperaturi 2 dni. Reakcijski zmesi smo nato uparili topilo pod znižanim tlakom, dodali EtOAc (100 mL) in sprali z 1 M HCl (2×25 mL). Organsko fazo smo sprali še z nasičeno vodno raztopino NaCl (2×25 mL), posušili nad brezvodnim Na_2SO_4 , filtrirali, filtrat uparili pod znižanim tlakom do suhega zaostanka in produkt prekristalizirali iz kloroformata.

Preglednica I: Reakcijski pogoji sinteze spojine **34**.

baza	temperatura in čas	izkoristek
Na ₂ CO ₃ (1 ekv.)	mikrovalovni reaktor: 70 °C, 20 W, 40 min	ni poteklo
Na ₂ CO ₃ (1 ekv.), Et ₃ N (1 ekv.)	mikrovalovni reaktor: 70 °C, 20 W, 40 min	20 %
Et ₃ N (2,2 ekv.)	sobna T, 48 h, Ar	81 %

metil 3-hidroksi-2-[(4-nitro-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]propionat (34)

Izgled	rumeni kristali
Izkoristek	81 %
TLC Rf	0,49 (MF: DKM/MeOH = 7/1)
T_{tal}	206 – 210 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 12,81 (bs, 1H, Py ₂ -NH), 8,67 (d, J = 7,6 Hz, 1H, CONH), 7,96 (dd, J ₁ = 3,6 Hz, J ₂ = 1,7 Hz, 1H, Py ₂ -H), 7,62 (dd, J ₁ = 2,6 Hz, J ₂ = 1,7 Hz, 1H, Py ₂ -H), 5,09 (t, J = 5,9 Hz, 1H, OH), 4,52 (dt, J ₁ = 7,4 Hz, J ₂ = 5,5 Hz, 1H, CH), 3,77 (dd, J ₁ = 5,7 Hz, J ₂ = 5,9 Hz 2H, CH ₂) 3,66 (s, 3H, CH ₃)
¹³C NMR (100 MHz,)	δ (ppm) = 171,33, 159,90, 136,82, 126,72, 123,35, 106,69, 61,43, 55,56, 52,44
MS – ESI	m/z (%): 194,0 (45), 238,0 ([M-H ₂ O] ⁻ , 55), 256,0 ([M-H] ⁻ , 100) Izračunano za C ₉ H ₁₀ N ₃ O ₆ [M-H] ⁻ (m/z): 256,0570
HRMS	Izmerjena vrednost (m/z): 256,0574
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹]: 3425, 3303, 3138, 2983, 2930, 2887, 1738, 1643, 1581, 1547, 1494, 1478, 1460, 1439, 1410, 1384, 1343, 1294, 1259, 1230, 1134, 1091
HPLC	t _R = 2,35 min (91,5 % pri 220 nm, 92,2 % pri 254 nm)
Optična sučnost	[α] _{576nm} ²⁰ = + 21,6 (c = 0,141 g/100 mL, MeOH)

4.2.3 Sinteza metil 2-[(4-amino-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-3-hidroksipropionata (**35**)

Spojino **34** (145 mg, 0,563 mmol) smo raztopili v mešanici MeOH (25 mL) in DMF (25 mL) ter raztopino prepihali z argonom. Nato smo dodali 10 % Pd na ogljiku, prepihali z H₂ in mešali v H₂ atmosferi en dan. Pd smo odstranili s presesavanjem skozi guč, topilo uparili pod znižanim tlakom, produkt posušili do suhega zaostanka na vakuumski črpalki in nadaljevali sintezni postopek brez vmesnega čiščenja spojine.

metil 2-[(4-amino-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-3-hidroksipropionata (35)

TLC Rf	0,2 (MF: DKM/MeOH = 7/1)
---------------	--------------------------

4.2.4 Sinteza metil 4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino)-1*H*-pirol-2-karboksilata (**36**)

Surovi produkt **26** (predpostavimo 2,01 mmol, 1 ekv.) in spojino **32** (595 mg, 2,21 mmol, 1,1 ekv.) smo raztopili v mešanici topil DMF (10 mL) in DKM (5 mL) ter prepihali z argonom. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli, dodali NMM (875 µL, 8,04 mmol, 4 ekv.), EDC (770 mg, 4,02 mmol, 2 ekv.) in HOBT (272 mg, 2,01 mmol, 1 ekv) ter mešali v argonovi atmosferi najprej eno uro na ledu, nato pa še čez noč pri sobni temperaturi. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom, dodali EtOAc (40 mL) in sprali z 1 M HCl (2 × 20 mL), pri čemer je bilo potrebno odnučati oborino na medfazi. Matičnico smo nato sprali še z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2 × 20 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (2 × 20 mL), posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali, filtrat uparili pod znižanim tlakom do suhega zaostanka ter produkt prekristalizirali iz EtOAc.

metil 4-[(4,5-dibromo-1<i>H</i>-pirol-2-il)karbonilamino)-1<i>H</i>-pirol-2-karboksilata (36)	
Izgled	svetlo rjavi kristali
Izkoristek	23 % (ob predpostavki 100% izkoristka sinteze spojine 26)
TLC R_f	0,35 (MF: Hex/EtOAc = 1/1 + 1% ocetne kisline)
T_{tal}	294 – 296 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 12,85 (bs, 1H, Py ₁ -NH), 11,77 (bs, 1H, Py ₂ -NH), 10,00 (s, 1H, CONH-Py ₂), 7,31 (dd, J ₁ = 3,0 Hz, J ₂ = 1,7 Hz, 1H, Py ₂ -H), 7,07 (d, J = 2,7, 1H, Py ₁ -H), 6,88 (dd, J ₁ = 2,7 Hz, J ₂ = 1,7 Hz 1H, Py ₂ -H), 3,77 (s, 3H, CH ₃)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 160,70, 156,09, 127,95, 124,15, 119,13, 114,13, 112,80, 106,20, 105,22, 97,97, 51,15
MS – ESI	m/z (%): 387,9 ([M-H] ⁻ , 50), 389,9 ([M-H] ⁺² ⁻ , 100), 391,9 ([M-H] ⁺⁴ ⁻ , 50)
HRMS	Izračunano za C ₁₁ H ₈ N ₃ O ₃ Br ₂ [M-H] ⁻ (m/z): 387,8932 Izmerjena vrednost (m/z): 387,8940
IR (ATR)	ν [cm ⁻¹]: 3419, 3362, 3211, 1690, 1647, 1568, 1538, 1476, 1436, 1404, 1344, 1310, 1285, 1321, 1189, 1117, 1103, 983, 967, 938, 796, 754, 737, 653, 613
HPLC	t _R = 8,43 min (91,4 % pri 220 nm, 92,0 % pri 254 nm)

4.2.5 Sinteza 4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino)-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline (**37**)

Spojino **36** (188 mg, 0,480 mmol) smo raztopili v THF (5 ml) in dodali 0,5 M vodno raztopino LiOH (5,00 ml, 5,2 ekv.). Po enem dnevu mešanja na sobni temperaturi reakcija ni potekla zadovoljivo, zato smo dodali LiOH (20 mg, 0,82 mmol, 1,7 ekv.) in mešali še en

dan. Po končani reakciji smo v reakcijsko zmes dodali 1 M NaOH (20 mL), sprali z EtOAc (2×10 mL), nakisali s koncentrirano HCl do pH 2 ter dodali EtOAc (20 mL). Produkt, ki se je oboril na medfazi, smo nato odnučali in posušili.

4-[(4,5-dibromo-1<i>H</i>-pirol-2-il)karbonilamino]-1<i>H</i>-pirol-2-karboksilne kisline (37)	
Izgled	rumeni kristali
Izkoristek	93 %
TLC R_f	0,23 (MF: Hex/EtOAc = 1/1 + 1% acetne kisline)
T_{tal}	215 – 219 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 12,84 (bs, 1H, Py ₁ -NH), 12,33 (bs, 1H, COOH), 11,57 (bs, 1H, Py ₂ -NH), 9,98 (s, 1H, CONH-Py ₂), 7,27 (dd, J_1 = 3,1 Hz, J_2 = 1,7 Hz, 1H, Py ₂ -H), 7,07 (s, 1H, Py ₁ -H), 6,78 (dd, J_1 = 2,8 Hz, J_2 = 1,7 Hz, 1H, Py ₂ -H)
¹³C NMR (100 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 162,84, 157,40, 127,59, 123,77, 120,40, 114,48, 112,95, 106,86, 104,93, 98, 71
MS – ESI	m/z (%): 373,9 ([M-H] ⁻ , 60), 375,9 ([M-H] ⁺² ⁻ , 100), 377,9 ([M-H] ⁺⁴ ⁻ , 60)
HRMS	Izračunano za C ₁₀ H ₆ N ₃ O ₃ Br ₂ [M-H] ⁻ (m/z): 373,8776 Izmerjena vrednost (m/z): 373,8772
IR	$\bar{\nu}$ [cm ⁻¹]: 3340, 3262, 3135, 1692, 1618, 1592, 1489, 1438, 1413, 1346, 1327, 1297, 1231, 1207, 1115, 986, 822, 777, 762, 748
HPLC	t _R = 6,64 min (99,2 % pri 220 nm, 98,8 % pri 254 nm)

4.2.6 Sintiza metil 2-({4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1*H*-pirol-2-il}karbonilamino)-3-hidroksipropionata (38)

Sintezna pot I: Spojino **38** smo neuspešno poskusili sintetizirati iz spojine **35** (1 ekv.) in spojine **32** (1,1 ekv.) v argonovi atmosferi pod različnimi reakcijskimi pogoji, ki so prikazani v preglednici II. Poskuse izolacije smo izvedli po sledečem postopku: topilo smo uparili pod znižanim tlakom, dodali EtOAc (50 mL), sprali z 1 M HCl (2×20 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (2×20 mL), posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in filtrat uparili pod znižanim tlakom do suhega zaostanka. Sledilo je čiščenje s kolonsko kromatografijo (MF: Hex/EtOAc = 1/1 z 1% acetne kisline, gradientno proti EtOAc z 1% acetne kisline). Spojine **38** nam ni uspelo identificirati, zato smo sintezno pot I opustili.

Preglednica II: Reakcijski pogoji neuspešnih poskusov sinteze spojine **38**.

baza	topilo	sklopitveni reagent	katalizator	temperatura in čas
Et ₃ N (2,5 ekv.)	DMF	TBTU (2,5 ekv.)	DMAP (0,1 ekv.)	sobna T, 48 h
Et ₃ N (1,5 ekv.)	DMF	TBTU (3 ekv.)	DMAP (0,1 ekv.)	sobna T, 96 h 70 °C, 48 h

NMM (3 ekv.)	DMF	EDC (2,5 ekv.)	DMAP (1 ekv.)	sobna T, 120 h
NMM (1 ekv.)	DKM/DMF (1/1)	TBTU (1,5 ekv.)	DMAP (1 ekv.)	sobna T, 24 h 40 °C, 24 h

Sintezna pot 2: Spojini **37** (53 mg, 0,141 mmol, 1 ekv.) in **33** (24 mg, 0,155 mmol, 1,1, ekv.) smo raztopili v DMF (10 mL) in dodali NMM (107 µL, 0,984 mmol, 7 ekv.). Zmes smo ohladili na ledeni kopeli, dodali EDC (54 mg, 0,281 mmol, 2 ekv.) in HOBT (19 mg, 0,141 mmol, 1 ekv.) ter najprej mešali eno uro na ledu nato pa še čez noč na sobni temperaturi. DMF smo odstranili pod znižanim tlakom, dodali EtOAc (10 mL) in sprali z 1 M HCl (2 × 10 mL) ter nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2 × 10 mL). Organsko fazo smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (2 × 10 mL), posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in filtrat uparili pod znižanim tlakom do suhega zaostanka. Produkt smo nato očistili s kolonsko kromatografijo (MF: Hex/EtOAc = 1/1, gradientno proti EtOAc).

2-({4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1*H*-pirol-2-il}karbonilamino)-3-hidroksipropionat (**38**)

Izgled	bledo rumeni kristali
Izkoristek	56 %
TLC Rf	0,27 (MF: DKM/MeOH = 7/1)
T _{tal}	198 – 203 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 12,80 (bs, 1H, Py ₁ -NH), 11,35 (bs, 1H, Py ₂ -NH), 9,95 (s, 1H, Py ₁ -CONH), 8,20 (d, J = 7,8 Hz, 1H, Py ₂ -CONH), 7,18 (dd, J ₁ = 3,0 Hz, J ₂ = 1,6 Hz, 1H, Py ₂ -H), 7,10 (d, J = 2,6 Hz, 1H, Py ₁ -H), 6,96 (dd, J ₁ = 2,6 Hz, J ₂ = 1,6 Hz, 1H, Py ₂ -H), 5,07 (t, J = 6,1 Hz, 1H, OH), 4,51 (dm, J ₁ = 7,6 Hz, J ₂ = 5,3 Hz, 1H, CH), 3,77 (m, J = 6,0 Hz, 2H, CH ₂), 3,65 (s, 3H, CH ₃)
¹³ C NMR (100 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 171,21, 161,83, 157,49, 127,62, 123,56, 122,77, 113,39, 112,87, 104,91, 103,47, 98,67, 61,64, 54,80, 51,47
MS – ESI	m/z (%): 474,9 ([M-H] ⁻ , 45), 476,9 ([M-H] ⁺²], 100), 478,9 ([M-H] ⁺⁴], 55)
HRMS	Izračunano za C ₁₄ H ₁₃ Br ₂ N ₄ O ₅ [M-H] ⁻ (m/z): 474,9253 Izmerjena vrednost (m/z): 474,9239
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹]: 3427, 3384, 3241, 2952, 1739, 1672, 1643, 1586, 1510, 1479, 1416, 1313, 1203, 1131, 1075, 973, 822
HPLC	t _R = 6,00 min (97,0% pri 220 nm, 95,0 % pri 254 nm)
Specifična sučnost	[α] _D ²⁰ = + 9,46 (c = 0,262 g/100 mL, MeOH)

4.2.7 Sinteza 2-({4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1*H*-pirol-2-il}karbonilamino)-3-hidroksipropionske kisline (**21**)

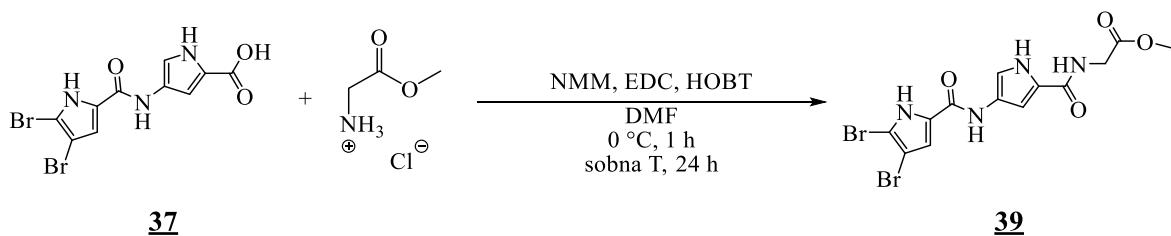
Spojino **21** smo pripravili po splošnem postopku hidrolize metilnega estra do karboksilne kisline. Spojino **38** (18 mg, 0,038 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v THF (1,5 mL), dodali 1 M

vodno raztopino LiOH (1,5 mL, 1,52 mmol, 4 ekv.) in mešali na sobni temperaturi 1 dan. Po končani reakciji smo dodali v reakcijsko zmes 1 M NaOH (10 mL), sprali z EtOAc ($2 \times$ 10 mL), nakisali s koncentrirano HCl do pH 2 in odnucali izpadli produkt.

