

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANJA SIRC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Univerza v Ljubljani
Fakulteta *za farmacijo*



ANJA SIRC

**RAZVOJ 4,5-DIBROMOPIROLAMIDOV KOT ATP
KOMPETITIVNIH ZAVIRALCEV DNA GIRAZE B**

**DEVELOPMENT OF 4,5-DIBROMOPYRROLAMIDES AS
ATP COMPETITIVE DNA GYRASE B INHIBITORS**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Naceta Zidarja. Masnospektrometrijske meritve so opravili na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani, encimske teste na fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, protibakterijske teste pa na Univerzi v Helsinkih.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Nacetu Zidarju za prijaznost, pomoč pri raziskovanju, hitro odzivnost in pridobljeno znanje.

Zahvaljujem se tudi staršem, fantu Alešu in prijateljem za vso podporo ter motivacijo tekom celotnega študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Naceta Zidarja.

Anja Sirc

Ljubljana, 2015

Predsednik komisije: prof.dr. Stanko Srčič

Mentor: doc. dr. Nace Zidar

Član komisije: doc. dr. Damjan Janeš

VSEBINA

| | |
|---|------|
| VSEBINA..... | ii |
| KAZALO SLIK | v |
| KAZALO PREGLEDNIC | vii |
| POVZETEK..... | viii |
| ABSTRACT..... | ix |
| SEZNAM OKRAJŠAV | xi |
| 1. UVOD..... | 1 |
| 1.1. Protimikrobne učinkovine | 1 |
| 1.2. Pojav rezistence..... | 2 |
| 1.3. DNA kot tarča zdravilnih učinkovin | 5 |
| 1.3.1. Zgradba in vloga molekule DNA | 5 |
| 1.3.2. Podvojevanje DNA molekule | 6 |
| 1.3.3. Bakterijske topoizomeraze..... | 7 |
| 1.3.4. Struktura DNA-giraze in topoizomeraze IV | 7 |
| 1.3.5. Vezavno mesto za ATP na DNA-girazi B | 8 |
| 1.4. Učinkovine z delovanjem na DNA-girazo | 10 |
| 1.4.1. Zaviralci DNA-giraze A | 10 |
| 1.4.2. Zaviralci DNA-giraze B | 11 |
| 2. NAMEN DELA..... | 14 |
| 3. MATERIALI IN METODE | 15 |
| 3.1. REAGENTI IN TOPILA | 15 |
| 3.2. UGOTAVLJANJE TALIŠČA | 15 |
| 3.3. KROMATOGRFSKE METODE..... | 15 |
| Tankoplastna kromatografija (TLC) | 15 |
| Kolonska kromatografija | 15 |
| Tekočinska kromatografija visoke ločljivostu (HPLC) | 15 |
| 3.4. SPEKTROSKOPSKE IN SPEKTOMETRIJSKE METODE..... | 16 |
| Infrardeča spektroskopija (IR) | 16 |
| Jedrska magnetna resonanca (NMR) | 16 |
| Masna spektrometrija (MS) | 16 |
| 3.5. NOMENKLATURA IN RISANJE SPOJIN..... | 16 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.6. | SIDRANJE SPOJIN V AKTIVNO MESTO DNA-GIRAZE B | 16 |
| | Priprava proteinov in ligandov | 16 |
| | Sidranje spojin | 17 |
| 3.7. | ENCIMSKI TESTI IN UGOTAVLJANJE IC ₅₀ | 17 |
| 3.8. | UGOTAVLJANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI..... | 17 |
| 4. | EKSPERIMENTALNI DEL | 19 |
| 4.1. | REAKCIJSKE SCHEME | 19 |
| 1.1. | SINTEZNI POSTOPKI..... | 22 |
| | <i>N</i> -(3-aminofenil)-4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid (3)..... | 22 |
| | Metil 3-((3-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)penil)amino)-3-oksopropanoat (4) | 22 |
| | 3-((3-(4,5-Dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)penil)amino)-3-oksopropanojska kislina (5) ... | 23 |
| | Metil (4-nitrobenzoil)-L-prolinat (8a) | 23 |
| | Metil (4-nitrobenzoil)-D-prolinat (8b) | 24 |
| | Metil (4-aminobenzoil)-L-prolinat (9a)..... | 24 |
| | Metil (4-aminobenzoil)-D-prolinat (9b) | 25 |
| | Metil (4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzil)-L-prolinat (10a)..... | 25 |
| | Metil (4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzil)-D-prolinat (10b) | 26 |
| | (4-(4,5-Dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzil)-L-prolin (11a) | 26 |
| | (4-(4,5-Dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)benzil)-D-prolin (11b) | 27 |
| | <i>terc</i> -Butil-(1-(<i>terc</i> -butiloksi)karbonil)(2-ciano-4-nitrofenil)karbamat (13) | 27 |
| | <i>terc</i> -Butil- <i>terc</i> -butil (2-(<i>N</i> '-hidroksikarbamimidoil)-4-nitrofenil)karbamat (14)..... | 28 |
| | <i>terc</i> -Butil-(2-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)-4-nitrofenil)karbamat (15)..... | 28 |
| | <i>terc</i> -Butil-(4-amino-2-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)fenil)karbamat (16)..... | 29 |
| | Metil-3-((4-((<i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-3-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)fenil)amino)-3-oksopropanoat (17)..... | 29 |
| | Metil 3-((4-amino-3-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)fenil)amino)-3-oksopropanoat (18) | 30 |
| | Metil-3-((4-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirole-2-karboksamido)-3-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)fenil)amino)-3-oksopropanoat (19) | 31 |
| | 3-((4-(4,5-Dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamido)-3-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)fenil)amino)-3-oksopropanojska kislina (20)..... | 31 |
| | 4,5-Dibromo- <i>N</i> -(4-(3-hidrazinil-3-oksopropanamido)-2-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)fenil)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid (21) | 32 |
| | 4,5-Dibromo- <i>N</i> -(2-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)-4-(2-(5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-il)acetamido)fenil)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid (22) | 32 |
| 5. | REZULTATI IN RAZPRAVA..... | 34 |

| | | |
|--------|---|----|
| 5.1. | Komentar nekaterih sinteznih postopkov | 34 |
| 5.1.1. | Sinteza amidne vezi z reagentom TBTU | 34 |
| 5.1.2. | Sinteza amidne vezi preko tvorbe kislinskega klorida..... | 34 |
| 5.1.3. | Tvorba 5-metil-1,2,4-oksadiazolnega obroča..... | 35 |
| 5.1.4. | Priprava 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolnega obroča | 36 |
| 5.2. | Načrtovanje zaviralcev DNA-giraze B | 36 |
| 5.3. | Rezultati bioloških testov | 38 |
| 5.3.1. | Encimski testi..... | 38 |
| 5.3.2. | Protibakterijska aktivnost..... | 42 |
| 6. | SKLEP | 44 |
| 7. | LITERATURA..... | 45 |

KAZALO SLIK

| | |
|---|----|
| Slika 1: Shematski prikaz treh osnovnih tipov biokemijskih reakcij (prirejeno po 1). | 2 |
| Slika 2: Mehanizmi izmenjave dednega materiala med bakterijskimi celicami: transformacija, transdukcija in konjugacija (prirejeno po 4). | 4 |
| Slika 3: Shematski prikaz petih osnovnih mehanizmov nastanka bakterijske odpornosti proti antibiotikom (prirejeno po 5). | 5 |
| Slika 4: Oblike dvojne vijačnice: linearna, krožna in superzvita DNA (prirejeno po 8). | 6 |
| Slika 5: Podvajanje krožne DNA (prirejeno po 9). | 6 |
| Slika 6: Delovanje DNA-giraze in topoizomeraze IV (prirejeno po 12 in 13). | 7 |
| Slika 7: a) Kristalna struktura podenote GyrB ₂ iz E.Coli v kompleksu z ADPNP in b) kristalna struktura GyrA ₂ v kompleksu z zaviralcem simociklinom D8. N-vrata ležijo na stiku dveh podnot GyrB, C-vrata ležijo na stiku C-terminalnih domen podenot GyrA, DNA vrata pa so umeščena med N- in C-vrata (prirejeno po 10). | 8 |
| Slika 8: Prikaz interakcij med molekulo ATP in aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu GyrB. Neposredne vodikove vezi so označeno z zeleno in modro, vodikove vezi preko molekule kristalne vode so označeni z vijolično, hidrofobne interakcije so označene z rdečo, koordinacijske vezi z magnezijevim ionom z rumeno ter ionska vez z roza barvo (prirejeno po 16). | 10 |
| Slika 9: Zaviralci GyrA oz. ParC. Ciprofloksacin in moksifloksacin iz skupine fluorokinolonov sta pri nas edina v klinični uporabi (prirejeno po 10). | 11 |
| Slika 10: Predstavniki naravnih zaviralcev GyrB: a) novobiocin iz skupine aminokumarinov, b) predstavnik skupine ciklotialidinov, c) kibdelomicin, d) predstavnik skupine analogov kvercetinodiacilglikozidov (prirejeno po 10). | 12 |
| Slika 11: Predstavniki posameznih strukturnih razredov sinteznih zaviralcev GyrB: a) benzimidazolsečnine, b) imidazo[1,2-a]piridini, c) pirazoltiazoli, d) azaindoli, e) 4,5'-bitiazoli, f) pirolpirimidini, g) aminobenzimidazoli, h) pirolamidi, i) indazoli in j) piridilsečnine (prirejeno po 10, 16, 19, 20). | 13 |
| Slika 12: Pirolamidni zaviralci GyrB, ki so jih odkrili pri AstraZeneci (prirejeno po 21). | 13 |
| Slika 13: Trije načrtovani strukturni tipi 4,5-dibromo-N-fenil-1H-pirol-2-karboksamidnih ATP kompetitivnih zaviralcev GyrB. | 14 |
| Slika 14: Shematski prikaz sinteze spojin z benzen 1,3-diaminskim centralnim delom. | 19 |
| Slika 15: Shematski prikaz sinteze spojin z benzoilprolinskim fragmentom. | 20 |

| | |
|--|----|
| Slika 16: Shematski prikaz sinteze spojin z 5-metil-3-fenil-1,2,4-oksadiazolnim centralnim delom. | 21 |
| Slika 17: Mehanizem reakcije nastanka amidne vezi s sklopitvenim reagentom TBTU (prirejeno po 27). | 34 |
| Slika 18: Tvorba kislinskega klorida z oksalilkloridom in sinteza amidne vezi po S_N2 mehanizmu nukleofilne substitucije (prirejeno po 26,28). | 35 |
| Slika 19: Mehanizem tvorbe 5-metil-1,2,4-oksadiazola iz ciano skupine. | 35 |
| Slika 20: Potek priprave 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolnega obroča. | 36 |
| Slika 21: Najbolje ocenjeni konformaciji spoji 19 in 22 (v sinje modrem) v aktivnem mestu GyrB iz <i>E. coli</i> (PDB koda: 4DUH) napovedani z molekulskim sidranjem s programom GOLD. (20) Spojin 19 in 22 ter izbrani aminokislinski ostanki v aktivnem mestu so prikazani v različnih barvah: $C_{17/20}$ v sinje modrem, C_{GyrB} v sivem, Br v rjavem, O v rdečem in N v modrem. Kristalna voda je prikazana kot rdeča kroglica. Napovedane vodikove vezi med aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu, kristalno vodo in spojinama 19 oz. 22, so prikazane kot rumene prekinjene črte. Za pripravo slike smo uporabili program PyMOL. (22). | 37 |
| Slika 22: Strukturi novobiocina in klorobiocina, s prikazom strukturne razlike, zaradi katere v primeru molekule klorobiocina lahko pride do tvorbe dodatnih hidrofobnih interakcij z aminokislinskimi ostanki v aktivnem mestu encima GyrB (prirejeno po 10). .. | 37 |

KAZALO PREGLEDNIC

| | |
|---|----|
| Preglednica I: <i>Zaviralne aktivnosti za GyrB in topo IV iz bakterij E. coli in S. aureus. ...</i> | 41 |
| Preglednica II: <i>Rezultati protibakterijskih testov na E. faecalis in S. aureus za najbolj obetavne zaviralce DNA-giraze B.</i> | 43 |

POVZETEK

Po odkritju penicilina se je začel hiter razvoj protimikrobnih učinkovin z delovanjem na različne tarče in z različnimi mehanizmi delovanja, vendar zaradi hitrega širjenja bakterijske odpornosti, že poznane zdravilne učinkovine ne zadoščajo potrebam sodobne družbe. Razvoj novih protimikrobnih učinkovin poteka v dveh smereh, v smeri iskanja novih potencialnih tarč ter v smeri iskanja novih mehanizmov delovanja na že poznane tarče.