2-({4-[{(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1*H*-pirol-2-il}karbonilamino)-3-hidroksipropionska kislina (21)}

Izgled	rjavi kristali
Izkoristek	85 %
T _{tal}	> 300 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 12,80 (bs, 1H, Py ₁ -NH), 12,65 (bs, 1H, COOH), 11,35 (bs, 1H, Py ₂ -NH), 9,95 (s, 1H, Py ₁ -CONH), 8,03 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H, Py ₂ - CONH), 7,18 (dd, <i>J</i> ₁ = 3,0 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,5 Hz, 1H, Py ₂ -H), 7,10 (d, <i>J</i> = 2,7 Hz, 1H, Py ₁ -H), 6,94 (dd, <i>J</i> ₁ = 2,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,4 Hz, 1H, Py ₂ -H), 5,01 (t, <i>J</i> = 6,0 Hz, 1H, OH), 4,44 (m, 1H, CH), 3,75 (m, 2H, CH ₂)
MS – ESI	m/z (%): 460,9 ([M-H] ⁻ , 50), 462,9 [(M-H)+2] ⁻ , 100), 464,9 [(M-H)+4] ⁻ , 50)
HRMS	Izračunano za C ₁₃ H ₁₁ Br ₂ N ₄ O ₅ [M-H] ⁻ (m/z): 460,9096 Izmerjena vrednost (m/z): 460,9101
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹]: 3337, 2948, 2360, 1721, 1633, 1584, 1539, 1414, 1319, 1201, 1077, 999, 972, 817
HPLC	t _R = 4,88 min (97,5 % pri 220 nm, 96,7 % pri 254 nm)

4.3 Sinteza glicinskega derivata 4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1*H*-pirol-2-karboksamida: spojina 39



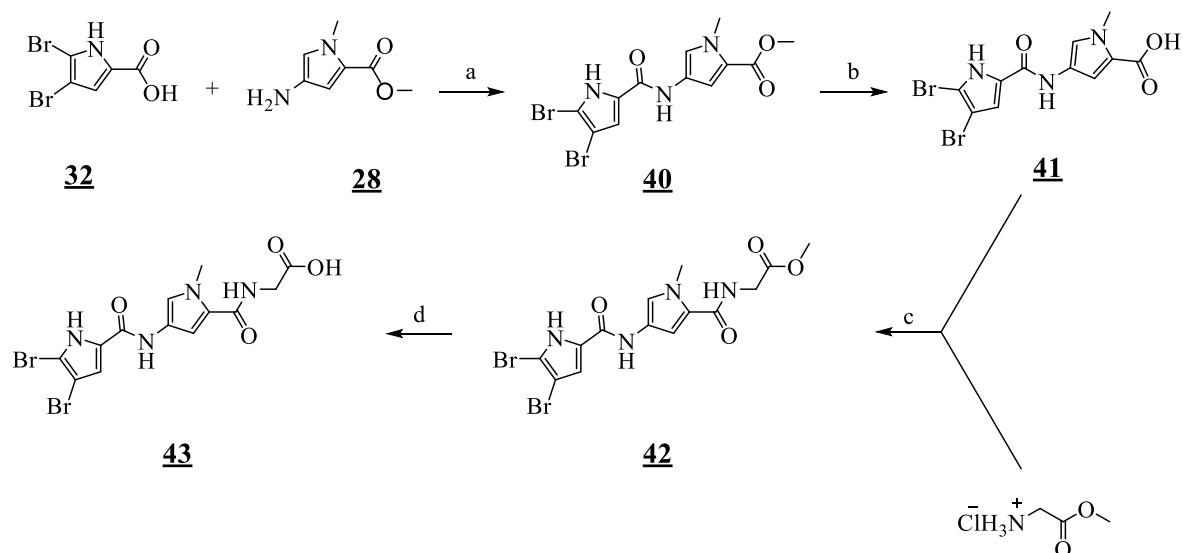
Spojino **37** (95 mg, 0,252 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v DMF in dodali metilni ester glicina (35 mg, 0,277 mmol, 1,1 ekv.) ter NMM (0,11 mL, 1,008 mmol, 4 ekv.). Zmes smo ohladili na 0 °C, dodali TBTU (89 mg, 0,277 mmol, 1,1 ekv.) in mešali čez noč na sobni temperaturi. Naslednji dan je TLC razkrival nezreagirane ostanke spojine **37**, zato smo dodali še metilni ester glicina (10 mg, 0,080 mmol, 0,32 ekv.) in TBTU (20 mg, 0,062 mmol, 0,25 ekv.) ter mešali še en dan. Ker reakcija še vedno ni zadovoljivo potekla, smo dodali še metilni ester glicina (32 mg, 0,252 mmol, 1,0 ekv.), EDC (48 mg, 0,26 mmol, 1,0 ekv.) in NMM (0,11 mL, 1,008 mmol, 4 ekv.) ter mešali še en dan na sobni temperaturi.

DMF smo uparili pod znižanim tlakom, dodali 1 M HCl (10 mL) in produkt ekstrahirali v EtOAc (2×10 mL). Združeni organski fazi smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2×10 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (2×10 mL), posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in filtrat skoncentrirali pod znižanim tlakom. Produkt smo nato prekristalizirali iz EtOAc.

metil ({4-[({4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il})karbonilamino]-1*H*-pirol-2-il}karbonilamino)acetat (39)

Izgled	svetlo rjavi kristali
Izkoristek	53 %
TLC Rf	0,48 (MF: EtOAc)
T_{tal}	> 300 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 12,88 (bs, 1H, Py ₁ -NH), 11,30 (bs, 1H, Py ₂ -NH), 9,98 (s, 1H, Py ₁ -CONH), 8,56 (t, $J = 5,7$ Hz, 1H, Py ₂ -CONH), 7,21 (dd, $J_1 = 2,9$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz, 1H, Py ₂ -H), 7,11 (s, 1H, Py ₁ -H), 6,88 (dd, $J_1 = 2,7$ Hz, $J_2 = 1,5$ Hz, 1H, Py ₂ -H), 3,95 (d, $J = 6,2$ Hz, 2H, CH ₂), 3,66 (s, 3H, CH ₃)

4.4 Sinteza glicinskih derivatov 4-[({4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il})karbonilamino]-1-metil-1*H*-pirol-2-karboksamida: spojini **42** in **43**



(a) NMM, EDC, HOBT, DMAP, DKM, Ar, 0 °C, 1 h → sobna T, 72h; (b) 1 M vodna raztopina LiOH, THF, sobna T, 72 h (c) NMM, EDC, HOBT, DMF, Ar, 0 °C, 1 h → sobna T, 24 h; (d) 1 M vodna raztopina LiOH, THF, sobna T, 24 h.

4.4.1 Sinteza metil 4-[(4,5-dibromo-1H-pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1H-pirol-2-karboksilata (**40**)

Spojini **32** (296 mg, 1,10 mmol, 1,1 ekv.) in **28** (154 mg, 1,0 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v DKM (10 mL), prepihali z argonom in dodali NMM (326 µL, 3,0 mmol, 3 ekv.). Zmes smo ohladili na ledeni kopeli, dodali EDC (249 mg, 1,30 mmol, 1,3 ekv.), HOBT (27 mg, 0,20 mmol, 0,2 ekv.) in DMAP (24 mg, 0,20 mmol, 0,2 ekv.) ter mešali v argonovi atmosferi najprej eno uro na ledu, nato pa še tri dni na sobni temperaturi. Ker reakcija ni zadovoljivo potekla, smo dodali še DMF (10 mL) in mešali pri 45 °C čez noč. DMF smo uparili pod znižanim tlakom, dodali EtOAc (50 mL) in sprali z 1 M HCl (2 × 20 mL) ter nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2 × 20 mL). Organsko fazo smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (2 × 20 mL), posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in filtrat uparili pod znižanim tlakom. Produkt smo nato prekristalizirali iz EtOAc.

metil 4-[(4,5-dibromo-1H-pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1H-pirol-2-karboksilat (40)

Izgled	svetlo rjavi kristali
Izkoristek	36 %
TLC R_f	0,53 (MF: Hex/EtOAc = 1/1 + 1% ocetne kisline)
T_{tal}	262 – 264 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 12,83 (bs, 1H, Py ₁ -NH), 9,99 (bs, 1H, Py ₁ -CONH), 7,41 (d, J = 2,0 Hz, 1H, Py ₂ -H), 7,07 (d, J = 2,2 Hz 1H, Py ₁ -H), 6,88 (d, J = 2,0 Hz, 1H, Py ₂ -H), 3,86 (s, 3H, NCH ₃ ali COOCH ₃), 3,75 (s, 3H, NCH ₃ ali COOCH ₃)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 160,70, 156,03, 127,85, 122,23, 120,65, 118,81, 112,89, 108,15, 105,24, 97,98, 51,01, 36,27
MS – ESI	m/z (%): 401,9 ([M-H] ⁻ , 50), 403,9 ([M-H] ⁺² , 100), 405,9 ([M-H] ⁺⁴ , 50)
HRMS	Izračunano za C ₁₂ H ₁₀ Br ₂ N ₃ O ₃ [M-H] ⁻ (m/z): 401,9089 Izmerjena vrednost (m/z): 401,9091
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3365, 3146, 3125, 2952, 2855, 1689, 1650, 1576, 1543, 1482, 1447, 1414, 1354, 1321, 1267, 1239, 1224, 1192, 1147, 1126, 1096, 1057, 1012, 973, 871, 814, 792, 746
HPLC	t _R = 10,15 min (99,0 % pri 220 nm, 98,5 % pri 254 nm)
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₂ H ₁₁ Br ₂ N ₃ O ₃ : % C = 35,58, % H = 2,74 % N = 10,37 Izmerjena vrednost : % C = 35,62, % H = 2,79, % N = 10,25

4.4.2 Sinteza 4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline (41**)**

Spojino **41** smo pripravili po splošnem postopku hidrolize metilnega estra do karboksilne kisline, ki je opisan poglavju 4.2.7 *Sinteza 2-(4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino)-3-hidroksipropionske kisline (**21**)*. Pri tem smo izhajali iz spojine **40** (115 mg, 0,284 mmol, 1 ekv.).

4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1*H*-pirol-2-karboksilna kisline (41**)**

Izgled	rumeno-rjavi kristali
Izkoristek	95 %
TLC Rf	0,50 (MF: DKM/MeOH = 7/1+ 1% ocetne kisline)
T_{tal}	186 – 190 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 10,15 (bs, 1H, Py ₁ -CONH-), 7,24 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H, Py ₂ -H), 6,98 (s, 1H, Py ₁ -H), 6,74 (d, <i>J</i> = 2,0 Hz, 1H, Py ₂ -H), 3,84 (s, 3H, NCH ₃) Py ₁ -NH in COOH sta izmenljiva
¹³C NMR (100 MHz,)	δ (ppm) = 172,36, 163,45, 156,78, 129,19, 122,70, 122,00, 118,30, 113,11, 107,14, 106,03, 96,90, 36,05, 21,50
MS – ESI	m/z (%): 343,9 ([M-COOH] ⁺ , 35), 345,9 ([M-COOH] ⁺² , 65), 347,9 ([M-COOH] ⁺⁴ , 35) 387,9 ([M-H] ⁺ , 50), 389,9 ([M-H] ⁺² , 100), 391,9 ([M-H] ⁺⁴ , 50)
HRMS	Izračunano za C ₁₁ H ₈ Br ₂ N ₃ O ₃ [M-H] ⁺ (m/z): 387,8932 Izmerjena vrednost (m/z): 387,8940
IR (KBr)	\bar{v} [cm ⁻¹] = 3423, 3176, 2989, 2659, 1697, 1625, 1595, 1464, 1423, 1329, 1292, 1194, 1145, 1112, 1062, 1010, 991, 974, 830, 808, 783
HPLC	t _R = 7,77 min (98,7 % pri 220 nm, 98,0 % pri 254 nm)

4.4.3 Sinteza metil ({4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1*H*-pirol-2-il}karbonilamino)etanoat (42**)**

Spojini **41** (100 mg, 0,256 mmol, 1ekv.) in metilni ester glicina (35,3 mg, 0,281 mmol, 1,1 ekv.) smo raztopili v DMF (10 mL), prepihali z argonom, dodali NMM (111 µL, 1,024 mmol, 4 ekv.) in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo dodali EDC (98 mg, 0,414 mmol, 2 ekv.) in HOBT (35 mg, 0,256 mmol, 1 ekv.) ter mešali v argonovi atmosferi najprej eno uro na ledu, nato pa še čez noč na sobni temperaturi. DMF smo uparili pod znižanim tlakom, dodali EtOAc (10 mL) in sprali z 1 M HCl (2 × 10 mL) ter nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2 × 10 mL). Organsko fazo smo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl (2 × 10 mL), posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in filtrat uparili pod znižanim

tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: Hex/EtOAc = 1/1, gradientno proti EtOAc).

metil ({4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1*H*-pirol-2-il}karbonilamino)etanoat (42)

Izgled	rumeni kristali
Izkoristek	53 %
TLC Rf	0,56 (MF: Hex/EtOAc = 7/1)
T_{tal}	190 – 195 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 12,79 (bs, 1H, Py ₁ -NH), 9,99 (s, 1H, Py ₁ -CONH-), 8,50 (t, J = 5,9 Hz, 1H, Py ₂ -CONH-), 7,25 (d, J = 1,9 Hz, 1H, Py ₂ -H), 7,11 (d, J = 2,2 Hz, 1H, Py ₁ -H), 6,87 (d, J = 1,9 Hz, 1H, Py ₂ -H), 3,92 (d, J = 5,9 Hz, 2H, CH ₂), 3,82 (s, 3H, N-CH ₃) 3,66 (s, 3H, COOCH ₃)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 170,70, 161,37, 155,99, 127,91, 122,26, 121,60, 118,61, 112,80, 104,99, 104,41, 98,01, 51,49, 40,58, 36,04
MS – ESI	m/z (%): 458,9 ([M-H] ⁻ , 35), 460,9 ([M-H]+2] ⁻ , 100), 462,9 ([M-H]+4] ⁻ , 50
HRMS	Izračunano za C ₁₄ H ₁₃ Br ₂ N ₄ O ₄ [M-H] ⁻ (m/z): 458,9304 Izmerjena vrednost (m/z): 458,9299
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3417, 3323, 3221, 3125, 2953, 1743, 1646, 1619, 1574, 1549, 1464, 1437, 1408, 1365, 1313, 1289, 1219, 1194, 1160, 1143, 973, 802, 782, 750

4.4.4 Sinteza {4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1*H*-pirol-2-il}karbonilamino)etanojska kislina (43)

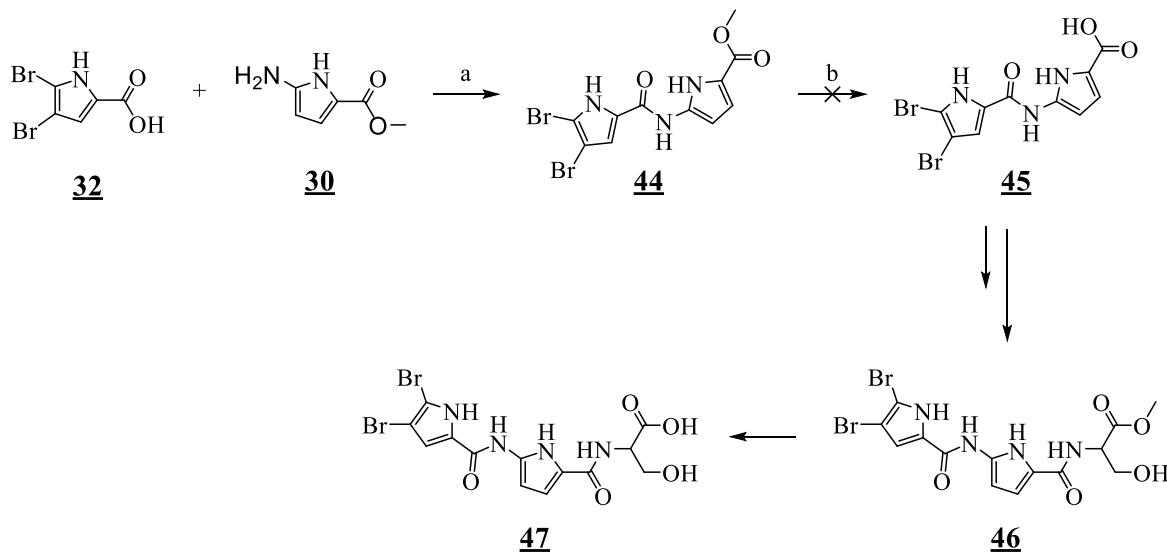
Spojino **43** smo pripravili s splošnim postopkom hidrolize metilnega estra do karboksilne kisline, ki je opisan v poglavju 4.2.7 *Sinteza 2-({4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1*H*-pirol-2-il}karbonilamino)-3-hidroksipropionske kislino (21)*. Pri tem smo izhajali iz spojine **42** (50 mg, 0,108 mmol, 1 ekv.).

{4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1*H*-pirol-2-il}karbonilamino)etanojska kislina (43)

Izgled	svetlo rumeni kristali
Izkoristek	86 %
T_{tal}	167 – 170 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 12,79 (bs, 1H, Py ₁ -NH), 9,97 (s, 1H, Py ₁ -CONH-), 8,38 (t, J = 6,0 Hz, 1H, Py ₂ -CONH-), 7,25 (d, 1H, J = 1,9 Hz, Py ₂ -H), 7,11 (s, 1H, Py ₁ -H), 6,85 (d, J = 1,9 Hz, 1H, Py ₂ -H), 3,83 (s, 2H, CH ₂), 3,82 (s, 3H, N-CH ₃)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 171,60, 161,31, 155,98, 128,05, 122,46, 121,49, 118,37, 112,63, 104,98, 104,32, 97,87, 40,58, 36,21
MS – ESI	m/z (%): 444,9 ([M-H] ⁻ , 45), 446,9 ([M-H]+2] ⁻ , 100), 448,9

HRMS	([(M-H)+4] ⁺ , 50) Izračunano za C ₁₃ H ₁₁ Br ₂ N ₄ O ₄ [M-H] ⁺ (m/z): 444,9147 Izmerjena vrednost (m/z): 444,9141
HPLC	t _R = 6,41 min (97,4 % pri 220 nm, 96,3 % pri 254 nm)
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₃ H ₁₂ Br ₂ N ₄ O ₄ : % C = 34,85, % H = 2,70, % N = 12,50 Izmerjena vrednost: % C = 34,11, % H = 2,92, % N = 11,93

4.5 Poskus sinteze serinskih derivatov 5-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1*H*-pirol-2-karboksamida: spojini **45** in **46**



(a) NMM, EDC, HOBT, DMF/DKM (2/1), Ar, 0 °C, 1 h → sobna temperatura, 24 h.

4.5.1 Sinteza metil 5-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1*H*-pirol-2-karboksilata (**44**)

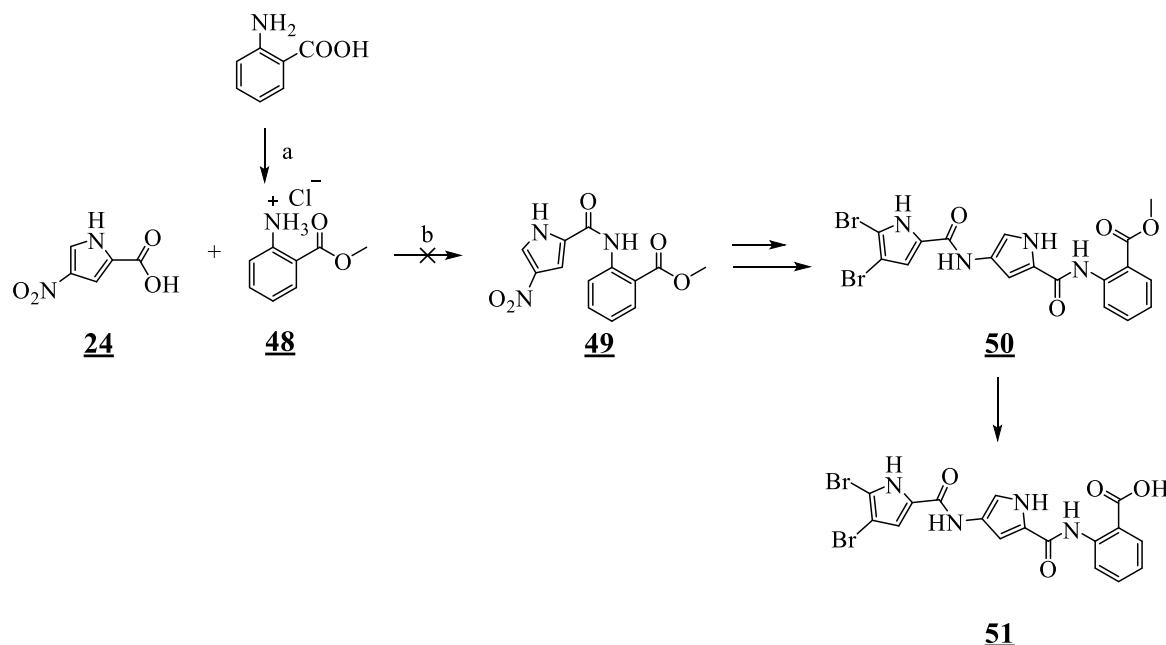
Surovi produkt **30** (predpostavimo 2,44 mmol, 1 ekv.) in spojino **32** (722 mg, 2,69 mmol, 1,1 ekv.) smo raztopili v mešanici topil DMF (10 mL) in DKM (5 mL) ter prepihali z argonom. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli, dodali NMM (1,06 mL, 9,76 mmol, 4 ekv.), EDC (936 mg, 4,88 mmol, 2 ekv.) in HOBT (330 mg, 2,44 mmol, 1 ekv) ter mešali najprej v argonovi atmosferi eno uro na ledu, nato pa čez noč pri sobni temperaturi. Topili smo uparili pod znižanim tlakom, dodali EtOAc (40 mL) in sprali z 1 M HCl (2 × 20 mL), pri čemer smo odnučali oborino na medfazi. Matičnico smo nato sprali še z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2 × 20 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (2 × 20 mL), posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali, filtrat uparili pod znižanim tlakom in produkt prekristalizirali iz EtOAc.

metil 5-[(4,5-dibromo-1<i>H</i>-pirol-2-il)karbonilamino]-1<i>H</i>-pirol-2-karboksilata (44)	
Izgled	rjavi kristali
Izkoristek	16 % (ob predpostavki 100 % izkoristka sinteze spojine 30)
TLC R_f	0,38 (MF: DKM/MeOH = 7/1)
T_{tal}	268 – 274 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 13,05 (bs, 1H, Py ₁ -NH), 11,13 (bs, 1H, Py ₂ -NH), 10,56 (bs, 1H, CONH), 7,09 (s, 1H, Py ₁ -H), 6,80 (dd, J_1 = 3,7 Hz, J_2 = 2,9 Hz, 1H, Py ₂ -H), 6,02 (dd, J_1 = 3,7 Hz, J_2 = 2,5 Hz, 1H, Py ₂ -H), 3,76 (s, 3H, CH ₃)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 160,33, 156,65, 133,06, 126,91, 115,70, 115,53, 113,92, 106,84, 98,57, 98,41, 51,01
MS – ESI	m/z (%): 387,9 ([M-H] ⁻ , 50), 389,9 ([M-H] ⁺² , 100), 391,9 ([M-H] ⁺⁴ , 50)
HRMS	Izračunano za C ₁₁ H ₈ Br ₂ N ₃ O ₃ [M-H] ⁻ (m/z): 387,8932 Izmerjena vrednost (m/z): 387,8941
IR	\bar{v} [cm ⁻¹] = 3404, 3127, 2953, 1689, 1649, 1596, 1552, 1502, 1423, 1385, 1317, 1240, 1185, 1126, 1041, 984, 929, 865, 818, 776, 744, 621
HPLC	t _R = 10,0 min (92,4 % pri 220 nm, 93,5 % pri 254 nm)

4.5.2 Poskus sinteza 5-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline (**45**)

Spojino **44** (120 mg, 0,307 mmol) smo raztopili v THF (5 ml) in dodali 0,5 M vodno raztopino LiOH (5 ml, 2,45 mmol, 8 ekv.). Po enem dnevu mešanja na sobni temperaturi reakcija ni potekla zadovljivo, zato smo dodali LiOH (20 mg, 0,818 mmol, 2,7 ekv.) in mešali še en dan. Po končani reakciji smo dodali v reakcijsko zmes 1 M NaOH (20 mL), sprali z EtOAc (2 × 10mL), nakisali s koncentrirano HCl do pH 2 in ekstrahirali v EtOAC, pri čemer je bilo potrebno odfiltrirati oborino na medfazi. Želenega produkta nam ni uspelo identificirati v končni zmesi.

4.6 Poskus sinteze 2-aminobenzoatnih derivatov 4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)-karbonilamino]-1*H*-pirol-2-karboksamida: spojini **50** in **51**



(a) SOCl_2 , MeOH , $0\text{ }^\circ\text{C}$, 1 h → sobna temperatura, 24 h.

4.6.1 Sinteza metil 2-aminobenzoata (**48**)

2-aminobenzojsko kislino (2,000 g, 14,58 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v MeOH (80 mL), ohladili na ledeni kopeli in dodali SOCl_2 (1,59 mL, 21,88 mmol, 1,5 ekv.) ter mešali najprej eno uro na ledeni kopeli, nato pa še čez noč na sobni temperaturi. Zaradi slabega poteka reakcije smo naslednji dan dodali reakcijski zmesi še SOCl_2 (1,06 mL, 14,58 mmol, 1 ekv.) in mešali pri $80\text{ }^\circ\text{C}$ še en dan. Ker to še vedno ni zadostovalo, smo dodali še SOCl_2 (10,60 mL, 145,8 mmol, 10 ekv.) in mešali pri $80\text{ }^\circ\text{C}$ še tri dni. Topilo smo nato uparili pod znižanim tlakom do suhega zaostanka in produkt prekristalizirali iz dietiletra. Reakcijo smo izvedli po prilagojenem literturnem postopku (48).

metil 2-aminobenzoat (48)	
Izgled	bledo rumeni kristali
Izkoristek	95 %
TLC R_f	0,24 (MF: DKM/MeOH = 7/1)
¹H NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 7,72 (ddd, J_1 = 8,0 Hz, J_2 = 3,5 Hz, J_3 = 1,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,28 (ddd, J_1 = 8,3 Hz, J_2 = 7,1 Hz, J_3 = 3,6 Hz, 1H, Ar-H), 6,83 (ddd, J_1 = 8,4 Hz, J_2 = 3,5 Hz, J_3 = 1,8 Hz, 1H, Ar-H), 6,59 (ddd, J_1 = 7,9 Hz, J_2 = 7,0 Hz, J_3 = 1,8 Hz, 1H, Ar-H), 5,65 (bs, 2H, NH ₂), 3,79 (s, 3H, CH ₃)

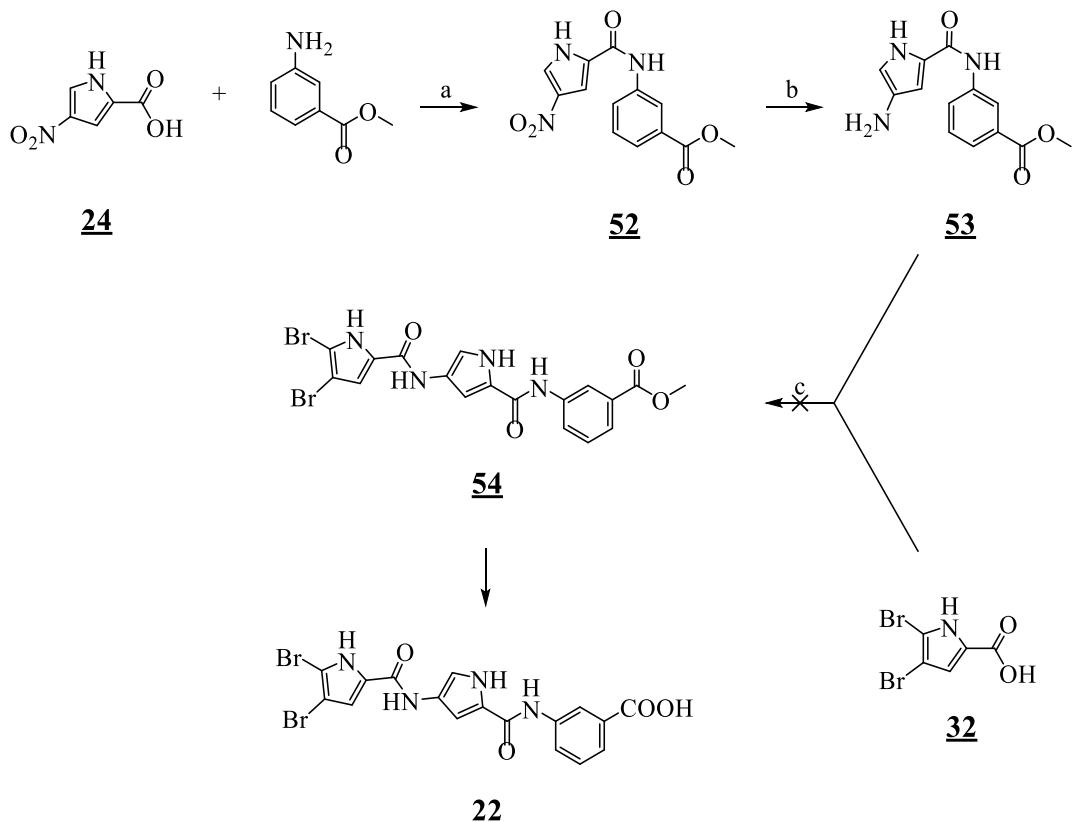
4.6.2 Poskus sinteze metil 2-[(4-nitro-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]benzoata (**49**)