Ena izmed že poznanih tarč protibakterijskih učinkovin je encim DNA-giraza, ki sodi v podskupino topoizomeraz tipa IIA. DNA-giraza je ključen encim pri procesu podvajanja molekule DNA, saj ima glavno vlogo pri uvedbi negativnega dodatnega zvitja. Encim je sestavljen iz štirih podenot, iz dveh podenot imenovanih DNA-giraza A (GyrA), ki omogočata cepitev in ponovno združitve molekule DNA, ter dveh podenot imenovanih DNA-giraza B (GyrB), ki s hidrolizo molekul ATP zagotavljata potrebno energijo za encimsko reakcijo.

Na podlagi poznanih kristalnih struktur kompleksov DNA-giraze B z njenimi zaviralci in drugih literarnih podatkov smo načrtovali in sintetizirali deset potencialnih zaviralcev GyrB, ki vsebujejo skupen 4,5-dibromo-*N*-fenil-1*H*-pirol-2-karboksamidnim del. Spojine smo ovrednotili z *in vitro* testom na DNA-girazi iz bakterije *Escherichia coli*, najbolj aktivne spojine pa še na DNA-girazi iz bakterije *Staphylococcus aureus* ter na topoizomerazi IV iz *E. coli* in *S. aureus*. Najaktivnejšim spojinam smo ugotovili protibakterijsko aktivnost na dveh grampozitivnih sevih, *Enterococcus faecalis* in *S. aureus*. Štiri spojine so izkazovale srednje inhibitorne koncentracije (IC₅₀) na GyrB iz *E. coli* nižje od 0.14 μM, najaktivnejša spojina **20** pa je imela IC₅₀ vrednost le 15.4 nM, kar jo uvršča med najaktivnejše trenutno poznane zaviralce GyrB. Testirane spojine niso izkazovale obetavnega protibakterijskega delovanja, saj je le spojina **22** pri koncentraciji 50 μM povzročila 19-odstotno zaviranje rasti seva *E. faecalis*. Rezultati pridobljeni z magistrskim delom predstavljajo pomemben prispevek k razvoju novih majhnih molekul kot zaviralcev DNA-giraze B in prinašajo pomembne podake za nadaljnjo optimizacijo in razvoj novih protibakterijskih učinkovin.

Ključne besede: 4,5-dibromopirrolamid, DNA-giraza B, topoizomeraza IV, ATP kompetitivni zaviralec, encimska aktivnost, protibakterijske učinkovine

ABSTRACT

In the first decades after the discovery of penicillin there followed a fast development of new antibacterial drugs acting through different targets and different mechanisms of action. However, due to fast development of bacterial resistance to currently known pharmaceutical drugs, these have become inadequate for the needs and treatment of modern society. Nowadays the development of new antibacterial drugs follows two strategies, the search for new potential targets and the search for new mechanisms of action through already known targets.

One of the known and validated targets for the development of antibacterial drugs is enzyme DNA gyrase that belongs to a group of type IIA topoisomerases. DNA gyrase is involved in the processes of DNA replication and its main role is introducing negative supercoils into the circular DNA molecule. The enzyme consists of four subunits, two DNA gyrase A subunits (GyrA), which are responsible for breakage and reunion of the DNA double strand, and two DNA gyrase B subunits (GyrB), which provide the energy for the enzymatic reaction through hydrolysis of ATP.

Based on co-crystal structures of DNA gyrase B with known inhibitors and other literature data we designed ten potential DNA gyrase B inhibitors with 4,5-dibromo-*N*-phenyl-1-*H*-pyrrole-2-carboxamide substructures. We have successfully synthesized a series of ten compounds and evaluated their inhibitory activities on DNA gyrase from *Escherichia coli*. Most potent inhibitors were tested also on DNA gyrase from *Staphylococcus aureus* and on the enzyme topoisomerase IV from *E. coli* and *S. aureus*. Antimicrobial properties of the selected subset of compounds were assessed against two Gram-positive bacterial strains, *Enterococcus faecalis* and *S. aureus*. Four compounds demonstrated promising inhibitory activities with IC₅₀ values lower than 0.14 μM. The most potent was compound **20** with an IC₅₀ value of 15.4 nM, and is thus among the best currently known small-molecule inhibitors of GyrB. None of the tested compounds showed good antibacterial activity, since the best compound **22** resulted in 19%-inhibition of the growth of *E. faecalis* strains at 50 μM. The results obtained during this study are an important contribution to the discovery of new small-molecule inhibitors of bacterial DNA gyrase B, and due to very promising inhibitory activities, provide valuable information for future optimization and design of novel potent antibacterial agents.

Key words: 4,5-dibromopyrrolamide, DNA gyrase B, topoisomerase IV, ATP competitive inhibitor, enzymatic activity, antibacterial drugs

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|------------------|--|
| ADPNP | adenozin 5'-(β,γ -imido)trifostat |
| Arg | arginin |
| Asn | asparagin |
| Asp | asparaginska kislina |
| ATP | adenozintrifosfat |
| br s | širok singlet |
| d | dublet |
| dd | dublet dubleta |
| DKM | diklorometan |
| DMAP | 4-dimetilaminopiridin |
| DMSO- d_6 | devteriran dimetilsulfoksid |
| DNA | deoksiribonukleinska kislina |
| EA | etilacetat |
| ESI | »electrospray« ionizacija, ionizacija z razprševanjem raztopin v električnem polju |
| G(-) | po Gramu negativna bakterija |
| G(+) | po Gramu pozitivna bakterija |
| Glu | glutaminska kislina |
| Gyl | glicin |
| GyrA | podenota A DNA- giraze |
| GyrB | podenota B DNA- giraze |
| His | histidin |
| HPLC | tekočinska kromatografija visoke ločljivosti |
| HR-MS | masna spektrometrija visoke ločljivosti |
| Hz | herc |
| IC ₅₀ | srednja inhibitorna koncentracija |
| Ile | izolevcin |
| IR | infrardeča (spektroskopija) |
| <i>J</i> | sklopitvena konstanta |
| Leu | levcin |

| | |
|----------------|---|
| Lys | lizin |
| N | normalnost |
| m | multiplet |
| M | molarnost (g/mol) |
| MS | masna spektrometrija |
| NMM | <i>N</i> -metilmorfolin |
| NMR | jedrska magnetna resonanca |
| PE | petroleter |
| R _f | retardaencijski faktor |
| s | singlet |
| SAR | odnos med strukturo in delovanjem |
| T | temperatura |
| TBTU | <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N,N'</i> -tetrametilamonijev tetrafluoroborat |
| Thr | treonin |
| TLC | tankoplastna kromatografija |
| TMS | tetrametilsilan |
| topo IV | topoizomeraza IV |
| Tyr | tirozin |
| Val | valin |
| δ | kemijski premik |

1. UVOD

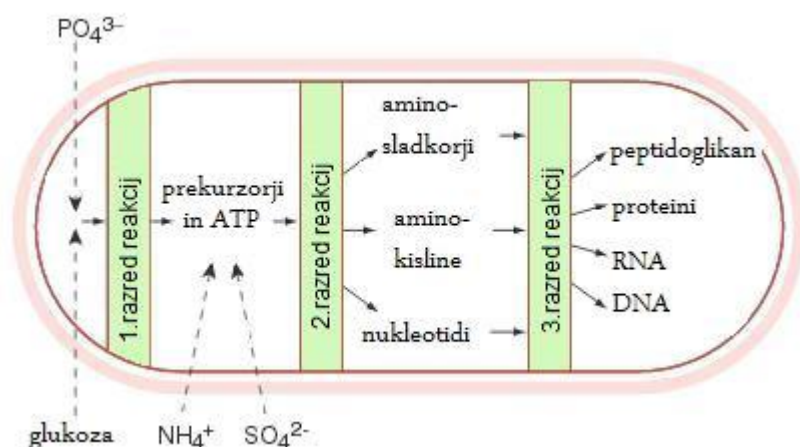
1.1. Protimikrobne učinkovine

Po odkritju penicilina leta 1928 se je začel hiter razvoj novih kemoterapevtikov ter velik napredek protimikrobnega zdravljenja. Antibiotike uvrščamo v širšo skupino kemoterapevtikov, v katero sodijo presnovki določenih vrst mikroorganizmov ali njihovi polysintezni derivati in popolnoma sintetizirane spojine, ki preprečijo rast ali povzročijo smrt drugih mikroorganizmov ter učinkovine, ki zavirajo rast ali uničijo rakave celice (1). Protibakterijske učinkovine razdelimo glede na mehanizem delovanja, kemijsko strukturo ali spekter delovanja. Po učinkovanju na bakterije so lahko bakteriostazne (preprečijo rast bakterije) ali baktericidne (povzročijo smrt bakterijske celice). Po spektru delovanja protibakterijske učinkovine razdelimo v tri skupine, (i) ozko delujoče antibiotike, ki delujejo le na manjše število različnih mikroorganizmov, (ii) antibiotike z zmernim spektrom delovanja, ki učinkujejo na po Gramu pozitivne in na del po Gramu negativnih bakterij ter (iii) širokospektralne antibiotike, ki učinkujejo tako na po Gramu pozitivne kot negativne bakterije (1, 2, 3).

Ena pomembnejših lastnosti delovanja protimikrobnih učinkovin je selektivna toksičnost, saj želimo, da kemoterapevtik deluje le na povzročitelja okužbe ne pa na gostitelja. Za dobro protibakterijsko učinkovino so pomembne tudi druge lastnosti, kot so volumen porazdelitve, širok spekter protibakterijskega delovanja, dolga razpolovna doba v plazmi, šibka vezava na plazemske proteine, odsotnost neželenih učinkov ter dovolj dolga biološka uporabnost pri peroralnem zaužitju. Vse te lastnosti lahko dosežemo s premišljenim načrtovanjem in optimizacijo učinkovin s pomočjo farmacevtsko-kemijskih metod ter poznavanjem strukturnih in funkcionalnih razlik med človeškimi in bakterijskimi celicami (1, 2, 3).