Spojino **49** smo neuspešno poskusili sintetizirati iz spojin **24** (1 ekv.) in **48** (1 ekv.) v brezvodnem THF v argonovi atmosferi pod različnimi reakcijskimi pogoji, ki so prikazani v preglednici III. Poskus izolacije smo izvedli z dodatkom EtOAc (40 mL) v reakcijsko zmes, ki smo jo nato sprali z 2 M raztopino HCl (2 × 15 mL), nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2 × 15 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (2 × 15 mL) ter jo posušili z brezvodnim Na₂SO₄. Spojino smo poskusili tako prekristalizirali it EtOAc kot očistili s kolonsko kromatografijo (MF: Hex/EtOAc = 4/1, gradientno proti Hex/EtOAc = 1/1), a nam želenega produkta ni uspelo identificirati, zato smo sintezo 2-aminobenzojskih derivatov opustili.

Preglednica III: Reakcijski pogoji neuspešnih poskusov sinteze spojine **49**.

baza	sklopitveni reagent	katalizator	temperatura in čas
DIEA (2 ekv.)	TBTU (1,3 ekv.)	/	0 °C, 1 h → sobna T, 24 h 70 °C, 24 h
Et ₃ N (2 ekv.)	EDC (1,1 ekv.)	DMAP (1 ekv.)	mikrovalovni reaktor: 20 min, 120 °C, 50 W, 20 min, 150 °C, 100 W, 60 min, 170 °C, 150 W

4.7 Poskus sinteze 3-aminobenzoatnih derivatov 4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)-karbonilamino]-1*H*-pirol-2-karboksamida: spojin 53 in 22



(a) NMM, EDC, DMAP, EtOAc, Ar, 0 °C, 1 h → 50 °C, 48 h; (b) H₂, Pd/C, DMF/MeOH (1/1), sobna T, 24 h.

4.7.1 Sinteza metil 3-[(4-nitro-1*H*-pirol-2-il)-karbonilamino]benzoata (52)

Spojino 52 smo sintetizirali pod različnimi reakcijskimi pogoji, ki so prikazani v preglednici IV, pri čemer smo izhajali iz spojine 24 (1,2 ekv.) in metil 3-aminobenzoata (1 ekv.). Najuspešnejši je bil sledeči postopek: spojino 24 (400 mg, 2,56 mmol, 1,2 ekv.) smo raztopili v EtOAc (40 mL), dodali metil 3-aminobenzoat (323 mg, 2,14 mmol, 1 ekv.) in NMM (1,12 mL, 10,26 mmol, 4,8 ekv.). Bučko smo prepihali z argonom, dodali še EDC (983 mg, 5,13 mmol, 2,4 ekv.) in DMAP (313 mg, 2,56 mmol, 1,2 ekv.) ter mešali reakcijsko zmes čez noč pri 50 °C v argonovimi atmosferi. Naslednji dan smo dodali še EDC (490 mg, 2,56 mmol, 1,2 ekv.) in mešali še en dan pri 50 °C, saj reakcija ni potekla v celoti. V reakcijsko zmes smo dodali 2 M HCl (40 mL) in odnučali ter posušili produkt, ki se je oboril na medfazi.

Preglednica IV: Reakcijski pogoji sinteze spojine **52**.

baza	sklopitveni reagent	katalizator	topilo	temperatura in čas	izkoristek
DIEA (2,4 ekv.)	TBTU (1,6 ekv.)	/	DKM	0 °C, 1 h → sobna T, 24 h → 50 °C, 24 h	ni poteklo
DIEA (2 ekv.)	TBTU (1 ekv.)	/	EtOAc	sobna T, 24 h	21 %
DIEA (2,4 ekv.)	TBTU (1,6 ekv.)	/	THF	0 °C, 1 h → sobna T, 24 h → 80 °C, 24 h	25 %
DIEA (2,4 ekv.)	TBTU (1,6 ekv.)	/	EtOAc	0 °C, 1 h → sobna T, 24 h → 80 °C, 24 h	25 %
NMM (4 ekv.)	EDC (2 ekv.)	DMAP (1 ekv.)	EtOAc	0 °C, 1 h → 50 °C, 48 h	46 %

metil 3-[(4-nitro-1*H*-pirol-2-il)-karbonilamino]benzoat (52**)**

Izgled	roza kristali
Izkoristek	46 %
TLC Rf	0,49 (MF: DKM/MeOH = 30/1)
T _{tal}	258 – 262 °C
¹ H NMR (400 MHz,)	δ (ppm) = 12,99 (bs, 1H, Py-NH), 10,36 (s, 1H, CONH), 8,39 (s, 1H, Ar-H), 8,09 (dd, J ₁ = 7,2 Hz, J ₂ = 2,1 Hz Ar-H), 8,06 (t, J = 1,7 Hz, 1H, Ar-H), 7,81 (d, J = 1,9 Hz, 1H, Ar-H), 7,70 (dd, J ₁ = 7,6 Hz, J ₂ = 1,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,53 (t, J = 8,0 Hz, 1H, Ar-H), 3,89 (s, 3H, CH ₃)
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 166,02, 158,00, 139,06, 136,43, 130,08, 129,30, 126,36, 124,27, 124,20, 123,60, 120,38, 106,64, 52,25
MS – ESI	m/z (%): 288,0 ([M-H] ⁻ , 100)
HRMS	Izračunano za C ₁₃ H ₁₀ N ₃ O ₅ [M-H] ⁻ (m/z): 288,0620
IR (KBr)	Izmerjena vrednost (m/z): 288,0625
HPLC	t _R = 8,65 min (96,0% pri 220 nm, 98,2 % pri 254 nm)

4.7.2 Sinteza metil 3-[(4-amino-1*H*-pirol-2-il)-karbonilamino]benzoata (**53**)

Spojino **52** (100 mg, 0,35 mmol) smo raztopili v DMF (20 mL) in MeOH (10 mL) ter raztopino prepihali z argonom. Dodali smo 10 % paladij na ogljiku in raztopino prepihali z vodikom ter mešali v vodikovi atmosferi na sobni temperaturi 1 dan. Paladij na ogljiku smo filtrirali skozi guč, matičnico uparili do suhega zaostanka in nadaljevali sintezo brez vmesnega čiščenja.

metil 3-[{(4-amino-1*H*-pirol-2-il)-karbonilamino]benzoat (53)}

TLC R_f	0,11 (DKM/MeOH = 20/1)
--------------------------	------------------------

4.7.3 Poskus sinteze metil 3-{(4-[{(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamido]-1*H*-pirol-2-il})karbonilamino)benzoata (**54**)

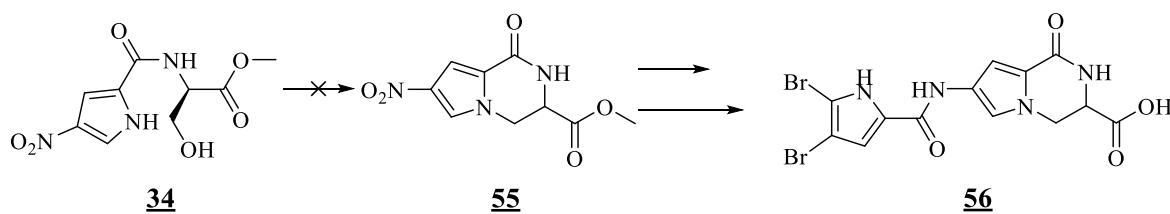
Surovi produkt **53** (1 ekv., ob predpostavki 100 % izkoristka njegove sinteze) smo raztopili v topilu, dodali spojino **32** (1,1 ekv.), prepihali z argonom in ohladili na ledeni kopeli. Reakcijski pogoji, s katerimi smo nato poskusili sintetizirati spojino **54**, so prikazani v preglednici V, pri čemer smo reakcije izvajali v argonovi atmosferi. Sledil je poskus izolacije produkta: topilo smo uparili, dodali EtOAc (20 mL), sprali z 10 % citronsko kislino (2×10 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (2×10 mL), posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali in filtrat uparili pod znižanim tlakom. Sledilo je čiščenje s kolonsko kromatografijo (MF: Hex/EtOAc = 2/1 z 1% ocetne kisline, gradientno proti EtOAc z 1 % ocetne kisline). Spojine **54** nam ni uspelo identificirati, zato smo sintezo 3-aminobenzojskih derivatov opustili.

Preglednica V: Reakcijski pogoji neuspešnih poskusov sinteze spojine **54**.

baza	sklopitveni reagent	kataliza-tor	topilo	temperatura in čas
Et ₃ N (1,5 ekv.)	TBTU (1,5 ekv.)	DMAP (1 ekv.)	DMF	0 °C, 1 h → sobna T, 96 h 70 °C, 24 h
NMM (3 ekv.)	EDC (2 ekv.)	DMAP (1 ekv.)	DMF	0 °C, 1 h → sobna T, 24 h
NMM (1 ekv.)	TBTU (1,5 ekv.)	DMAP (1 ekv.)	DKM	0 °C, 1 h → sobna T, 24 h

4.8 Poskus sintez cikličnih oblik 4-amino-1*H*-pirol-2-karboksamidnega ogrodja

4.8.1 Poskus sinteze metil 7-nitro-1-okso-1,2,3,4-tetrahidropirolo[1,2-a]pirazin-3-karboksilata (**55**)

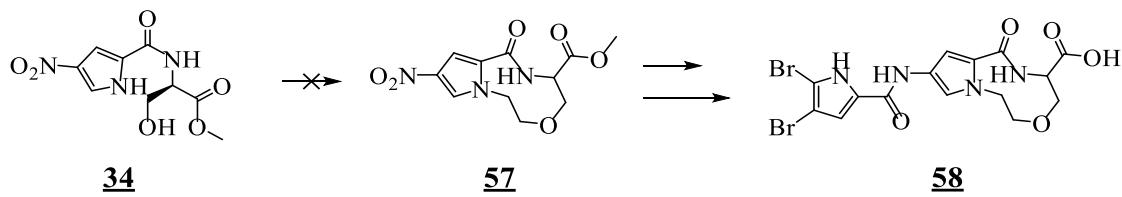


Postopek I (Mitsunobujeva reakcija): Spojino **34** (9 mg, 0,035 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v THF (5 mL), prepihali z argonom, dodali Ph₃P (14 mg, 0,053 mmol, 1, ekv.), ohladili na -10 °C in nato dodali še 94 % DIAD (10 µL, 0,053 mmol, 1,5 ekv.). Reakcijsko zmes smo mešali v argonovi atmosferi najprej eno uro na -10 °C in nato na sobni temperaturi čez noč. Naslednji dan smo dodali še Ph₃P (69 mg, 0,263 mmol, 7,5 ekv.) in nato DIAD (52 µL, 0,263 mmol, 7,5 ekv) pri -10 °C in nato mešali na sobni temperaturi čez noč.

Postopek II: Spojino **34** (20 mg, 0,078 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v brezvodnem DKM (2 mL), ohladili na ledeni kopeli, prepihali z argonom, dodali Et₃N (16 µL, 0,117 mmol, 1,5 ekv.) in mesil klorid (9 µL, 0,117 mmol, 1,5 ekv.) ter mešali v argonovi atmosferi najprej eno uro na ledeni kopeli in nato na sobni temperaturi čez noč. Topilo smo nato odparili pod znižanim tlakom do suhega zaostanka, dodali EtOAc (40 mL), sprali z destilirano vodo (2 × 10 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (2 × 10 mL), posušili z brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali ter filtrat uparili pod znižanim tlakom. Surovi produkt smo raztopili v brezvodnem THF (5 mL), dodali kalijev terc-butoksid (15 mg, 0,156 mmol, 2 ekv.) oz. NaH (konica spatule) in mešali v argonovi atmosferi najprej eno uro na ledeni kopeli, nato pa na sobni temperaturi čez noč.

Z nobenim od opisanih postopkov nam ni uspelo sintetizirati želenega produkta.

4.8.2 Poskus sinteze metil 11-nitro-1-okso-2,3,4,5,7,8-heksahidro-1*H*-pirolo[1,2-d][1,4,8]oksadiazecin-4-karboksilata (**57**)



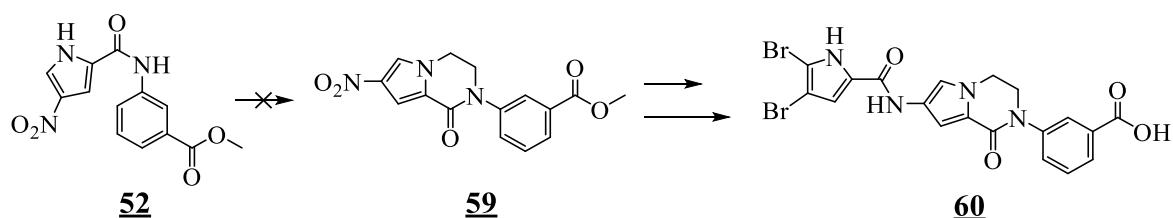
Spojino **34** (20 mg, 0,078 mmol, 1 ekv.) smo raztopili v brezvodnem THF oz. DMF, prepihali z argonom, ohladili na ledeni kopeli in dodali NaH (2,2 ekv.) oz. K₂CO₃ (2,2 ekv). Po 10 minutnem mešanju na ledeni kopeli, smo dodali 1,2-dibromoetan (1,5 ekv.) in mešali v argonovi atmosferi pri 60 °C čez noč. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom, dodali EtOAc (30 mL), sprali z 10 % citronsko kislino (2 × 10 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (2 × 10 mL), posušili nad brezvodnim Na₂SO₄, filtrirali ter filtrat uparili

pod znižanim tlakom. Z nobenim opisanim postopkom nam ni uspelo sintetizirati želenega produkta.

Preglednica VI: Reakcijski pogoji neuspešnih poskusov sinteze spojine **57**.

	baza	topilo	temperatura in čas
Postopek I	NaH (2,2 ekv.)	THF	1. 0 °C, 10 min 2. 60 °C, 24 h
Postopek II	K ₂ CO ₃ (2,2 ekv)	DMF	1. 0 °C, 10 min 2. 60 °C, 24 h

4.8.3 Poskus sinteze metil 3-(7-nitro-1-okso-3,4-dihidropirolo[1,2-a]pirazin-2(1*H*)-il)benzoata (**59**)



Želeno spojino smo poskusili sintetizirati s postopkoma, ki sta opisana pod točko 4.8.2. Poskus sinteze metil 11-nitro-1-okso-2,3,4,5,7,8-heksahidro-1*H*-pirolo[1,2-d][1,4,8]oksadiazecin-4-karboksilata (**57**). Pri tem smo v obeh poskusih izhajali iz spojine **52** (20 mg, 0,069 mmol, 1 ekv.), a nam želenega produkta ni uspelo sintetizirati.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Razprava sinteznih postopkov

Elektrofilne substitucije na pirolu

Pirolne derive, potrebne za sintezo končnih spojin, smo sintetizirali z običajnimi postopki. Prva stopnja je obsegala nitriranje oz. bromiranje pirolnega obroča, pri čemer smo izhajali iz 2-triklorocetylpirola, saj ta zaradi elektron privlačne skupine na mestu 2 zagotavlja visoko regioselektivnost elektrofilnih substitucij na mestu 4 pirola (49).

Nitriranje pirolnega obroča smo izvedli s koncentrirano HNO_3 v acetanhidridu. HNO_3 smo dokapavali počasi v reakcijsko zmes pri $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, saj le-ta reagira eksotermno z Ac_2O do nitrirajočega reagenta AcONO_2 (49). Piroli polimerizirajo v prisotnosti močnih kislin, zato nitriranja ne smemo izvajati z uporabo H_2SO_4 kot je to običajno pri nitriranju benzena (50). Elektron privlačna skupina na mestu 2 pirola usmerja nitriranje pretežno na mesto 4, s kinetičnega vidika pa je preferenčen nastanek 5-nitro derivata (51). Reakcijo smo izvedli po literurnem postopku, pri katerem naj bi potekalo nitriranje med počasnim segrevanjem do sobne temperature pretežno na mestu 4 s približno 70 % izkoristkom (44). V našem primeru je razmerje med nitriranjem na mestu 4 in 5 znašalo 2 : 1, izkoristek nitriranja na mestu 4 pa je bil nižji (30 %) od pričakovanega, kar je splošna težava nitriranja pirolov zaradi njihovega razpada, najverjetneje povzročenega z oksidacijo pri reakcijskih pogojih (51).

Bromiranje z 2 ekvivalenti Br_2 poteče na mestu 4 in 5, saj trikloroacetilna skupina na mestu 2 preveč deaktivira mesto 3. Izkoristek reakcije v kloroformu je bil sicer malenkost nižji (40 %) kot navajajo literurni podatki (60 %), nastal pa je tudi precejšen delež tribromo derivata (47). V literaturi so navedeni boljši izkoristki pri enaki reakciji z uporabo ocetne kisline kot topila (85 %) in pri reakciji z uporabo NaNO_2 (2 ekv.) in HBr (2 ekv.) v DKM (93 %) (47; 52).

Možen vzrok slabših izkoristkov nitriranja in bromiranja je starost reaktanta (uporabili smo nekaj mesecev star reagent) in njegova možna posledična hidroliza, kar bi mogoče lahko preprečili z uporabo sveže pripravljenega reagenta (53). V našem primeru se je namreč

nahajala izhodna spojina v reakcijskih zmesih tudi po precej podaljšanemu reakcijskemu času v primerjavi z literaturnim postopkom.

N-metiliranje pirola

N-metiliranje spojine **26** smo izvedli v DMF z uporabo močne baze (NaH), ki je deprotonirala N-H skupino pirola, nastali anion pa je reagiral z alkil halidom (MeI). Alkiliranje pirola z alkil halidom lahko nastopi na dušiku ali ogljiku. Polarna aprotična topila, trdi elektrofili in večji kationi zagotavljajo elektrostatsko kontrolo reakcije in s tem *N*-alkiliranje (54). V topilih kot sta DMF in DMSO, pride do močne koordinacije s kovinskim ionom in tako sprostitevi pirolij aniona (55). Položaj njegovega resonančnega hibrida, ki izvede nukleofilni napad, je odvisen od ionskega polmera kovinskega iona. Natrijeve in kalijeve soli naj bi tako vodile v *N*-alkiliranje, litijeve in magnezije pa v *C*-alkiliranje (56).

Natrijev hidrid hitro in silovito reagira z vodo, zato zahteva reakcija brezvodne pogoje, kar smo zagotovili z uporabo brezvodnega topila in izvajanjem reakcije v argonovi atmosferi. V reakcijsko zmes smo dodali tudi kvarterno amonijev sol TBAI, ki katalizira fazni prenos pirolij aniona iz trdne faze v tekočo. Reakcijo smo izvedli s 65 % izkoristkom, boljši izkoristek pa bi lahko dosegli z uporabo večjega kationa (npr. K₂CO₃ ali KOH) in bolj trdega nukleofila (npr. metil sulfata ali metil p-toluensulfonata) (55). V literaturi je navedena izvedba enake reakcije s 94 % izkoristkom z uporabo K₂CO₃ kot baze in acetona kot topila (57).

Katalitsko hidrogeniranje

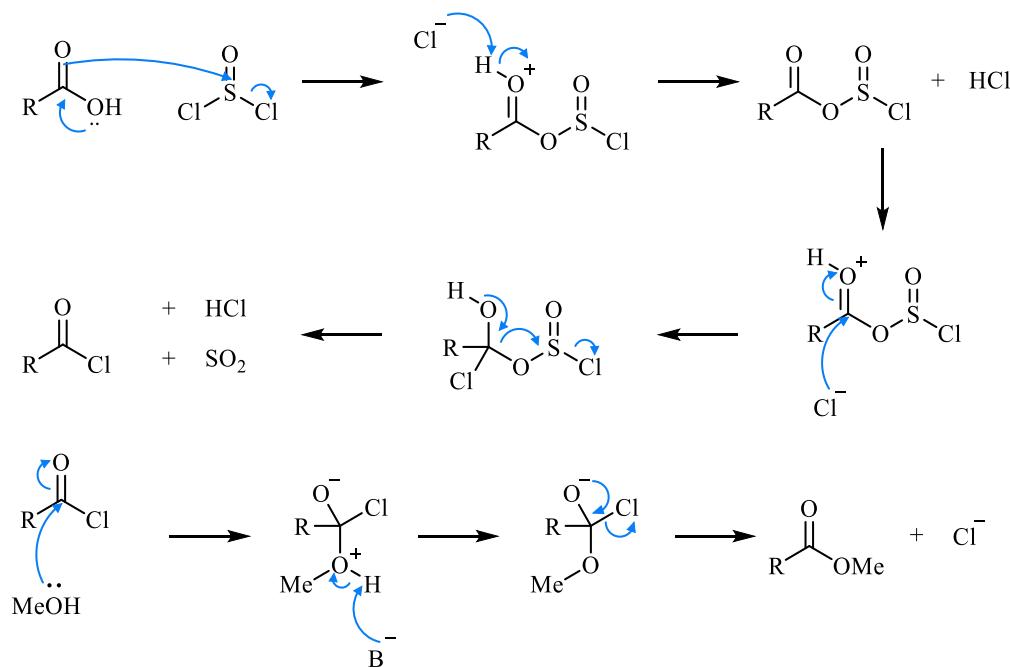
Vse pretvorbe nitro skupin v aminske smo izvajali z uporabo H₂ ob prisotnosti 10 % paladija, adsorbiranega na ogljik, kot katalizatorja. Hidrogeniranje poteka na površini kovine, zato je ta fino uprašena in dispergirana na inertni nosilec ogljik, da zagotavlja čim večjo površino. Po adsorpciji in cepitvi H-H vezi na površini katalizatorja se vodikovi atomi razporedijo in reagirajo s substratom, ki se veže na katalizator (50). Pripravljeni amino-pirolni derivati niso stabilni, prav tako naj bi bilo problematično njihovo čiščenje, zato smo ta korak izpustili (45; 46). Ob tem smo predpostavili 100 % izkoristek, saj te reakcije običajno potekajo kvantitativno. (50). Pred takojšnjim nadaljevanjem sinteznega postopka je pozornost zahtevala le čim boljša odstranitev metanola pod znižanim tlakom in

sušenje surovega produkta v sušilniku. V nasprotnem primeru bi metanol oviral *N*-aciliranje amino skupine v naslednji stopnji sinteze, saj bi prišlo do nastanka metilnega estra karboksilne kisline dibromopirolnega derivata **32** namesto tvorbe amidne vezi.

Zaščita karboksilne kisline

Karboksilne kisline smo zaščitili v obliki metilnega estra, saj bi bile v nasprotnem primeru le-te podvržene nukleofilnim substitucijam. S tem smo tudi zagotovili njihovo boljšo topnost v organskih topilih, lažje čiščenje in izolacijo produktov ter zmanjšali kislost spojin. Metilni estri so odporni na katalitsko hidrogeniranje, šibko kisle pogoje in na napad nukleofilov (58).

Estra **33** in **48** smo pripravili iz karboksilne kisline z uporabo SOCl_2 in MeOH z odličnim izkoristkom po prilagojenem literaturnem postopku. Da bi se izognili potencialni racemizaciji serina, smo reakcijo izvajali na temperaturi od $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ do sobne temperature (48). V prvi stopnji pride do nastanka kislinskega klorida, pri čemer se sproščata plinasta HCl in SO_2 . Kislinski klorid nato reagira z MeOH in tvori metilni ester. Amino skupine tako pripravljenih estrov se nahajajo v obliki soli s klorovodikovo kislinou, zato je bil za deprotonacijo amino skupine pri nadaljnjih reakcijah potreben dodatek ekvimolarne množine baze v reakcijsko zmes (58).

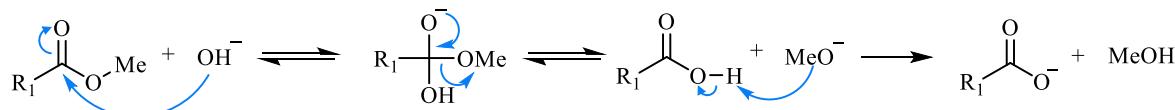


Slika 11: Priprava metilnih estrov preko kislinskega klorida (50).

Pri pripravi nitropirolkarboksilatov **25** in **29** smo izhajali iz karboksilata, aktiviranega z dobro izstopajočo triklorometilno skupino. Trikloroacetilno skupino smo pretvorili v metilni ester z metanolom ob uporabi natrijevega metoksida kot baze in nukleofila. Mehanizem alkoholize trikloroacetilne skupine je analogen mehanizmu njene hidrolize, ki je prikazan v poglavju *Hidrolize do karboksilne kisline*. Alkoholiza z metanolom poteče hitro in z odličnim izkoristkom, s stično bolj oviranimi alkoholi in bazami (terciarni amini) pa so reakcije počasnejše (59).

Hidrolize do karboksilne kisline

Odstranitev metilnega estra poteka z alkalno hidrolizo s hidroksidi (LiOH , KOH , NaOH), običajno v mešanici vode in topila, ki se meša z vodo (metanol, etanol, THF, dioksan), da zagotovimo topnost tako estra kot hidroksida. Navadno se hidroksid nahaja v močnem prebitku v koncentraciji od 0,1 M do 2 M (58; 60). Slika 12 prikazuje mehanizem hidrolize metilnega estra, ki se prične z nukleofilnim napadom hidroksilnega aniona na karbonilni ogljik estra. Nastali tetraedrični intermedij se lahko pretvori nazaj v ester ali v karboksilno kislino in metanolat. Sledi ireverzibilno deprotoniranje karboksilne kisline, ki pomakne ravnotežje v smer hidroliziranega produkta (50). Hidrolize metilnih estrov **36**, **38**, **40**, **42** in **44** smo izvedli z uporabo 0,5 M oz. 1 M LiOH v THF in vodi (razmerje 1 : 1). Izkoristki reakcij so bili odlični (višji od 90 %), le v primeru spojine **44** je bila hidroliza neuspešna. To je najverjetneje posledica netopnosti spojine v uporabljeni mešanici topil, zato bi bil potreben poskus izvedbe reakcije v drugih mešanicah topil.



Slika 12: Mehanizem alkalne hidrolize metilnega estra (50).

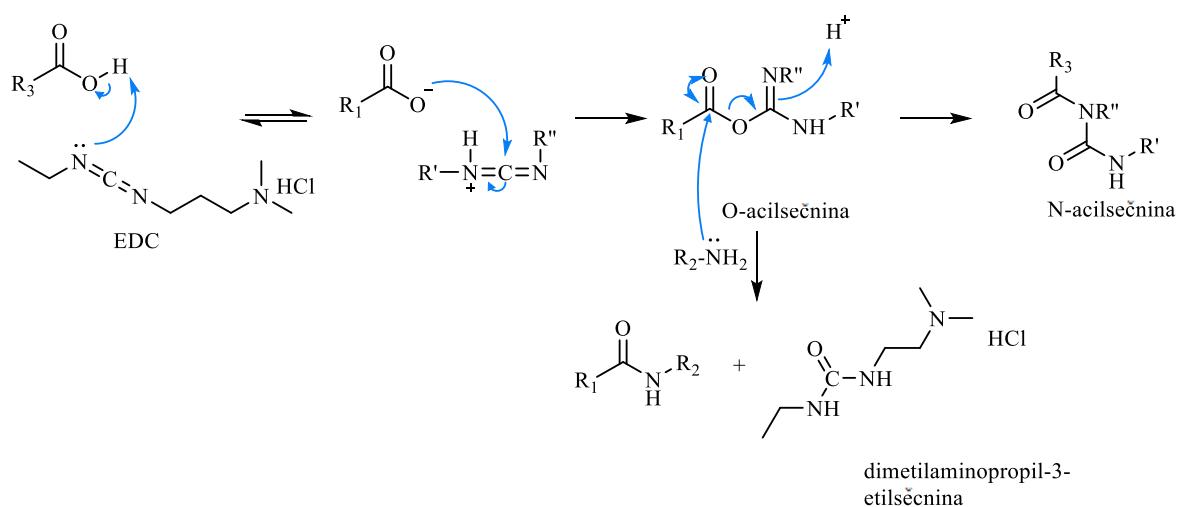
Hidrolizo trikloroacetilne skupine **23a** smo izvedli z 1 M NaOH , pri čemer poteka reakcija po enakem mehanizmu kot hidroliza metilnega estra. Razlika je le v dobro izstopajoči skupini, triklorometilnem anionu, zato namesto metanola med reakcijo nastaja kloroform. Karboanioni so slabo izstopajoče skupine, vendar trije klorovi atomi stabilizirajo negativni naboj in omogočijo substitucijo z OH skupino.