Potencialne tarče kemoterapevtikov so pretežno encimi, ki sodelujejo pri biokemijskih reakcijah, ki jih na molekularni ravni delimo v tri skupine, in sicer (i) od ATP odvisna sinteza preprostih organskih spojin, ki sodelujejo pri nadaljnjih reakcijah, (ii) od ATP odvisna sinteza ogljikohidratov, aminokislin, aminosladkorjev, nukleotidov, fosfolipidov in rastnih faktorjev, ki jih celice potrebujejo za preživetje in rast ter (iii) združevanje manjših molekul v makromolekule (polisaharide, peptidoglikan, proteine, RNA, DNA) (Slika 1). Encimi, ki sodelujejo pri reakcijah prve skupine so najmanj primerne tarče, saj

imajo človeške in bakterijske celice podoben mehanizem izkoriščanja glukoze za pridobivanje energije. Poleg tega bakterijske celice niso odvisne le od glukoze, saj imajo dobro razvit mehanizem za pridobivanje energije tudi iz nesladkornih virov, kot so aminokislina in laktat. Reakcije druge skupine so boljši vir potencialnih tarč, saj v bakterijah potekajo nekatere sintezne poti, ki jih v človeških celicah ni, zato mora človek te snovi pridobiti iz okolice. Tak primer so npr. sinteze esencialnih aminokislinskih in folne kisline, ki jih lahko bakterije sintetizirajo same. Najbolj primerne tarče za doseganje selektivne toksičnosti so encimi tretje skupine reakcij, kamor sodi biosinteza velikih molekul, kot so peptidoglikan, proteini in nukleinske kisline, saj tu obstajajo največje razlike med bakterijskimi in človeškimi celicami. Na sintezo nukleinskih kislin lahko vplivamo z zaviranjem sinteze nukleotidov preko delovanja na encime, kot so DNA ali RNA polimeraza ter DNA-giraza, z vgrajevanjem spremenjenih baznih parov, ali z direktnim delovanjem na DNA molekulo (1, 2).



Slika 1: Shematski prikaz treh osnovnih tipov biokemijskih reakcij (prirejeno po 1).

Glede na mehanizem delovanja razlikujemo štiri glavne skupine protimikrobnih učinkovin: (i) zaviralce sinteze celične stene (glikopeptidi, β -laktami, vankomicin, bacitracin), (ii) zaviralce sinteze beljakovin (tetraciklini, aminoglikozidi, makrolidi), (iii) zaviralce sinteze jedrnih kislin (fluorokinoloni, sulfonamidi, trimetoprim) in (iv) učinkovine, ki ovirajo s citoplazemsko membrano povezane procese (polimiksini, amfotericin B) (1, 3).

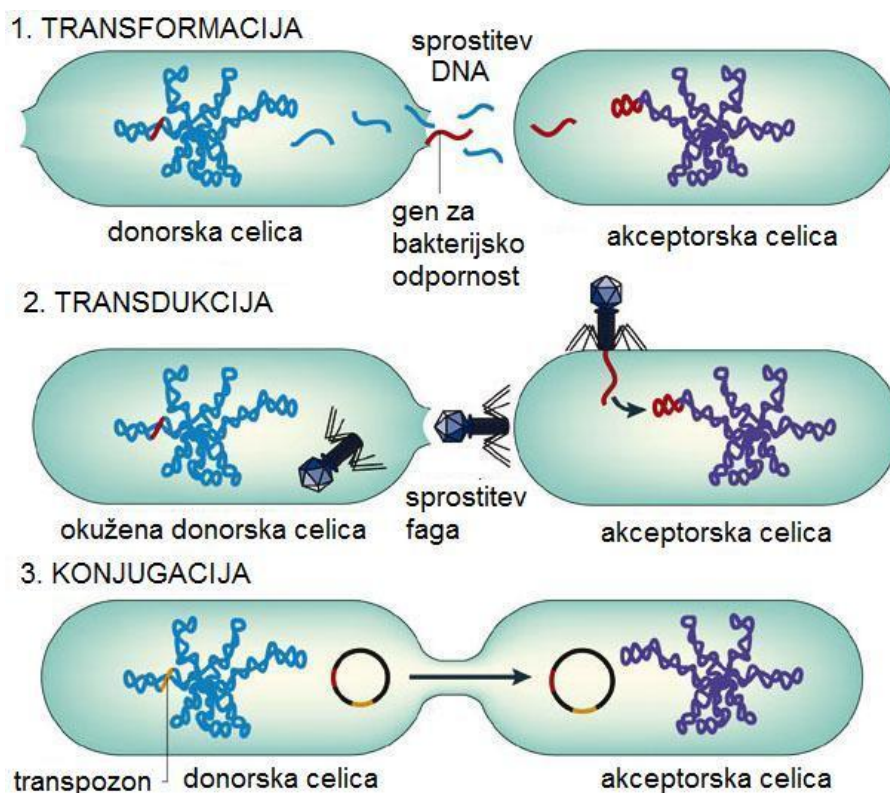
1.2. Pojav rezistence

Bakterijska odpornost postaja vedno večji problem današnje družbe, njen hiter razvoj pa je predvsem posledica nepravilne in nedosledne uporabe antibiotikov v preteklosti ter hitrega

prilagajanja bakterij na že poznane protibakterijske učinkovine. Zaradi tega postaja zdravljenje infekcijskih okužb vse zahtevnejše, potreba po razvoju novih in učinkovitejših antibiotikov pa vse večja (3).

Bakterije so skozi čas razvile različne mehanizme odpornosti na antibiotike, ki jim omogočajo preživetje v neugodnih razmerah. Odpornost na posamezen antibiotik je lahko naravna ali pridobljena. Naravna odpornost je prisotna že pred stikom z določeno protimikrobno učinkovino (npr. bakterije, ki nimajo celične stene), pridobljena odpornost pa se razvije po stiku s kemoterapevtikom. Poznamo tudi navzkrižno odpornost bakterijskih celic, to je odpornost bakterij na več različnih antibiotikov hkrati. Tak primer so na primer enterobakterije, ki so zaradi zgradbe njihove celične stene naravno odporne proti makrolidnim učinkovinam, saj je preprečen njihov vstop v celico, in glikopeptidom, ki zavirajo sintezo peptidoglikana. Verjetnost za nastanek spontane mutacije (inverzije, duplikacije ali delecije) je v posamezni bakterijski celici izredno nizka (10^{-7}), a ker je v primeru bakterijske okužbe število bakterijskih celic zelo veliko, je s tem večja tudi verjetnost mutacij, zlasti pri določeni kombinaciji antibiotikov z določenimi vrstami bakterij. Nekaj spremenjenih bakterij v populaciji večinoma še ne vodi do intrinzične odpornosti bakterijskega seva, saj antibiotično zdravljenje močno zmanjša število patogenih celic in s tem verjetnost za razvoj bakterijske odpornosti (1, 3).

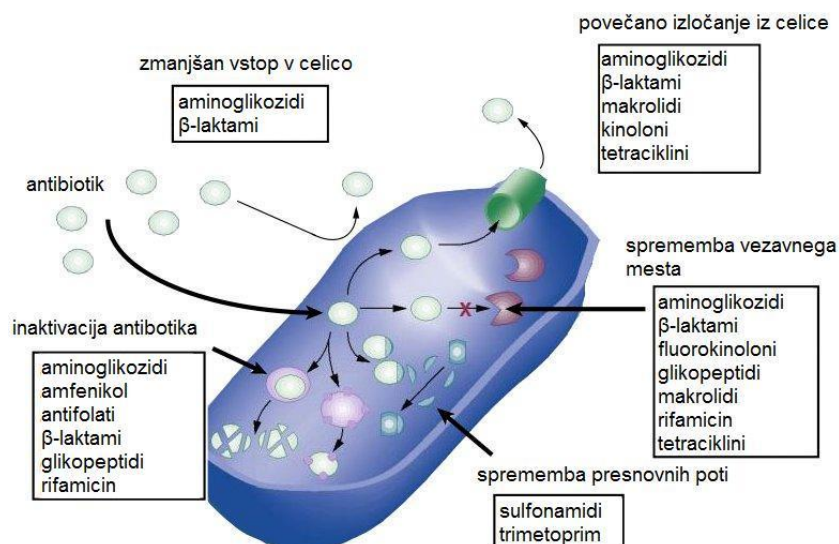
Do pridobljene odpornosti lahko pride zaradi spremembe genoma bakterijske celice s prenosom genov znotraj bakterije ali med bakterijami. Poznamo tri mehanizme izmenjave genskega zapisa med bakterijami, in sicer konjugacijo, transdukcijo in transformacijo (slika 2). Konjugacija je glavni mehanizem širjenja odpornosti, saj pri njej pride do neposrednega stika med bakterijskima celicama, kjer se preko pilusa prenese krajši del krožne DNA. Pri transdukciji se dedni zapis prenese preko bakteriofaga in je klinično pomembna predvsem pri bakterijskih sevih stafilokokov in streptokokov. Pri transformaciji pride do vključitve proste DNA iz okolice, zato se pojavlja redkeje in je klinično manj pomembna. Prenos genov za odpornost se lahko poteče tudi s transpozoni, ki omogočajo prenos med dvema plazmidoma ali med kromosomom in plazmidom (1).



Slika 2: Mehanizmi izmenjave dednega materiala med bakterijskimi celicami: transformacija, transdukcija in konjugacija (prirejeno po 4).

Bakterije lahko odpornost razvijejo preko petih osnovnih biokemijskih mehanizmov (slika 3), in sicer: (i) preko spremembe vezavnega mesta za antibiotik (npr. zmanjšanje vezavne afinitete penicilin vezočih beljakovin), (ii) z encimsko razgradnjo (npr. β -laktamaze razgradijo betalaktamske antibiotike), (iii) z neprepustnostjo oziroma zmanjšano prepustnostjo celične membrane (npr. manjše strukturne spremembe porinov v celični steni G(–) bakterij), (iv) preko spremembe presnovnih mehanizmov na katere deluje antibiotik in (v) z aktivnim črpanjem protimikrobne učinkovine iz bakterijske celice.

Zaradi zelo hitrega razmnoževanja bakterij se pridobljeni mehanizmi odpornosti izrazijo hitro, zato pri načrtovanju novih učinkovin želimo pogosto, za zmanjšanje verjetnosti pojava rezistence, doseči t.i. dualno inhibicijo, torej zaviranja dveh tarč hkrati. Možni tarči za razvoj dualno delujočih protimikrobnih učinkovin sta tudi encima iz skupine bakterijskih topoizomeraz tipa IIA, DNA-giraza in topoizomeraza IV, ki sta ključni za razmnoževanje in preživetje bakterij (1, 3, 6).



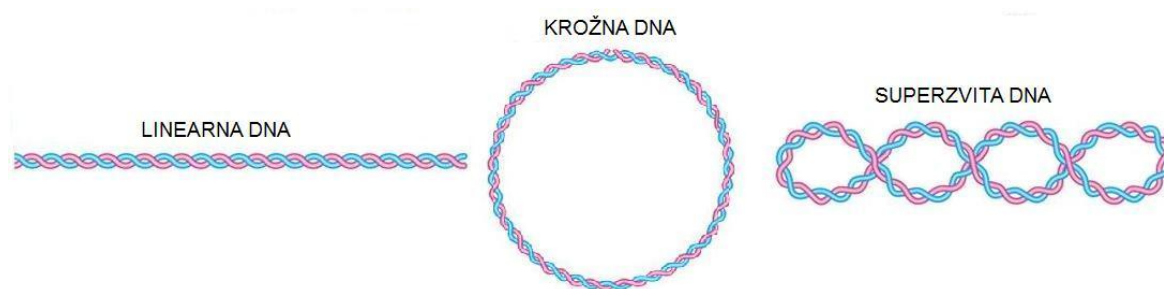
Slika 3: Shematski prikaz petih osnovnih mehanizmov nastanka bakterijske odpornosti proti antibiotikom (prirejeno po 5).

1.3. DNA kot tarča zdravilnih učinkovin

1.3.1. Zgradba in vloga molekule DNA

Deoksiribonukleinska kislina (DNA) je makromolekula zgrajena iz monomernih nukleozidnih enot (adenozin, timidin, gvanozin, citidin) kovalentno povezanih s fosfodiestrsko vezjo in služi kot shramba genetskih informacij. V evkariontskih celicah je molekula DNA v kromosomih v celičnem jedru, najdemo pa jo tudi v nekaterih citoplazemskih organelih (mitohondriji, Golgijev aparat, kloroplasti, endoplazemski retikulum itd.). Prokariontske celice za razliko od evkariontskih nimajo jedra, zato je glavna krožna molekula DNA prosto v citoplazmi, prisotni pa so lahko tudi krajši deli krožne DNA imenovani plazmidi.