Tvorba amidnih vezi

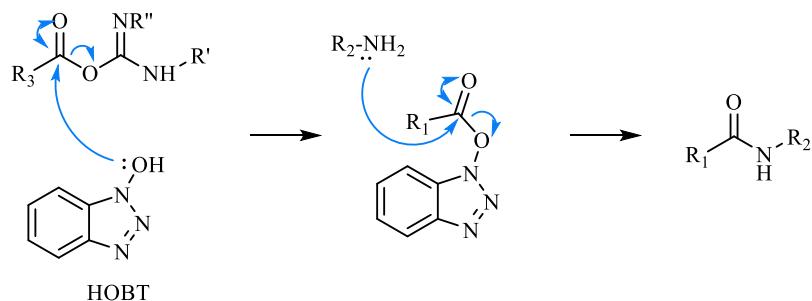
Karboksilna kislina in amino skupina pri sobni temperaturi ne reagirata spontano, saj nastopi eliminacija vode, potrebna za tvorbo amidne vezi, šele pri temperaturi višji od 200 °C. Zato je za njeno sintezo potrebna aktivacija karboksilna kislina, kar običajno izvedemo s pretvorbo njene OH skupine v dobro izstopajočo skupino (61). Primer take aktivacije je že omenjena triklorometilna skupina, ki je primerna za reakcije s primarnimi amini. Z acilno nukleofilno substitucijo triklorometilne skupine spojine **23a** z amino skupino metilnega estra serina (**33**) smo sintezirali amid **34**. Pri ostalih načrtovanih tvorbah amidne vezi bi bil ta pristop neuspešen, saj triklorometilna skupina slabo reagira z aromatskimi amini, zaradi visoke reaktivnosti pa tudi ni primerna za reakcije, kjer nastopa več nukleofilov.

Preostale amidne vezi smo tvorili z uporabo različnih sklopitvenih reagentov, pomožnih nukleofilov in topil, kar pa kljub poskusom optimizacije postopka ni vedno vodilo v pridobitev želenega produkta. Pretežni del amidnih vezi smo sintetizirali z uporabo EDC sklopitvenega reagenta. Pri reakciji karbodiimidnega reagenta s karboksilno kislino se najprej tvori *O*-acilsečninski intermedijat, nato sledi nukleofilni napad amino skupine na aktivirano karboksilno skupino in tvorba produkta – amida. Pri tem nastane tudi vodotopna 1-dimetilaminopropil-3-etilsečnina, ki pa jo enostavno odstranimo z ekstrakcijo (slika 13) (61). Aktivacijo karboksilne kislinske skupine smo izvajali na ledeni kopeli, saj naj bi bila temperatura 4 – 25 °C najoptimalnejša. Gre namreč za eksoterumno reakcijo, pri višjih temperaturah pa naj bi prišlo do hidrolize EDC in *O*-acilsečnine ter njene prenestitve v N-acilsečnino (62; 63). Aktivacija (prva reakcija) je hitra v nepolarnih topilih (DKM) in počasna v polarnih (DMF), medtem ko je sklopitvena reakcija (druga reakcija) hitrejša v polarnejših topilih, zato naj bi reakcija najbolje potekala v mešanici DKM : DMF (1 : 1) (64). Reakcije smo izvajali v polarnih topilih (EtOAc, DMF), ki pa upočasnijo acilacijo karboksilne kislinske skupine, kar poveča obseg prenestitve intermedijatne *O*-acilsečnine do stranskega produkta *N*-acilsečnine. Za zmanjšanje obsega te in drugih stranskih reakcij ter preprečitev racemizacije (pri serinskem derivatu) smo dodali pomožna nukleofila HOBT in/ali DMAP (65). Ta reagira z *O*-acilsečnino do intermedijata, ki reagira z aminom do želenega amida hitreje kot pride do njene prenestitve (66). V reakcijsko zmes smo dodali tudi bazo (NMM oz. Et₃N), in sicer ekvimolarno množino za nevtralizacijo klorida amino skupine reagenta ter ekvimolarno množino za nevtralizacijo klorida amino skupine EDC.

Sterično ovirana baza poleg tega deprotonira karboksilno kislino in s tem pospeši njen aktivacijo, saj je le-ta v obliki soli močnejši nukleofil (63). Reakcije smo izvajali v argonovi atmosferi, saj lahko voda hidrolizira *O*-acilsečnino.

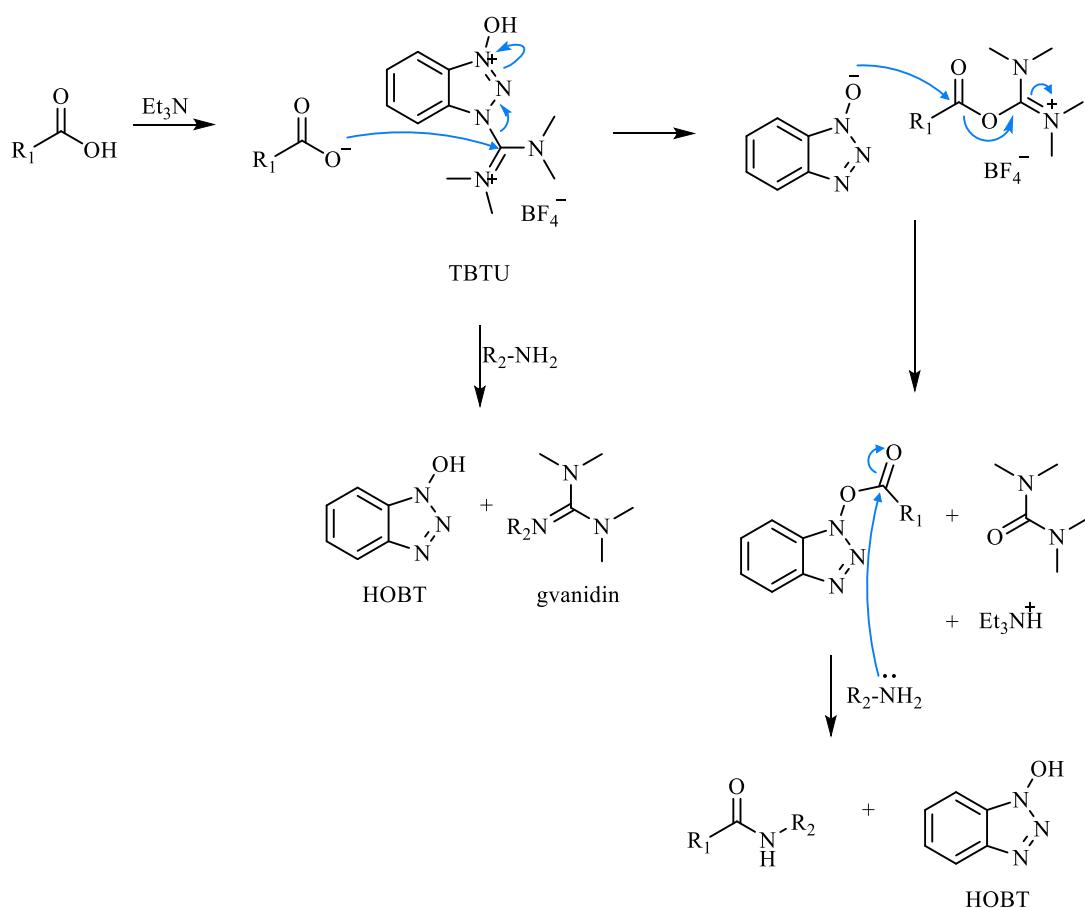


Slika 13: Mehanizem tvorbe amidne vezi ob uporabi sklopitvenega reagenta EDC (50).



Slika 14: Mehanizem tvorbe peptidne vezi ob uporabi pomožnega nukleofila HOBT (50).

Poleg EDC-ja smo kot sklopitveni reagent uporabili tudi uronijev sol TBTU, čigar reakcijski mehanizem je prikazan na sliki 15. Za aktivacijo s TBTU je, nasprotno kot z EDC, potrebna baza, najpogosteje uporabljeni pa so DIPEA, NMM ter trimetilpiridini. Ko se TBTU nahaja v reakcijski zmesi v prebitku, reagira z aminom in tvori stranski gvanidinski produkt. To lahko običajno preprečimo z dodatkom rahlega prebitka karboksilne kisline napram sklopitvenemu reagentu in kratkim aktivacijskim časom pred dodatkom amina (67).



Slika 15: Mehanizem tvorbe amidne vezi ob uporabi skloplitvenega reagenta TBTU (66; 68).

Želena serinska derivata 4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1*H*-pirol-2-karboksamida **38** in **21** smo prvotno nameravali sintetizirati po sintezni poti 1, saj se je le-ta izkazala za uspešno pri sintezi glicinskih derivatov (69). V našem primeru pa se je pojavila težava zelo slabe topnosti spojine **35**, saj je bila netopna v vsakem topilu, ki smo ga preizkusili (MeOH, EtOAc, DMK, THF, CHCl_3). Delno se je raztapljal le v DMF, a kot kaže to ni zadostovalo za tvorbo druge amidne vezi. Iz enakega razloga je najverjetneje odpovedala tudi sinteza 3-aminobenzoatnih derivatov **54** in **22**, saj je spojina **53** izkazovala podobne težave s topnostjo. Spojini **38** in **21** smo nato poskusili pripraviti po sintezni poti 2, pri kateri smo zamenjali vrstni red sinteze amidnih vezi: najprej smo tvorili amidno vez med pirolnima obročema in nato še z metilnim estrom aminokisline. Ta pot se je izkazala za uspešno, zato smo jo uporabili še za sintezo glicinskih derivatov 4-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1*H*-pirol-2-karboksamida **42** in **43** ter serinskih derivatov 5-[(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)karbonilamino]-1-metil-1*H*-pirol-2-karboksamida **46** in **47**.

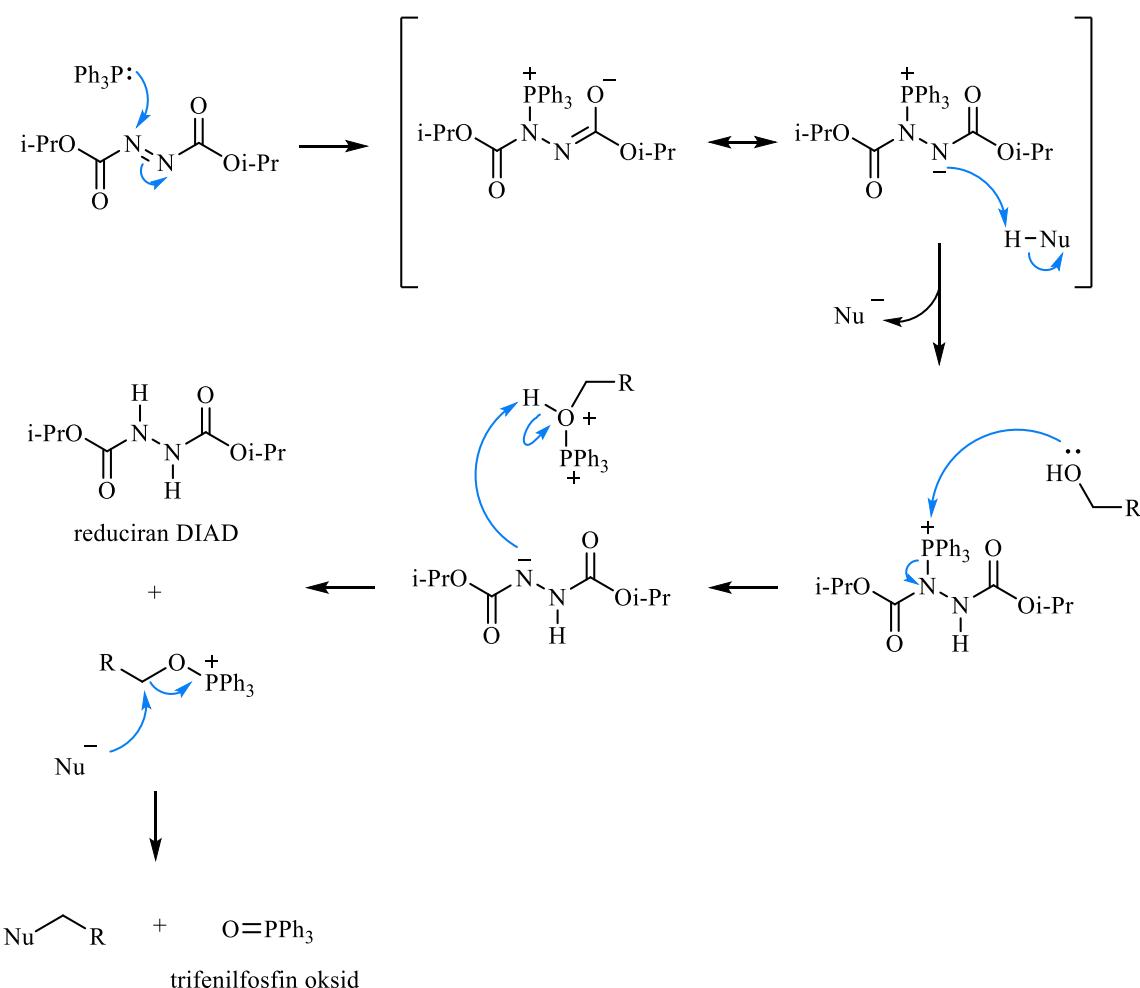
Pri poskusu sinteze 2-aminobenzoatnih derivatov pa se je pojavila težava že v prvi stopnji reakcije, za kar je verjetno odgovorna sterična oviranost amino skupine metil antranilata (**48**). V literaturi so navedeni prav tako neuspešni poskusi tvorbe amidne vezi med metil antranilatom (**48**) in derivati pirol-2-karboksilne kisline z uporabo sklopitvenega reagenta DCC in preko pretvorbe v trikloroacetilni derivat kisline (70; 71). Rotas in sod. navajajo potrebo po pretvorbi carboksilne kisline v kislinski klorid in nato reakcijo z metil antranilatom za uspešen potek, kar pa je vseeno dalo produkt v nižjem izkoristku kot reakcije z drugimi aromatskimi amini (71).

V sklopu magistrske naloge smo se odločili za primerjavo sintezne poti 1 in sintezne poti 2 na primeru glicinskega derivata **39**. Na Fakulteti za farmacijo je bil ta pripravljen po sintezni poti 1 s celokupnim izkoristkom 44 %, po sintezni poti 2 pa je ta znašal le 12 %, kar pomeni, da je sintezna pot 1 sicer uspešnejša, a za naše derivate žal neuporabna zaradi težav s topnostjo (69).

Poskusi ciklizacij

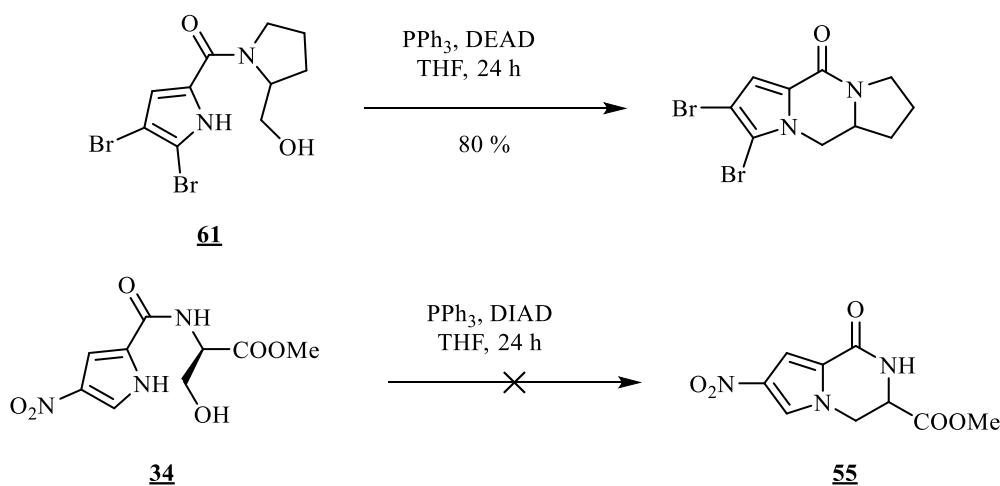
- **Poskus ciklizacije z Mitsunobujevo reakcijo**

Mitsunobujeva reakcija je široko uporabljena za sklopitve alkohola s kislim nukleofilom (karboksilne kisline, fenoli, imidi itd.) z uporabo oksidativnega azo reagenta (najpogosteje DEAD in DIAD) in reducirajočega fosfinskega reagenta (običajno Ph₃P) pod milimi pogoji (72). Mehanizem Mitsunobujeve reakcije je prikazan na sliki 16. V prvi stopnji reakcije pride do nukleofilne adicije trifenilfosfina na šibko N=N π vez DIAD reagenta in posledičnega nastanka stabiliziranega aniona (betaina), ki je dovolj bazičen za odcep protona iz nukleofila (NH skupina pirola). Sledi napad OH skupine na pozitivno nabiti fosfor, kar vodi v nastanek aniona na drugem dušiku DIAD reagenta. Ta anion je ravno tako stabiliziran s konjugacijo z estrom, a hitro odcepi proton iz OH skupine. Tako nastane reducirana oblika reagenta DIAD (stranski produkt) in elektrofilen R-O-PPh₃⁺, ki ga napade anion nukleofila preko S_N2 reakcijskega mehanizma, pri čemer izstopi trifenilfosfin oksid (slika 16) (50).



Slika 16: Splošni mehanizem Mitsunobujeve reakcije (50).

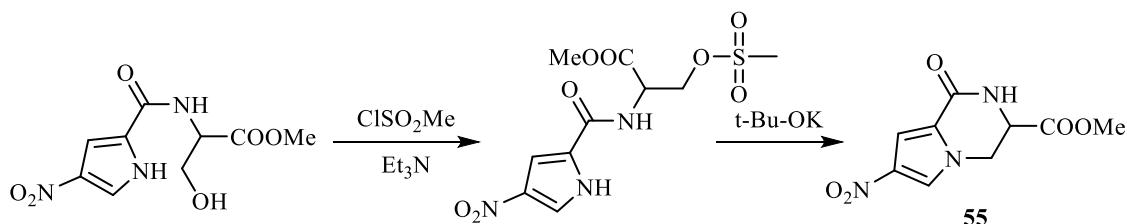
Z Mitsunobujevo reakcijo smo poskusili neuspešno sintetizirati spojino **55** (postopek I), saj so jo Lindel in sod. uspešno uporabili za intramolekularno ciklizacijo spojine **61** z 80 % izkoristkom (slika 17). Pri tem smo upoštevali enak vrstni red dodatka reagentov kot je naveden pri literturni ciklizaciji, in sicer raztopini spojine **34** in Ph_3P v THF smo dodali DIAD reagent (73). Za potek reakcije je potreben dovolj kisel nukleofil, ki lahko protonira DIAD reagent in tako prepreči potek stranskih reakcij. NH skupina 4-nitropirolnega obroč spojine **34** pa je zadostno kisla, zato smo pričakovali neproblematičen potek reakcije. Smiselno bi bilo mogoče poskusiti še s predhodno pripravo betaina ali dodatkom baze (npr. Et_3N) v reakcijsko zmes, saj je ta v nekaterih literturnih primerih intramolekularnih ciklizacij izboljšal izkoristke. Možen vzrok neuspešne reakcije je neuspešna izolacija, saj naj bi bila ta zelo težavna zaradi slabo topnega stranskega produkta $\text{Ph}_3\text{P=O}$ in nezreagiranega Ph_3P reagenta (72; 74).



Slika 17: Primerjava Mitsunobujeve ciklizacije spojine **61** iz literature in našega poskusa sinteze spojine **55** (73).

- Poskus ciklizacije z uporabo mezil klorida**

Spojino **55** smo nato poskusili neuspešno sintetizirati še preko dvostopenjske reakcije, opisane v postopku II. Reakcijo smo izvedli po prilagojenem literaturnem postopku, njen predviden potek pa je prikazan na sliki 18 (75). V prvi stopnji smo želeli pretvoriti slabo izstopajočo OH skupino v dobro izstopajočo metansulfonsko skupino z uporabo metansulfonil oz. mezil klorida ob prisotnosti baze (Et_3N). Po ekstrakciji nezreagiranega mezil klorida v vodno fazo smo v drugi stopnji dodali v reakcijsko zmes močno bazo ($t\text{-BuOK}$ oz. NaH), ki bi deprotonirala pirol, nastali pirolil anion pa bi izpodrinil mezilat in tako bi potekla ciklizacija. Ob uporabi $t\text{-BuOK}$ kot baze smo iz ^1H NMR spektra sklepalni, da je prišlo samo do preestrenja metilnega estra, zato smo v drugi stopnji poskusili še z uporabo NaH , a tudi ta reakcija ni bila uspešna.



Slika 18: Predvideni mehanizem ciklizacije z uporabo mezil klorida, ki pa se je izkazala za neuspešno (50).

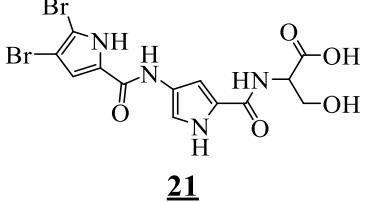
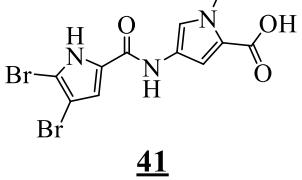
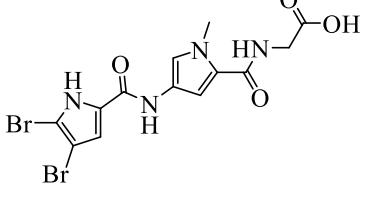
- **Poskus ciklizacije z dielektrofilom**

Spojini **34** in **52** smo neuspešno poskusili ciklizirati še z uporabo 1,2-dibromoetana. V prvi stopnji smo želeli z močno bazo (NaH oz. K_2CO_3) deprotonirati NH skupino pirola in NH skupino amida (spojina **52**) oz. OH skupino (spojina **34**). Pričakovali smo, da bo nastali dianion reagiral z dielektrofilom 1,2-dibromoetanom po $\text{S}_{\text{N}}2$ mehanizmu. Ciklizacije dianionov z 1,2-dielektrofili so pogosto problematične, saj so oboji visoko reaktivni in tako poteka več stranskih reakcij (76). To smo opazili tudi pri naših izvedbah reakcij, saj sta TLC in NMR razkrivala precej nečistoč v reakcijski zmesi.

5.2 Biološka testiranja

Sintetiziranim spojinam **21**, **41**, in **43** so na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo (izr. prof. dr. Janez Ilaš) določili zaviralno aktivnost na DNK girazo B *E.coli*. Rezultati so prikazani v preglednici VII. Rezidualna aktivnost RA predstavlja razmerje med aktivnostjo DNK giraze B v prisotnosti testirane spojine v koncentraciji $100 \mu\text{M}$ oz. $10 \mu\text{M}$ in njena aktivnost v odsotnosti testirane spojine. 100 % RA nakazuje na odsotnost inhibicije, 0 % pa na popolno inhibicijo encima.

Preglednica VII: Rezultati biološkega testiranja.

Struktura in oznaka spojine	RA [%]	$\text{IC}_{50} [\mu\text{M}]$
 21	$100 \mu\text{M} = 32 \%$ $10 \mu\text{M} = 89 \%$	$\text{IC}_{50} \sim 50 \mu\text{M}$
 41	/	$\text{IC}_{50} \sim 150 \mu\text{M}$
 43	$100 \mu\text{M} = 1 \%$ $10 \mu\text{M} = 60 \%$	$\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$

6 SKLEP

V sklopu magistrske naloge smo sintetizirali potencialne zaviralce DNK giraze B 21, 41 in 43, sinteza preostalih načrtovanih spojin pa je spodletela zaradi različnih vzrokov:

- Težave s topnostjo vmesnih produktov so onemogočile sintezo končnih spojin 22 in 47 ter spojine 21 po sintezni poti 1. Spojino 21 nam je uspelo nato pripraviti po sintezni poti 2, pri kateri smo obrnili vrstni red pripenjanja pirolnih obročev. To pot smo uporabili tudi za sintezo spojine 39 (metilni ester spojine vodnice 20), kar nam je omogočilo primerjavo sintezne poti 1 in 2. Po sintezni poti 1 je bila spojina 39 sintetizirana s celokupnim izkoristkom 44 %, po sintezni poti 2 pa s 12 %. Čeprav je slednja izkazala slabše izkoristke, bi bila primerna za sintezo spojin 22 in 47.
- Slaba reaktivnost metil antranilata (48) je preprečila sintezo vmesnega produkta 49 in s tem končne spojine 51. Sintezo spojine 49 bi bilo smiselno poskusiti še s predhodno pretvorbo karboksilne kislinske 24 v kislinski klorid in sledečo reakcijo z metil antranilatom (48).
- Težavna izolacija je možen vzrok, zakaj je odpovedala Mitsunobujeva reakcija, s katero smo želeli sintetizirati spojino 55.
- Zaradi njegove visoke reaktivnosti so ciklizacije z 1,2-dibromoetanom pogosto problematične, kar je tudi najverjetnejši vzrok neuspešne sinteze vmesnih produktov 57 in 59.

Pripravljeni spojini 21 ($IC_{50} \sim 50 \mu\text{M}$) in 43 ($IC_{50} = 10 \mu\text{M}$) izkazujeta boljše zaviralno delovanje na DNK girazo B *E. coli* kot izhodiščna spojina 20 ($IC_{50} = 61,3 \mu\text{M}$), kar pomeni, da je *N*-metiliranje 4-amino-1*H*-pirol-2-karboksamidnega ogrodja izboljšalo zaviralno aktivnost. Spojina 41 ($IC_{50} \sim 150 \mu\text{M}$), ki je prav tako *N*-metilirana, a nima pripetega glicina in ima tako krajšo verigo, pa je izkazala slabšo vezavo kot spojina vodnica. Kasnejši test površinske plazmonske resonance (SPR, angl. Surface Plasmon Resonance), izveden po že zaključenem eksperimentalnem delu, je razkril šibkejšo vezavo spojine 20 v girazo B, saj znaša konstanta disociacije $K_d = 708 \mu\text{M}$, kar nakazuje na agregacijo spojine in s tem lažno nižje IC_{50} vrednosti (69). Posledično bi bila smiselno izvesti SPR test tudi na spojinah 21 in 43 in s tem preveriti ustreznost izmerjenih IC_{50} vrednosti.

7 LITERATURA

1. Reiner R: *Antibiotics: An introduction*. Basel, Editiones Roche, 1982, 2-8.
2. Mitscher LA: Antibiotics and Antimicrobial Agents. [avt. knjige] Williams DA in Lemke TL: *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. s.l., Lippincott Williams & Wilkins, 2002, 819-820, 829-830.
3. Chopra I: Modes of action. [avt. knjige] Finch RG, Greenwood D, Norrby SR, Whitley RJ: *Antibiotic and Chemotherapy: Anti-Infective Agents and Their Use in Therapy*. s.l., Saunders Elsevier, 2010, 10-18.
4. Wright GD: Mechanisms of resistance to antibiotics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2003**, 7, 563-569.
5. Rang HP, in drugi: *Rang & Dale's Pharmacology*. s.l. : Elsevier, 2011
6. Alanis AJ: Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era? *Arch. Med. Res.* **2005**, 36, 697-705.
7. Factsheet for experts. *European Centre for Disease Prevention and Control*. [Dostop: 20. julij 2014.]
http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/antimicrobial_resistance/basic_facts/Pages/factsheet_experts.aspx.
8. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks: *Assessment of the antibiotic resistance effects of biocides*. s.l., European Commission, 2009, 39-41.
9. Champoux JJ: DNA topoisomerases: Structure, function, and mechanism. *Annu. Rev. Biochem.* **2001**, 70, 369-413.
10. Deweese JE, Osheroff MA in Osheroff N: DNA topology and topoisomerases: Teaching a "knotty" subject. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **2009**, 37, 2-10.
11. Nucleic Acid Research. *Oxford Journals*. [Dostop: 22. 6. 2014.]
<http://nar.oxfordjournals.org/content/28/17/3323/F1.expansion>.