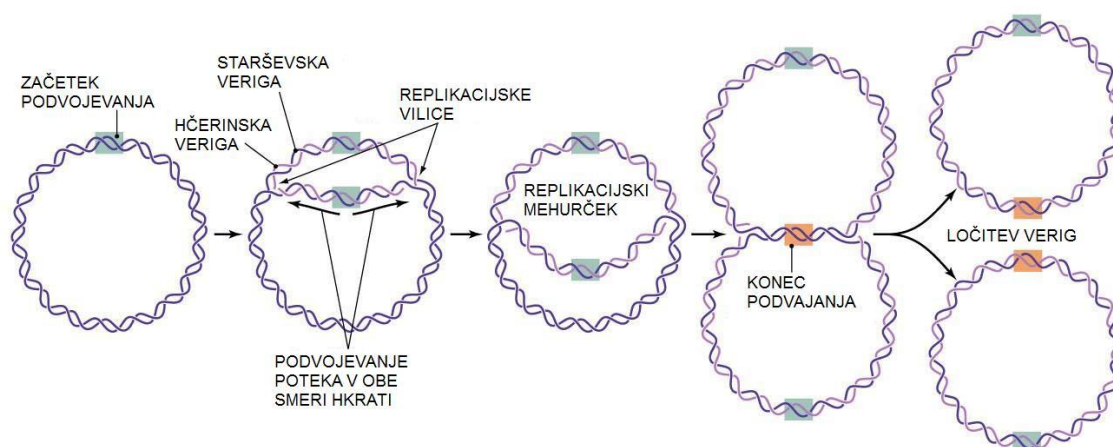
Molekula DNA je pomembna zaradi vloge pri shranjevanju, izražanju in prenašanju genetske informacije. Sestavljena je iz dveh komplementarnih polinukleotidnih verig zvitih v dvojno vijačnico, ki je lahko v linearni ali krožni obliki (slika 4). Krožno kromosomsko DNA najdemo zlasti pri bakterijah, bakteriofagih, virusih, mitohondrijih ter kloroplastih in je lahko prisotna v dveh oblikah, sproščeni in dodatno zviti. Sproščena oblika DNA je v obroč povezana dvojna vijačnica, dodatno zvita (superzvita) pa se pred zaprtjem vsaj enkrat zasuka okoli svoje osi in je pomembna zlasti, ker se v majhen prostor lahko shrani velika in dolga molekula DNA. Pretvorbo med sproščeno in superzvito obliko katalizirajo encimi iz skupine topoizomeraz (7).



Slika 4: Oblike dvojne vijačnice: linearna, krožna in superzvita DNA (prirejeno po 8).

1.3.2. Podvojevanje DNA molekule

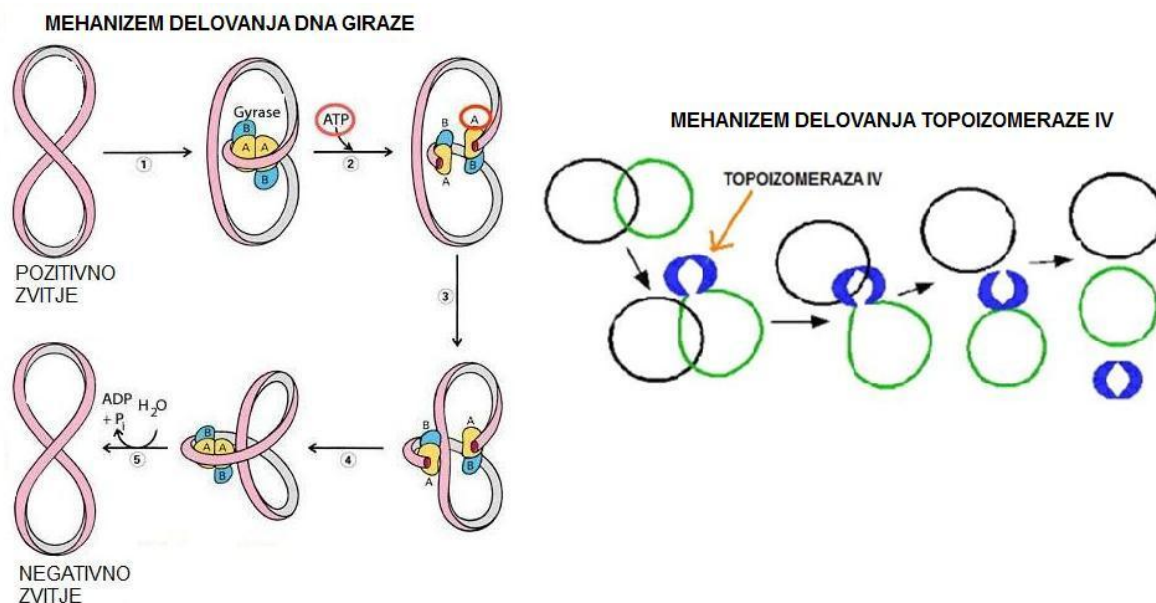
Molekula DNA je v celici močno zvita in strnjena v majhnem prostoru, zato mora med podvajanjem priti do ločitve komplementarnih verig, pri čemer nastane replikacijski mehurček. Podvajanje DNA poteka semikonzervativno, to pomeni, da starševski verigi služita kot matrici za izgradnjo novih komplementarnih verig. Podvajanje se začne na točno določenem mestu in poteka v obe smeri, poteka pa tudi na več mestih hkrati. Odvijanje starševskih verig in posledično večanje replikacijskega mehurčka poveča napetost v dvojnovijačni verigi, zaradi česar je nujna prisotnost encimov iz skupine topoizomeraz, ki sprostijo napete odseke DNA v sproščeno obliko, da se rast podvojevalnega mehurčka lahko nadaljuje. Ko se replikacijski vilici (del kjer v nekem trenutku poteka podvojevanje DNA) srečata in iz ene materinske molekuli DNA nastaneta dve hčerinski, je podvojevanje končano, ločitev novonastalih krožnih DNA pa prav tako katalizirajo topoizomeraze (7).



Slika 5: Podvajanje krožne DNA (prirejeno po 9).

1.3.3. Bakterijske topoizomeraze

Topoizomeraze so skupina encimov, ki katalizirajo topološke spremembe DNA z energijo, pridobljeno iz hidrolize ATP, in so dobro poznane tarče za razvoj novih protimikrobnih učinkovin. Delimo jih v dve skupini, topoizomeraze I, ki katalizirajo cepitev ene verige dvojne vijačnice ter topoizomeraze II, ki katalizirajo cepitev obeh verig dvojnivijačne DNA hkrati. V bakterijskih celicah najdemo dva tipa topoizomeraze II iz podskupine IIA, in sicer DNA-girazo in topoizomerazo IV, ki sta vitalnega pomena za prepisovanje, podvajanje in cepitev DNA. Encim DNA-giraza je odgovoren za uvedbo in odstranitev negativnega zvitja dvojne vijačnice DNA pri podvajanju, s čemer se sprosti torzijska napetost v vezeh, medtem ko topoizomeraza IV sodeluje pri superzvitju verig ter katalizira ločitev hčerinskih verig DNA po končanem podvajanju (10, 11).

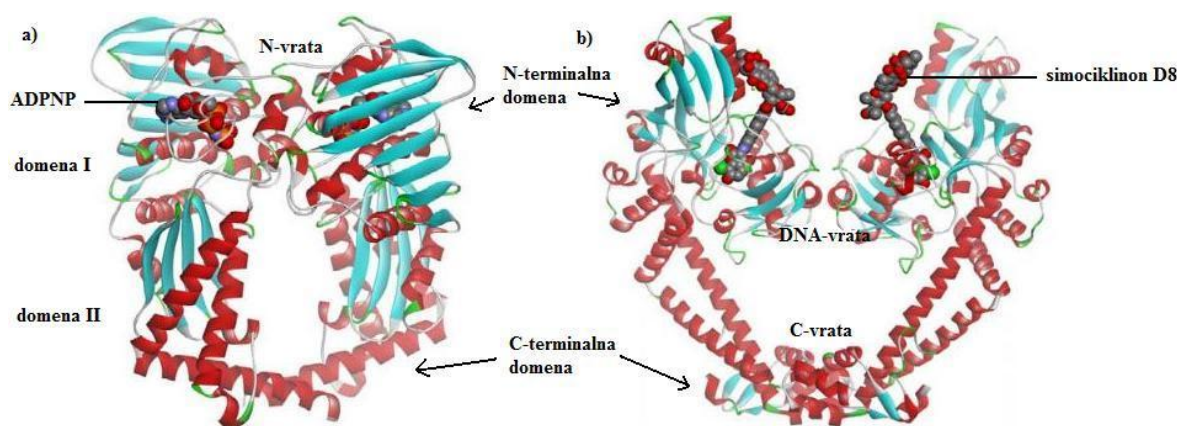


Slika 6: Delovanje DNA-giraze in topoizomeraze IV (prirejeno po 12 in 13).

1.3.4. Struktura DNA-giraze in topoizomeraze IV

DNA-giraza je heterotetramerni encim, sestavljen iz dveh podenot imenovanih DNA-giraza A ali GyrA in dveh podenot imenovanih DNA-giraza B ali GyrB, ki skupaj sestavljajo funkcionalni encim A₂B₂. Podobno je topoizomeraza IV sestavljena iz dveh podenot ParC, homolognih podenotam GyrA, in dveh podenot ParE, homolognih podenotam GyrB, ki tvorijo aktivni kompleks C₂E₂. Oba para homolognih podenot (GyrA in ParC oz. GyrB in ParE) vsebujeta veliko podobnosti v aminokislinskem zaporedju in v tridimenzionalni strukturi aktivnih mest, zato je tudi njuna funkcija podobna. Podenota

DNA-giraze A cepi in ponovno spoji molekulo DNA, DNA-giraza B pa z vezavo molekule ATP in z njeno hidrolizo pridobiva energijo potrebno za potek encimske reakcije. Do sedaj kristalni strukturi celotnih funkcionalnih tetramerov DNA-giraze in topoizomeraze IV še nista poznani, razrešenih pa je bilo veliko kristalnih struktur manjših delov obeh encimov, med katerimi so predvsem pomembni kompleksi podenot GyrA in GyrB z njihovimi zaviralci. Ena izmed prvih razrešenih kristalnih struktur je bila 43 kDa velika kristalna struktura *N*-terminalnega dela GyrB v kompleksu z ADNP, ki je nehidrolizabilni analog ATP (slika 7a). Kristalne strukture posameznih delov encimov razkrivajo, da je struktura bakterijskih topoizomeraz IIA podobna strukturi človeških topoizomeraz tipa II. Encim je sestavljen iz dveh domen, *N*-terminalne domene in *C*-terminalne domene ter treh vrat, *N*-vrata, DNA-vrata in *C*-vrata (slika 7). Vrata se zaporedno odpirajo in zapirajo ter s tem omogočajo stopenjsko katalitično cepitev DNA (10, 14, 15).



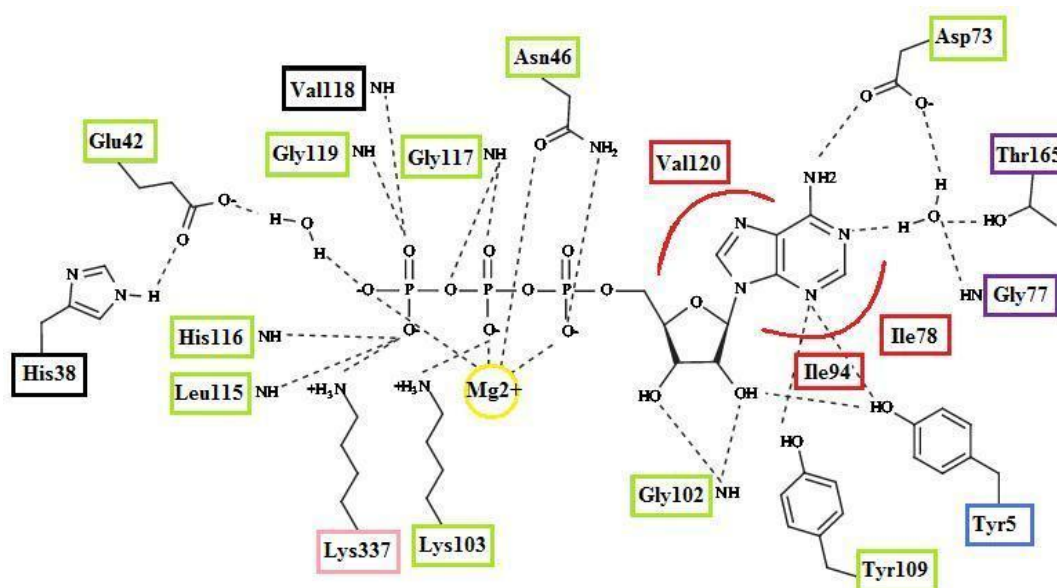
Slika 7: a) Kristalna struktura podenote GyrB₂ iz *E.Coli* v kompleksu z ADPNP in b) kristalna struktura GyrA₂ v kompleksu z zaviralcem simociklinom D8. *N*-vrata ležijo na stiku dveh podnot GyrB, *C*-vrata ležijo na stiku *C*-terminalnih domen podenot GyrA, DNA vrata pa so umeščena med *N*- in *C*-vrata (prirejeno po 10).

1.3.5. Vezavno mesto za ATP na DNA-girazi B

Potencialno tarčno mestno novih zaviralcev bakterijske DNA-giraze je vezavno mesto za ATP, ki ga najdemo na podenoti GyrB. Vezavno mesto za ATP je tudi v mnogih drugih encimih, ki so nujni za preživetje človeških celic, zato je ciljanje take tarče lahko tvegano. Pri načrtovanju ATP kompetitivnih zaviralcev GyrB moramo doseči visoko selektivnost vezave le za vezavno mesto na DNA-girazi, ključno pri tem pa je dobro poznavanje tarče in njenih razlik v primerjavi z ostalimi encimi, ki vežejo ATP (15).

DNA-girazo B tvorita dve domeni, domena I in domena II (slika 7a). Vezavno mesto za molekulo ATP je na domeni I, ki je sestavljena iz osmih β -ravnin in petih α -vijačnic. Domena II je zgrajena iz štirih β -ravnin in štirih α -vijačnic, med obema ravninama je 20 Å velik prostor, obdan z argininskimi ostanki, ki predstavljajo vrata za vstop in transport DNA (16).

Podrobnejša analiza kristalne strukture kompleksa med GyrB in ADPNP (slika 8) je razkrila, da je molekula ATP v aktivnem mestu DNA-giraze B stabilizirana z monogimi vodikovimi vezmi z aminokislinskimi ostanki domene I (Glu42, Asn46, Asp73, Gly102, Lys103, Tyr109, Leu115, His116, Gly117 in Gly119; slika 8 - v zeleni barvi), poleg tega pa tudi s koordinacijskimi vezmi fosfatnih skupin z magnezijevim ionom (slika 8 – v rumeni barvi). Vodikove vezi med adeninon in Asp73, Gly177 in Thr165 so dodatno stabilizirane preko molekule kristalne vode (slika 8 – v vijolični in zeleni barvi). Aminokislinski ostanki Ile78, Ile94 ter Val120 tvorijo hidrofobne interakcije z adeninom in ribozo iz molekule ATP (slika 8 – v rdeči barvi). Vodikovo vez z γ -fosfatno skupino molekule ATP tvori tudi Lys337, ki je del domene II, a prav tako tvori vezavni žep za ATP (slika 8 – v roza barvi). Aminokislinski ostanek Thr5 tvori dve vodikovi vezi z 2'-hidroksi skupino riboze in s 3-N adeninskega obroča (slika 8 – v modri barvi), Ile10 pa preko hidrofobnih interakcij stabilizira dimer, ki nastane s povezovanjem dveh podenot GyrB preko ADPNP oz. in vivo ATP. Aminokislina Thr5 je pomembna, ker je ohranjena v vseh bakterijskih DNA-girazah ni pa prisotna pri evkariontskih topoizomerazah. Poznavanje te in podobnih strukturnih razlik med vezavnimi mesti za ATP pri različnih vrstah topoizomeraz omogoča načrtovanje novih, selektivnejših zaviralcev, z manj neželenimi učinki v terapevtskih odmerkih, ki ne zavirajo strukturno sorodnih encimov (16, 17).



Slika 8: Prikaz interakcij med molekulo ATP in aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu GyrB. Neposredne vodikove vezi so označeno z zeleno in modro, vodikove vezi preko molekule kristalne vode so označeni z vijolično, hidrofobne interakcije so označene z rdečo, koordinacijske vezi z magnezijevim ionom z rumeno ter ionska vez z roza barvo (prirejeno po 16).

1.4. Učinkovine z delovanjem na DNA-girazo

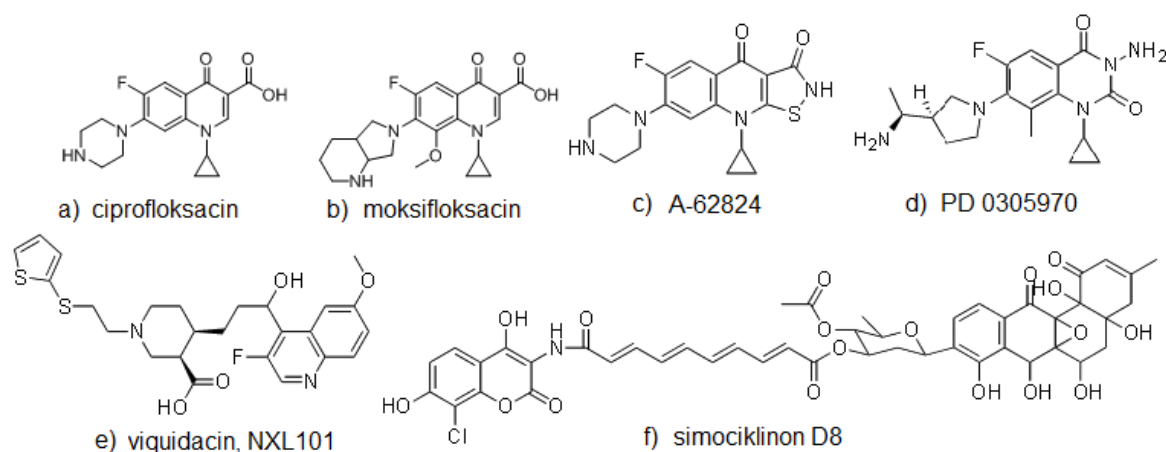
DNA-giraza je dobro poznana in raziskovana tarča za razvoj protibakterijskih učinkovin, saj z njenim zaviranjem ustavimo bakterijsko razmnoževanje in posledično povzročimo celično smrt. Ker je prisotna le v bakterijskih celicah, je primerna tudi z vidika doseganja selektivne toksičnosti, in je zato predmet raziskovanja vse od petdesetih let prejšnjega stoletja (10, 18).

1.4.1. Zaviralci DNA-giraze A

Razvoj zaviralcev GyrA je sprva potekal na podlagi poznavanja osnovnega skeleta nalidiksne kisline in proučevanja s strukturo povezane aktivnosti, zato so bile načrtovane spojine strukturno podobne. Predstavniki skupine fluorokinolonov (slika 9a-b) so edini izmed zaviralcev GyrA in ParC, ki so trenutno v klinični rabi, uporablja pa se že od zgodnjih 60. let prejšnjega stoletja, predvsem za zdravljenje urinarnih, respiratornih in sistemskih okužb. Fluorokinoloni delujejo baktericidno tako proti G(+) in G(-) bakterijam, kot tudi proti atipičnim bakterijam ter sodijo v skupino širokospektralnih antibiotikov, saj stabilizirajo kovalentni kompleks med molekulo DNA ter podenoto GyrA/ParC in s tem preprečijo celično podvajanje in povzročijo celično smrt. Zaradi mnogih neželenih učinkov

in toksičnosti je uporaba fluorokinolonov omejena, problem pa predstavlja tudi naraščajoča rezistenca (2, 10, 11, 16).

V preteklem stoletju so odkrili tudi mnoge druge, fluorokinolonom sorodne razrede zaviralcev DNA-giraze A, na primer izotiazolokinolone (slika 9c), 3-aminokinazolindione (slika 9d), aminopiperidine (slika 9e) ter druge (slika 9f), ki pa niso prišli na tržišče oziroma so jih zaradi slabe selektivnosti ali neželenih stranskih učinkov z njega umaknili (10, 16).



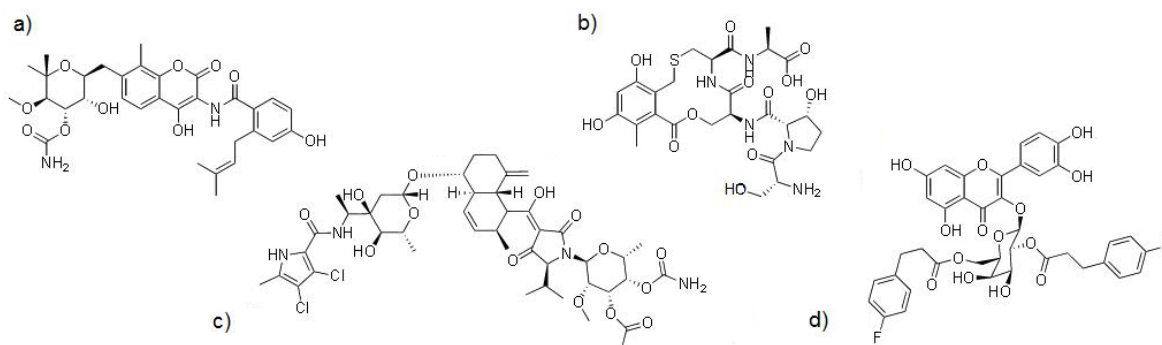
Slika 9: Zaviralci *GyrA* oz. *ParC*. Ciprofoksacin in moksifoksacin iz skupine fluorokinolonov sta pri nas edina v klinični uporabi (prirejeno po 10).

1.4.2. Zaviralci DNA-giraze B

Trenutno v klinični uporabi ni nobenega zaviralca podenote DNA-giraze B, a v zadnjih letih potekajo intenzivne raziskave na tem področju, saj je zaradi hitrega razvoja bakterijske odpornosti nujen razvoj ne le novih učinkovin za obstoječe tarče, ampak tudi razvoj učinkovin, ki isto tarčo zavirajo preko nove poti. Takšen potencial ima DNA-giraza B, saj z vezavo zaviralca na GyrB preprečimo vezavo molekule ATP, posledično pa zaradi energetskega primanjkljaja encim izgubi svojo aktivnost. Dokazano je tudi, da je verjetnost razvoja navzkrižne odpornosti s fluorokinoloni pri zaviralcih GyrB majhna (10, 16).