12. Bradbury BJ in Pucci MJ: Recent advances in bacterial topoisomerase inhibitors. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2008**, *8*, 574-581.
13. Tomašić T in Peterlin Mašič L: Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Curr. Top. Med. Chem.* **2014**, *14*, 130-151.
14. Pommier Y, Leo E, Zhang H in Marchand C: DNA topoisomerases and their poisoning. *Chem. Biol.* **2010**, *17*, 421-433.
15. Golan DE, Tashjian AH, Armstrong EJ in Armstrong AW: *Principles of Pharmacology: the pathophysiologic basis of drug therapy*. s.l., Lippincott Williams & Wilkins, 2012, 584, 587.
16. Tropp BE: *Molecular biology: genes to proteins*. s.l., Jones & Bartlett Learning, 2012, 133.
17. Marolt - Gomišček M: *Antibiotiki in kemoterapevtiki v vsakdanji praksi*. Ljubljana, Tangram, 1992, 105-110.
18. Finkel R, Clark MA in Cubeddu LX: *Pharmacology*. s.l., Lippincott Williams & Wilkins, 2009, 387-390.
19. Cheng G, Hao H, Dai M, Liu Z in Yuan Z: Antibacterial action of quinolones: From target to network. *Eur. J. Med. Chem.* **2013**, *66*, 555-562.
20. Delafloxacin. *Melinta Therapeutics*. [Dostop: 2. september 2014.]
<http://www.melinta.com/delafloxacin.php>.
21. JNJ-Q2. *Furiex Pharmaceuticals*. [Dostop: 2. september 2014.]
<http://www.furiex.com/pipeline/discoverydevelopment-pipeline/fluoroquinolone/>.
22. Key development projects. *Ferrer*. [Dostop: 2. september 2014.]
http://www.ferrer.com/Innovation_Innovacion-Pipeline-de-proyectos-ENG.
23. News. *TaiGen Biotechnology*. [Dostop: 2. september 2014.]
<http://www.taigenbiotech.com.tw/NewsDetail/9407cdc4d4da46caa056f5bec760a3b2>.

24. Bush K in Pucci MJ: New antimicrobial agents on the horizon. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, *82*, 1528-1539.
25. Tato M, Lopez Y, Marosini MI, Moreno-Bofarull A, Garcia-Alonso F, Gargallo-Viola D, Vila J in Canton R: Characterization of variables that may influence ozenoxacin in susceptibility testing, including MIC and MBC values. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *78*, 263-267.
26. Singh SB: Confronting the challenges of discovery of novel antibacterial agents. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 3683-3689.
27. GSK. *Product pipeline*. [Dostop: 27. avgust 2014.] <http://www.gsk.com/en-gb/research/what-we-are-working-on/product-pipeline/>.
28. Moir DT, Opperman TJ, Butler MM in Bowlin TL: New classes of antibiotics. *Curr. Opin. Pharmacol.* **2012**, *12*, 535-544.
29. AstraZeneca. *Media Press Releases*. [Dostop: 28. avgust 2014.] <http://wwwastrazeneca.com/Media/Press-releases/Article/20140603--astrazenecas-novel-antibiotic-candidate-azd0914-fast-track-status>.
30. Hearnshaw SS, Edwards MJ, Stevenson CE, Lawson DM in Maxwell A: A new crystal structure of the bifunctional antibiotic simocyclinone D8 bound to DNA gyrase gives fresh insight into the mechanism of inhibition. *J. Mol. Biol.* **2014**, *426*, 2023-2033.
31. Eakin AE, Green O, Hales N, Walkup GK, Bist S, Singh A, Mullen G, Bryant J, Embrey K, Gao N, Breeze A, Timms D, Andrews B, Uria-Nickelsen M, Demeritt J, Loch III JT, Hull K, Blodgett A, Illingworth RN, Prince B, Boriack-Sjodin PA, Hauck S, MacPherson LJ, Ni H in Sherer B: Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: Fragment-based nuclear magnetic resonance screening to identify antibacterial agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *56*, 1240-1246.
32. Heide L: New aminocoumarin antibiotics as gyrase inhibitors. *Int. J. Med. Microbiol.* **2014**, *304*, 31-36.
33. Basarab GS, Hill PJ, Garner CE, Hull K, Green O, Sherer BA, Dangel PB, Manchester JI, Bist S, Hauck S, Zhou F, Uria-Nickelsen M, Illingworth R, Alm R, Rooney M in Eakin

- AE: Optimization of pyrrolamide topoisomerase II inhibitors toward identification of an antibacterial clinical candidate (AZD5099). *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 6060-6082.
34. Javna agencija Republike Slovenije za zdravila in medicinske pripomočke. *Zdravila za uporabo v veterinarski medicini*. [Dostop: 20. avgust 2014.] <http://www.jazmp.si/fileadmin/datoteke/seznamy/SRZV/30-7-2014.pdf>.
35. U.S. Food and Drug Administration. *Approved Animal Drug Products (Green Book)*. januar 2014. [Dostop: 20. avgust 2014.] <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/Products/ApprovedAnimalDrugProducts/UCM042860.pdf>.
36. Phillips JW, Goetz MA, Smith SK, Zink DL, Polishook J, Onishi R, Salowe S, Wiltsie J, Allocco J, Sigmund J, Dorso K, Lee S, Skwish S, de la Cruz M, Martin J, Vicente F, Genilloud O, Lu J, Painter RE, Young K, Overbye K, Donald RGK in Singh SB: Discovery of kibdelomycin, a potent new class of bacterial type II topoisomerase inhibitor by chemical-genetic profiling in *Staphylococcus aureus*. *Chem. Biol.* **2011**, *18*, 955-965.
37. Lu J, Patel S, Sharma N, Soisson SM, Kishii R, Takei M, Fukuda Y, Lumb KY in Singh SB: Structures of kibdelomycin bound to *Staphylococcus aureus* GyrB and ParE showed a novel U-shaped binding mode. *ACS Chem. Biol.* **2014**, *9*, 2023–2031.
38. Brvar M, Perdih A, Renko M, Anderluh G, Turk D in Solmajer T: Structure-base Discovery of substituted 4,5'-bithiazoles as novel DNA gyrase inhibitors. *J. Med. Chem.* **2012**, *55*, 6413-6426.
39. AstraZeneca Annual Reports. *Development Pipeline*. [Dostop: 20. avgust 2014.] http://www.astrazeneca-annualreports.com/2012/documents/eng_download_centre/additional-information/astrazeneca-ar12-dev-pipeline.pdf.
40. Mani N, Gross CH, Parsons JD, Hanelka B, Müh U, Mullin S, Liao Y, Grillot AL, Stamos D, Charifson PS in Grossman TH: In vitro characterization of the antibacterial spectrum of novel bacterial type II topoisomerase inhibitors of the aminobenzimidazole class. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2006**, *50*, 1228-1237.

41. East SP, White CB, Barker O, Barker S, Bennet J, Brown D, Boyd EA, Brennan C, Chowdhury C, Collins I, Convers-Reignier E, Dymock BW, Fletcher R, Haydon DJ, Gardiner M, Hatcher S, Ingram P, Lancett P, Mortenson P in Papadopoulos K: Dna gyrase (GyrB)/topoisomerase IV (ParE) inhibitors: Synthesis and antibacterial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 894-899.
42. Starr JT, Sciotti RJ, Hanna DL, Huband MD, Mullins LM, Cai H, Gage JW, Lockard M, Rauckhorst MR, Owen RM, Lall MS, Tomilo M, Chen H, McCurdy SP in Barbachyn RM: 5-(2-Pyrimidinyl)-imidazo[1,2-a]pyridines are antibacterial agents targeting the ATPase domains of DNA gyrase and topoisomerase IV. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19*, 5302-5306.
43. Yule IA, Czaplewski LG, Pommier S, Davies DT, Narramore SK in Fishwick CWG: Pyridine-3-carboxamide-6-yl-ureas as novel inhibitors of bacterial DNA gyrase: Structure based design, synthesis, SAR and antimicrobial activity. *Eur. J. Med. Chem.* **2014**, *86*, 31-38.
44. Kumar R in Lown WJ: Design, synthesis and in vitro cytotoxicity studies of novel pyrrolo [2,1][1,4] benzodiazepine-glycosylated pyrrole and imidazole polyamide conjugates. *Org. Biomol. Chem.* **2003**, *1*, 3327-3342.
45. Choi JS, Lee Y, Kim E, Jeong N, Yu H in Han H: The 2-(4-trifluoromethylphenylsulfonyl)ethoxycarbonyl (Tsc). *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1607-1610.
46. Al-Said NH: 2-(4-(2-Chloroacetamido)-1-methyl-1H-pyrrole-2-carboxamido)ethyl Acetate. *Molbank* **2014**, *2014*, M820.
47. Takale BS, Desai NV; Siddiki AA, Chaudhari HK in Telvekar VN: Synthesis and biological evaluation of pyrrole-2-carboxamide derivatives: oroidin analogues. *Med. Chem. Res.* **2014**, *23*, 1387-1396.
48. Gu K, Bi L, Zhao M, Wang C, Ju J in Peng S: Toward the development of chemoprevention agents. Part II: Chemo-enzymatic synthesis and anti-inflammatory activities of a new class of 5-amino-2-substitutedphenyl-1,3-dioxacycloalkanes. *Bioorg. Med. Chem.* **2007**, *15*, 6273-6290.

49. Joule JA in Mills K: *Heterocyclic Chemistry*. Chichester, John Wiley & Sons, 2010, 296.
50. Clayden J, Greeves N in Warren S: *Organic Chemistry*. New York, Oxford University Press, 2012, 210-211, 214, 349-351, 391, 733.
51. Schmuck C in Dudaczek J: New guanidinium-based carboxylate receptors derived from 5-amino-pyrrole-2-carboxylate: synthesis and first binding studies. *Tetrahedron Lett.* **2005**, *46*, 7101-7105.
52. Lington RG, Williams DE, Tahir A, van Soest R in Andersen RY: Latondunes A and B, new alkaloids isolated from the marine sponge stylissa carteri: structure elucidation, synthesis, and biogenetic implications. *Org. Lett.* **2003**, *5*, 2735-2738.
53. 2-(Trichloroacetyl)pyrrole. *Syntechem*. [Dostop: 4. oktober 2014.]
<http://www.syntechem.com/prod/STP5125/>.
54. Díez-Barra E, de la Hoz A, Loupy A in Sánchez-Migallón A: Selective alkylation of pyrrole by phase transfer catalysis in the absence of solvent. *J. Heterocycl. Chem.* **1994**, *31*, 1715–1717.
55. Wang NC, Teo KE in Andresen HJ: Pyrrole chemistry. XVII. Alkylation of the pyrrolyl ambident anion. *Can. J. Chem.* **1977**, *55*, 4112-4116.
56. Hobbs CF, McMilin CK, Papadopoulos EP in VanderWerf CA: Factors affecting the position of alkylation of alkali metal salts of pyrrole with allylic type halides. *J. Am. Chem. Soc.* **1962**, *84*, 43-51.
57. Chen J, Peng, H, Huan X, Miao Z in Yang C: Synthesis of isoquinolinone-based tricycles as novel poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2014**, *24*, 2669-2673.
58. Sureshbabu VV in Narendra N: Protection Reactions. [avt. knjige] Hughes AB: *Amino Acids, Peptides and Proteins in Organic Chemistry, Volume 4, Protection Reactions, Medicinal Chemistry, Combinatorial Synthesis*. Weinheim, Wiley, 2011, 34-36.

59. Harbuck JW in Rapoport H: Facile introduction of ester groups into the pyrrole nucleus via trichloroacetylation and alcoholysis. *J. Org. Chem.* **1972**, *37*, 3618–3622.
60. Theodorou, V, Skobridis K, Tzakos AG in Ragoussis V: A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Lett.* **2007**, *48*, 8230–8233.
61. Valeur E in Bradley M: Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chem. Soc. Rev.* **2009**, *38*, 606-631.
62. Wang C, Yan Q, Liu HB, Zhou XH in Xiao SJ: Different EDC/NHS activation mechanisms between PAA and PMAA brushesand the following amidation reactions. *Langmuir* **2011**, *27*, 12058-12068.
63. Al-Warhi TI, Al-Hazimi HMA in El-Faham A: Recent development in peptide coupling reagents. *J. Saudi Chem. Soc.* **2012**, *16*, 97-116.
64. Carpino LA in El-Faham A: The diisopropylcarbodiimide/1-Hydroxy-7-azabenzotriazole system: segment coupling and stepwise peptide assembly. *Tetrahedron* **1999**, *55*, 6813-6830.
65. Pearson AJ in Roush WR: *Handbook of Reagents for Organic Synthesis, Activating Agents and Protecting Groups*. Chichester, John Wiley & Sons, 1999, 186-187.
66. Montalbetti CAGN in Falque V: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* **2005**, *61*, 10827-10852.
67. Coupling reagents. *Bachem.* [Dostop: 26. september 2014.]
http://www.bachem.com/fileadmin/user_upload/pdf/Monographs/Coupling_Reagents.pdf.
68. Pellenbarg T, Dementev N, Jean-Gilles R, Bessel C, Borguet E, Dollahon N in Giuliano R: Detecting and quantifying oxygen functional groups on graphite nanofibers by fluorescence labeling of surface species. *Carbon* **2010**, *48*, 4256–4267.
69. Jerič E: *Načrtovanje in sinteza derivatov 3-amino-2-tioksotiazolidin-4-ona in 1H-pirol-1-3-amina kot potencialnih zaviralcev giraze B (Magistrska naloga)*. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2014.

70. Koriatopoulou K, Karousis N in Varvounis G: Novel synthesis of the pyrrolo[2,1-c][1,4]benzodiazocine ring system via a Dieckmann condensation. *Tetrahedron* **2008**, *64*, 10009–10013.
71. Rotas G, Kimbaris A in Varvounis G: Synthesis of 5-alkyl(or aryl)pyrrolo[1,2-a]quinoxalin-4(5H)-ones by denitrocyclisation of N-alkyl(or aryl)-1-(2-nitrophenyl)-1H pyrrole-2-carboxamides. Evidence of a Smiles rearrangement. *Tetrahedron* **2004**, *60*, 10825–10832
72. But TYS in Toy PH: The Mitsunobu reaction: Origin, mechanism, improvements, and applications. *Chem. Asian. J.* **2007**, *2*, 1340-1355.
73. Lindel T, Jacquot DEN, Zöltinger M, Kinnel RB, McHugh S in Köck M: Study on the basolute configuration of (-)-palau'amine. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51*, 6353-6355.
74. Kumara Swamy KC, Bhuvan Kumar NN in Pavan Kumar KVP. Mitsunobu and related reactions: Advances and applications. *Chem. Rev.* **2009**, *109*, 2551–2651.
75. Isaac M, Slassi M, Xin T, Arora J, O'Brien A, Edwards L, MacLean N, Wilson J, Demschyshyn L, Labrie P, Naismith A, Maddaford S, Papac D, Harrison S, Wang H, Draper S in Tehim A. Design, synthesis and biological activity of novel dimethyl-{2-[6-substituted-indol-1-yl]-ethyl}-amine as potent, selective, and orally-bioavailable 5-HT1D agonists. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2003**, *13*, 4409-4413.
76. Langer P in Freiberg W. Cyclization reactions of dianions in organic synthesis. *Chem. Rev.* **2004**, *104*, 4125-4149.