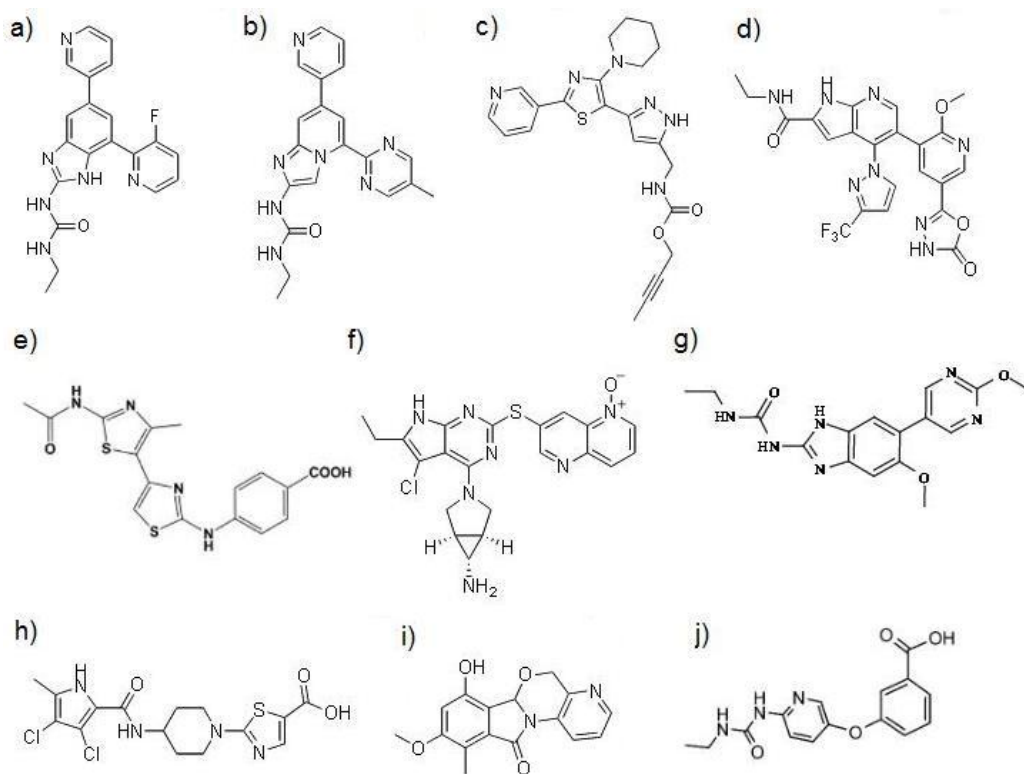
Dva izmed prvih poznanih ATP kompetitivnih zaviralcev DNA-giraze B sta bila naravna aminokumarina, novobiocin (slika 10a) in klorobiocin, ki ju proizvajajo streptomicete. Zaradi velike *in vivo* moči delovanja proti G(+) bakterijam se je novobiocin uporabljal za zdravljenje okužb z MRSA, vendar so ga zaradi toksičnosti in razvoja rezistence kasneje umaknili s tržišča. Ciklotialidini (slika 10b) so druga skupina naravnih zaviralcev GyrB, ki so jih izolirali iz gliv rodu *Streptomyces* in imajo boljšo selektivnost ter jakost vezave na

GyrB v primerjavi z aminokumarini, vendar zaradi svoje lipofilne strukture slabše prehajajo bakterijsko celično steno ter tako kažejo šibkejšo protibakterijsko delovanje in vivo. Kibdelomicin (slika 10c) in amikolamicin prav tako izkazujeta inhibicijo ATP-azne aktivnosti GyrB in ParE, z dobrim delovanjem na G(+) in zmernim na G(-) bakterije, obenem pa nimata izražene navzkrižne rezistence z ostalimi zaviralci DNA-giraze. Zadnja skupina naravnih zaviralcev so analogi kvercetiindiacilglikozidov (slika 10d) z dualnim delovanjem na GyrB in ParE, ki zavirajo le G(+) patogene (10).



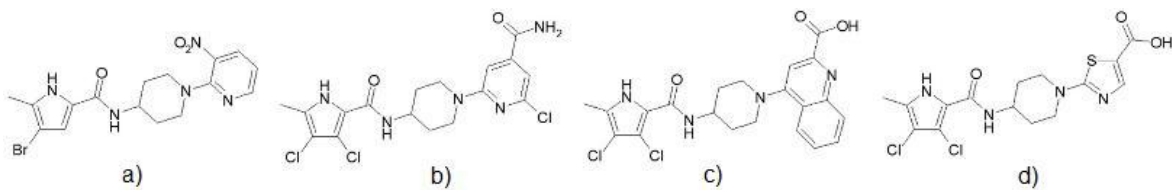
Slika 10: Predstavniki naravnih zaviralcev GyrB: a) novobiocin iz skupine aminokumarinov, b) predstavnik skupine ciklotialidinov, c) kibdelomicin, d) predstavnik skupine analogov kvercetiindiacilglikozidov (prirejeno po 10).

V zadnjih letih so znanstveniki odkrili številne nove razrede zaviralce GyrB s pomočjo virtualnega rešetanja visoke zmogljivosti (*angl.* high-throughput screening, HTS) in strukturno podprtega virtualnega rešetanja (*angl.* virtual screening, VS) ter jih v kasnejših fazah farmakodinamsko in farmakokinetično optimizirali. Poznavanje kristalnih struktur GyrB z vezanimi zaviralci je omogočilo lažjo optimizacijo novih zaviralcev na podlagi razumevanja najpomembnejših interakcij med ligandom in encimom ter pripeljalo do številnih novih strukturnih razredov zaviralcev DNA-giraze B, kot so benzimidazolesečnine, imidazo[1,2-*a*]piridini, pirazoltiazoli, azaindoli, 4,5'-bitiazoli, pirolpirimidini, aminobenzimidazoli, pirolamidi, indazoli, in piridilsečnine (slika 11) (10, 16, 19, 20).



Slika 11: Predstavniki posameznih strukturnih razredov sinteznih zaviralcev GyrB: a) benzimidazolsečnine, b) imidazo[1,2-a]piridini, c) pirazoltiazoli, d) azaindoli, e) 4,5'-bitiazoli, f) pirolopirimidini, g) aminobenzimidazoli, h) pirolamidi, i) indazoli in j) piridilsečnine (prirejeno po 10, 16, 19, 20).

Eden izmed obetavnejših razredov novih zaviralcev GyrB je razred pirolamidov (slika 12), ki so jih odkrili v podjetju AstraZeneca z rešanjem knjižnice manjših fragmentov s pomočjo testa z uporabo jedrske magnetne resonance (NMR). Za serijo spojin na sliki 12 so ugotovili, da izkazujejo dobro delovanje na G(+) bakterije, posebej na *S. aureus*, *E. faecium* in *S. pneumoniae* in nekoliko slabše pa delujejo na G(-) bakterije zaradi slabe prehodnosti celične stene ali hitrega izločanja z izlivnimi črpalkami. Spojino d) na sliki 12 so pri AstraZeneci zaradi ustreznih fizikalno-kemijskih lastnosti in dobre encimske aktivnosti izbrali za nadaljnjo optimizacijo (10, 14, 21).

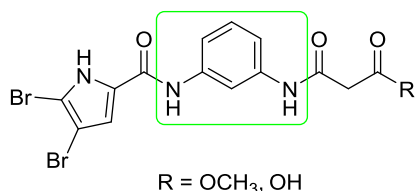


Slika 12: Pirolamidni zaviralci GyrB, ki so jih odkrili pri AstraZeneci (prirejeno po 21).

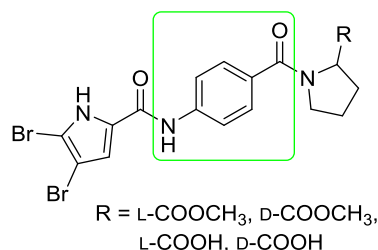
2. NAMEN DELA

V okviru magistrskega dela bomo pripravili serijo spojin s potencialnim zaviralnim delovanjem na DNA-girazo B. Uporabili bomo metode racionalnega načrtovanja, kot sta sidranje spojin v aktivno mesto GyrB in proučevanje strukture aktivnega mesta encima, pomagali pa si bomo tudi z literaturnimi podatki o odnosu med strukturo in delovanjem (SAR) opisanih zaviralcev DNA-giraze B. Sintetizirali bomo več serij spojin, ki bodo vsebovale 4,5-dibromo-*N*-fenil-1*H*-pirol-2-karboksamidni del, razlikovale pa se bodo po substituentih na fenilnem obroču. Razdelili jih bomo v tri strukturne razrede, (A) spojine s 3-aminoanilinskim centralnim delom, (B) spojine s 3-aminobenzoilnim fragmentom in (C) spojine z 2-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzen-1,4-diaminskim centralnim delom (slika13). Spojine bomo sintetizirali po ustaljenih kemijskih postopkih, za potrjevanje pravilnosti struktur in ustrezne čistote spojin pa bomo uporabljali analize metode, kot so na primer jedrska magnetna resonanca (NMR), tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC), infrardeča (IR) spektroskopija, masna spektrometrija (MS). Končne spojine bomo ovrednotili s pomočjo encimskih testov na DNA-girazi in topoizomerazi IV, najaktivnejšim spojinam bomo izmerili tudi protibakterijsko delovanje. Na podlagi bioloških testov bomo proučili odnos med strukturo in delovanjem spojin (SAR).

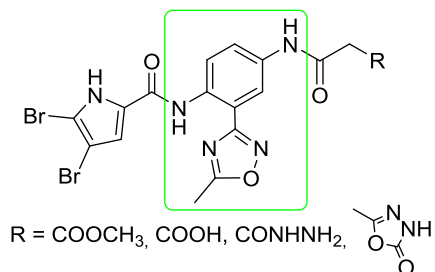
A) Spojine s 3-aminoanilinskim centralnim delom



B) Spojine s 3-aminobenzoilnim centralnim delom



C) Spojine z 2-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzen-1,4-diaminskim centralnim delom



Slika 13: Trije načrtovani strukturni tipi 4,5-dibromo-*N*-fenil-1*H*-pirol-2-karboksamidnih ATP kompetitivnih zaviralcev GyrB.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. REAGENTI IN TOPILA

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

3.2. UGOTAVLJANJE TALIŠČA

Tališča spojin smo ugotovili na Kofflerjevem mikroskopu z ogrevalno mizico proizvajalca Leica. Temperature tališč spojin so nekorrigirane.

3.3. KROMATOGRFSKE METODE

Tankoplastna kromatografija (TLC)

Za izvedbo tankoplastne kromatografije smo uporabljali plošče Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ z 0.20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescentnim indikatorjem in različne razvijalce, najpogosteje zmesi metanola, diklorometana, petroletra in etilacetata. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko z valovnima dolžinama 254 nm in 366 nm ter orositvene reagente.

Kolonska kromatografija

Za čiščenje spojin smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0.063-0.20 mm ter steklene kolone različnih premerov in dolžin, odvisno od količine vzorca. Kot mobilno fazo pa smo uporabili različne zmesi organskih topil. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko z valovnima dolžinama 254 nm in 366 nm ter orositvene reagente.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

HPLC kromatograme smo posneli na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani na instrumentu Agilent Technologies HP 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B. Uporabili smo kolono Phenomenex Luna 5 µm C18 (4.6 mm × 150 mm), volumen injiciranja 10 µL in pretok 1.0 mL/min. Kot mobilno fazo smo uporabili zmes acetonitrila in 0.1% vodne raztopine trifluoroocetne kisline (30–90% acetonitrila v 0.1 % TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min).

3.4. SPEKTROSKOPSKE IN SPEKTOMETRIJSKE METODE

Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektre smo posneli na spektrofotometru Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Jedrsko magnetna resonanca (NMR)

NMR spektre smo posneli na spektrometru Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Kot interni standard smo uporabili TMS, za topilo pa DMSO- d_6 . Spektre smo analizirali s pomočjo programa MestRec 4.7.0.0.

Masna spektrometrija (MS)

Masne spektre in HR-MS analize so opravili na spektrometru Autospec (VG-Analytical) z ESI tehniko na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

3.5. NOMENKLATURA IN RISANJE SPOJIN

Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 14.0 proizvajalca CambridgeSoft.

3.6. SIDRANJE SPOJIN V AKTIVNO MESTO DNA-GIRAZE B

Priprava proteinov in ligandov

Sidranje spojin v ATP-vezavne mesto GyrB smo izvedli na računalniku s štirimi dvojedrnimi procesorji Opteron, s 16 GB RAM-a in 1.2 TB trdega diska ter z osnovnim operacijskim sistemom Fedora 7 na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Trodimenzionalne modele spojin smo generirali in energetsko minimizirali s programom ChemBioOffice Ultra 14.0.

Za pripravo aktivnega mesta encimov, sidranje spojin in oceno njihove vezave smo uporabili program GOLD verzije 5.2. GOLD (Genetic Optimisation for Ligand Docking - genetska optimizacija za sidranje ligandov) je program, ki omogoča simulacijo vezave majhnih molekul v aktivno mesto proteinov. Za računanje vezavnih položajev fleksibilnih ligandov program uporablja genetski algoritem (GA). Iz kristalne strukture DNA-giraze B (PDB koda: 4DUH) smo izbrisali ligand in molekule vod ter dodali vodikove atome. Za aktivno mesto smo definirali aminokislinske ostanke, ki se nahajajo na razdalji 7 Å okoli liganda.

Sidranje spojin

Vsak ligand smo sidrali v 50 neodvisnih ponovitvah. Uporabili smo parametre GA, ki jih je predlagal program GOLD 5.2. Uporabili smo cenilno funkcijo GoldScore. Najboljših pet rešitev sidranja smo vizualno pregledali, za dodatno analizo in predstavitev pa smo uporabili najboljše ocenjeno konformacijo. Grafični prikaz rezultatov sidranja nekaterih spojin smo pripravili s programom PyMOL 1.5 (DeLano Scientific).

3.7. ENCIMSKI TESTI IN UGOTAVLJANJE IC₅₀

Encimske teste je opravil izr. prof. dr. Janez Ilaš, mag. farm., na Fakulteti za farmacijo.

Spojine so bile biološko ovrednotene z ugotavljanjem rezidualne aktivnosti (RA), to je razmerje med aktivnostjo encima ob dodatku zaviralca in v njegovi odsotnosti pri 100 µM koncentraciji zaviralca, za bolj aktivne spojine (RA <10%) pa tudi srednja zaviralna koncentracija (IC₅₀), t.j. koncentracija zaviralca, ki povzroči 50-odstotno inhibicijo encima. Vsem spojinam je bila ugotovljena aktivnost na encimu DNA-giraze iz bakterije *E. coli*, obetavnejšim spojinam iz vsake serije pa tudi aktivnost na encimu DNA-giraze iz bakterije *S. aureus* in na encimih topoizomeraze IV iz bakterij *E. coli* ter *S. aureus*. Za testiranje so bile uporabljene mikrotitrne plošče s streptavidinom in testni komplet proizvajalca Inspiralis. Vrednosti IC₅₀ so bile izračunane s programom GraphPad Prism. (20)

3.8. UGOTAVLJANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI

Na podlagi rezultatov encimskih testov so obetavnejšim spojinam na Univerzi v Helsinkih na Finskem ugotavljali protibakterijsko aktivnost.

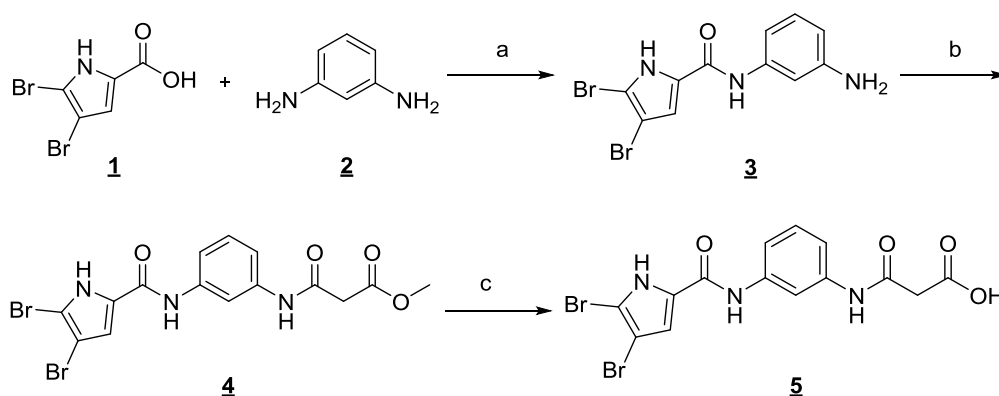
Za testiranje so uporabljali klinično nadzorovane seve *Enterococcus faecalis* (gram-pozitiven, ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (gram-pozitiven, ATCC 25923), Bakterijske seve so gojili na Mueller Hinton II agarju (MHA, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) ter na Mueller Hinton II tekočem gojišču (MHB, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Testi so bili izvedeni z metodo mikrodilucije bujona v skladu s smernicami CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) in EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Protibakterijska aktivnost je bila izmerjena na podlagi primerjave absorbanc vzorcev pri 0, 4, 8 in 24 h ter kontrole pri 620 nm, izražena pa je v odstotkih zaviranja rasti. Na vsaki testni plošči so kot pozitivno kontolo uporabili referenčni antibiotik ciprofloksacin, MIK₅₀ za *E. coli* je <0.015 µg/mL,

MIK₉₀ za *E. coli* je 0.016 µg/ml, za *S. aureus* 0.5 µg/ml, za *E. faecalis* 1 µg/ml in za *P. aeruginosa* 1 µg/ml. Spojine so bile testirane pri koncentraciji 50 µM. (23, 24)

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. REAKCIJSKE SCHEME

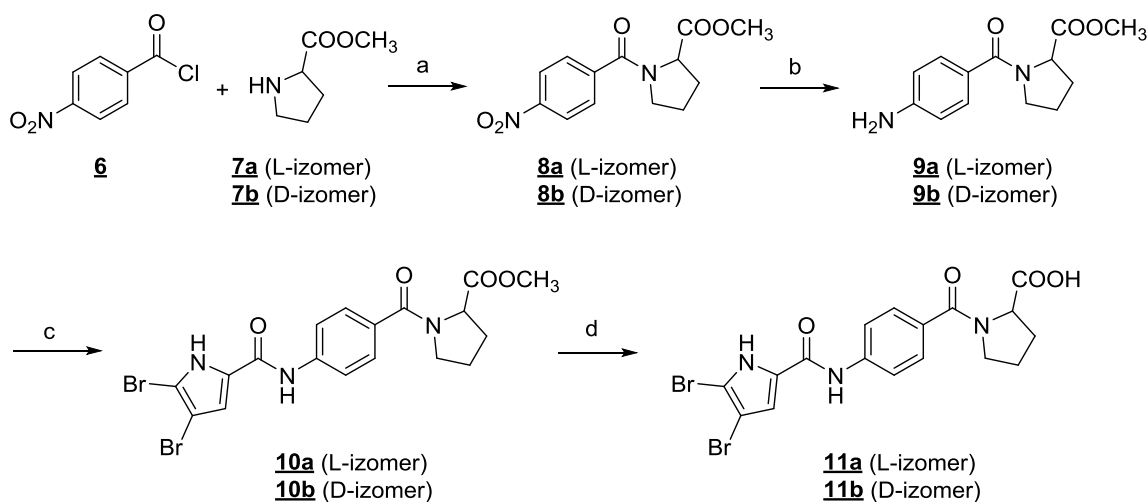
Slika 14 prikazuje sintezo 3-((3-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)fenil)amino)-3-oksopropanojske kisline (**5**). V prvi stopnji smo ob prisotnosti TBTU in *N*-metilmorfolina na 4,5-dibromopirrol-2-karboksilno kislino (**1**) pripeli benzen-1,3-diamin (**2**) ter dobili spojino **3**, ki smo ji s pomočjo metilmalonilklorida in trietilamina pripojili metilmalonilni fragment. Nastalo spojino **4** smo s hidrolizo metilne esterske skupine s pomočjo vodne raztopine litijevega hidroksida pretvorili v končno spojino **5**.



Reagenti in razmere: a) TBTU, NMM, DKM, sobna T, čez noč; b) metilmalonilklorid, Et₃N, DKM/THF, sobna T, 2 h; c) LiOH, MeOH/THF/H₂O, sobna T, čez noč.

Slika 14: Shematski prikaz sinteze spojin z benzen 1,3-diaminskim centralnim delom.

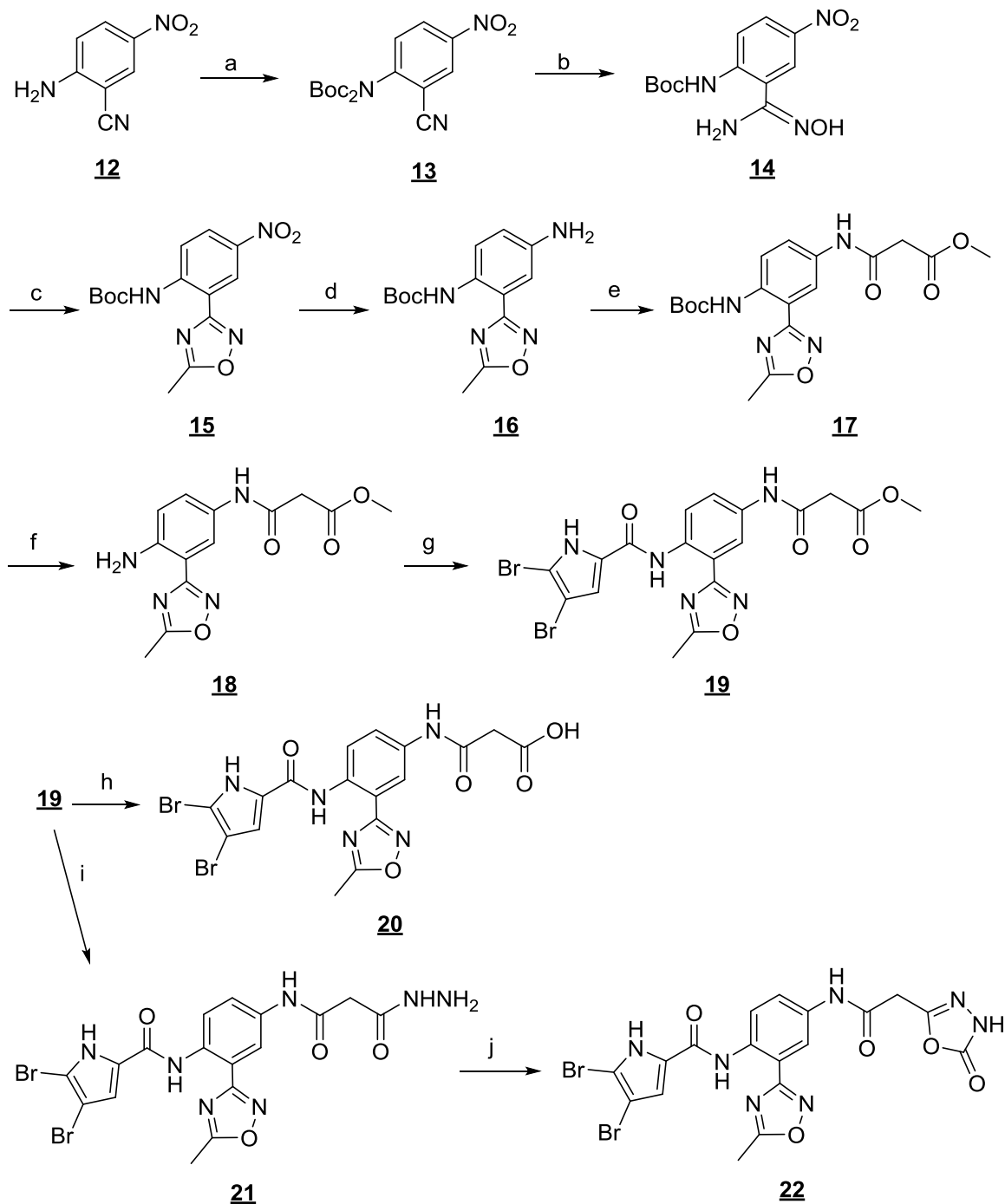
Na sliki 15 je prikazana sinteza L- in D-izomerov (4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzoil)-prolina (**11a-b**). V prvi stopnji smo izvedli reakcijo med 4-nitrobenzoilkloridom (**6**) in metilnim estrom L- oziroma D-prolina (**7a-b**) in na ta način pripravili L- in D-izomera metil(4-nitrobenzoil)prolinata (**8a-b**). V naslednji stopnji smo s kataliznim hidrogeniranjem ob prisotnosti paladija na aktivnem oglju reducirali aromatski nitro skupini v spojinah **8a-b**, nato pa smo nastalima aminoma **9a-b** ob prisotnosti TBTU in *N*-metilmorfolina pripojili 4,5-dibromopirrol-2-karboksilno kislino (**1**), da smo dobili spojini **10a-b**. V zadnji stopnji smo s pomočjo vodne raztopine natrijevega hidroksida hidrolizirali metilno estersko skupino spojin **10a-b** do nastanka karboksilnih kislin **11a-b** po ustreznem nakisanju.



Reagenti in razmere: a) K_2CO_3 , CH_3CN , sobna T, čez noč; b) H_2 , Pd/C, THF/EtOH, sobna T, 6 h; c) (i) 1, oksalilklorid, DKM, sobna T, čez noč, nato (ii) 9a-b, piridin, DKM, sobna T, 6 h; d) 2M NaOH, MeOH/THF, sobna T, čez noč.

Slika 15: Shematski prikaz sinteze spojin z benzoilprolinskim fragmentom.

Sinteza 4,5-dibromopirolamidov **20-22** je prikazana na Sliki 16. Amino skupino 2-amino-5-benzonitrila (**12**) smo z BOC-anhidridom ob prisotnosti trietilamina zaščitili v obliki *tert*-butiloksikarbonilaminske skupine in na ta način dobili spojino **13**. V drugi stopnji smo ob prisotnosti trietilamina izvedli reakcijo nukleofilne adicije hidroksilamina na ciano skupino v spojini **13**, da smo prišli do spojine **14**, ki smo ji nato nastalo *N*-hidroksikarbamimidoično skupino v prisotnosti acetanhidrida in očetne kisline ciklizirali do 5-metil-1,2,4-oksadiazolnega obroča in tako prišli do derivata **15**. V naslednji stopnji smo s pomočjo kositrovega(II) klorida reducirali nitro skupino spojine **15** in nato nastali amski derivat **16** ob prisotnosti kalijevega karbonata pripeli metilmalonilklorid, pri čemer smo dobili spojino **17**. Spojini **17** smo odstranili BOC-zaščito s pomočjo raztopine HCl v 1,4-dioksanu in tako dobili spojino **18**. V nadaljevanju smo ob prisotnosti piridina izvedli reakcijo med spojino **18** in kislinskim kloridom 4,5-dibromopirol-2-karboksilne kisline in tako prišli do amida **19**. Iz spojine **19** smo tvorili dve končni spojini. Spojino **20** smo pripravili tako, da smo metilno estersko skupino v spojini **19** hidrolizirali s pomočjo vodne raztopine natrijevega hidroksida ter ustrezno nakisali s klorovodikovo kislino. Poleg tega smo po drugi poti iz spojine **19** s hidrazin monohidratom pripravili hidrazid **21**, v nadaljevanju pa smo hidrazidni del spojine **21** s pomočjo reagenta 1,1-karbonildiimidazola pretvorili do 5-okso-1,3,4-oksadiazolnega obroča in tako prišli do končne spojine **22**.



Reagenti in razmere: a) Boc anhidrid, DMAP, DKM/CH₃CN, sobna T, čez noč, nato 70 °C, čez noč; b) hidroksilamonijev klorid, Et₃N, EtOH, 20 °C, čez noč; c) acetanhidrid, CH₃COOH, 85 °C, čez noč; d) kositrov(II) klorid, EtOH/etilacetat, 70 °C, 6 h; e) metilmalonilklorid, K₂CO₃, CH₃CN, 0 °C, 12 h; f) 4 M HCl v 1,4-dioksanu, 1,4-dioksan, sobna T, čez noč; g) (i) 1, oksalilklorid, DKM, čez noč, nato (ii) 18, piridin, DKM, sobna T, 6 h; h) NaOH, H₂O/THF, sobna T, čez noč, ekstrakcija z 1 M HCl in EA; i) hidrazin monohidrat, EtOH/THF, 80 °C, čez noč; j) 1,1-karbonildiimidazol, 1,4-dioksan, 100 °C, čez noč, ponovno dodamo 1,1-karbonildiimidazol, DMF, 100 °C, čez noč.

Slika 16: Shematski prikaz sinteze spojin z 5-metil-3-fenil-1,2,4-oksadiazolnim centralnim delom.

1.1. SINTEZNI POSTOPKI

***N*-(3-aminofenil)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid (3)**

4,5-Dibromopirol-2-karboksilno kislino (**1**, 400 mg, 1.49 mmol) in TBTU (521 mg, 1.62 mmol) raztopimo v diklorometanu (15 mL), dodamo *N*-metilmorfolin (377 μ L, 4.06 mmol) ter mešamo 20 min na sobni T. Dodamo benzen-1,3-diamin (**2**, 146 mg, 1.35 mmol) in mešamo čez noč pri sobni T. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etilacetatu (20 mL). Organsko fazo speremo z deionizirano vodo (2×15 mL), z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2×15 mL) in nasičeno raztopino NaCl (15 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, prefiltriramo, da odstranimo NaSO₄ ter uparimo pod znižanim tlakom. Surov produkt čistimo z gradientno kolonsko kromatografijo (EA/PE = 1/2 do EA/PE = 1/1). Izkoristek reakcije: 95 %; temnorjavi kristali (522 mg); tališče: 193-195 °C; R_f (EA/PE= 1/1): 0.38; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 5.13 (s, 2H, NH₂), 6.28-6.31 (m, 1H, Ar-H), 6.83-6.84 (m, 1H, Ar-H), 6.93-6.98 (m, 2H, 2 \times Ar-H), 7.21 (s, 1H, pirol-CH), 9.54 (s, 1H, NH), 12.81 (s, 1H, pirol-NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 98.01, 105.44, 105.68, 108.02, 109.62, 113.52, 128.19, 128.87, 139.29, 148.85, 157.04; IR (ATR) ν = 3412, 3367, 3339, 3185, 1642, 1606, 1547, 1523, 1493, 1443, 1409, 1387, 1316, 1215, 1167, 972, 844, 814, 776, 745, 681, 611 cm⁻¹; MS (ESI) m/z (%) = 355.9 ([M-H]⁻), HRMS za C₁₁H₈N₃OBr₂: izračunan 355.9034, izmerjen 355.9031.

Metil 3-((3-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)penil)amino)-3-oksopropanoat (4)

N-(3-Aminofenil)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid (**3**, 50 mg, 0.13 mmol) raztopimo v zmesi diklorometana (5 mL) in tetrahidrofurana (2 mL), dodamo tretilamin (22 μ L, 0.16 mmol) in metilmalonilklorid (16 μ L, 0.15 mmol) ter mešamo 2 h na sobni T. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etilacetatu (5 mL). Organsko fazo speremo z deionizirano vodo (2×7 mL), z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2×5 mL) in nasičeno raztopino NaCl (5 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, prefiltriramo, da odstranimo NaSO₄ ter uparimo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije: 83 %; svetlorjavi kristali (58 mg); tališče: 214-216 °C; R_f (EA/PE = 1/1): 0.28; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3.49 (s, 2H, CH₂), 3.67 (s, 3H, CH₃), 7.27-7.28 (m, 3H, 3 \times Ar-H), 7.45-7.48 (m, 1H, Ar-H), 8.04 (s, 1H, pirol-CH), 9.88 (s, 1H, amidni-NH), 10.24 (s, 1H, amidni-NH), 12.89 (s, 1H, pirol-NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 43.46 (CH₃), 51.95 (CH₂), 98.13, 105.88, 110.83, 113.90, 114.29, 115.24, 127.86, 128.91, 138.99, 139.15, 157.25, 163.96,

168.17; IR (ATR) $\nu = 3390, 3202, 2954, 1732, 1660, 1641, 1604, 1534, 1486, 1423, 1391, 1327, 1285, 1225, 1200, 1171, 1145, 813, 792, 771, 749, 688, 617 \text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) m/z (%) = 455.9 ($[M-H]^-$), HRMS za $C_{15}H_{12}N_3O_4Br_2$: izračunan 455.9141, izmerjen 455.9183; HPLC: retencijski čas: 9.560 min (96.1% pri 280 nm).

3-((3-(4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)penil)amino)-3-oksopropanojska kislina (5**)**

Spojino **4** (22 mg, 0.46 mmol) raztopimo v zmesi metanola (2 mL), vode (1 mL) in tetrahidrofurana (2 mL), dodamo 2 M raztopino litijevega hidroksida (347 μL , 0.69 mmol) in mešamo čez noč na sobni T. Reakcijsko zmes nevtraliziramo, odparimo organsko topilo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v zmesi 1M HCl (2 mL) in etilacetata (3 mL). Fazi ločimo in organsko fazo speremo z nasičeno raztopino NaCl (3 mL), sušimo z Na_2SO_4 ter odparimo topilo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije 88 %; rjavi kristali (32 mg); tališče: 119-122 °C; R_f (DKM/MeOH/ $\text{CH}_3\text{COOH} = 10/1/0.01$): 0.18; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 3.34 (s, 2H, CH_2 , vrh se prekriva s signalom za vodo), 7.26-7.28 (m, 3H, $3 \times \text{Ar-H}$), 7.45-7.46 (m, 1H, Ar-H), 8.04 (s, 1H, pirol-CH), 9.88 (s, 1H, amidni-NH), 10.17 (s, 1H, amidni-NH), 12.65 (s, 1H, OH), 12.89 (s, 1H, pirol-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 43.96 (CH_3), 98.13, 105.86, 110.81, 113.90, 113.97, 114.27, 115.12, 127.88, 128.87, 139.14, 157.25, 164.52, 169.32; IR (ATR) $\nu = 3390, 3203, 2955, 1731, 1649, 1604, 1533, 1486, 1422, 1390, 1326, 1285, 1225, 1201, 1171, 1145, 813, 792, 773, 749, 689 \text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) m/z (%) = 441.9 ($[M-H]^-$), HRMS za $C_{14}H_{10}N_3O_4Br_2$: izračunan 441.9038, izmerjen 441.9039; HPLC: retencijski čas: 7.874 min (95.0% pri 280 nm).

Metil (4-nitrobenzoil)-L-prolinat (8a**)**

Suspenziji metilnega estera L-Pro (**7a**) (3.00 g, 23.2 mmol) in K_2CO_3 (6.42 g, 46.5 mmol) v acetonitrilu (40 mL) dodamo 4-nitrobenzoilklorid (**6**) (4.31 g, 23.2 mmol) in mešamo na sobni T čez noč. Odparimo topilo, preostanek raztopimo v etilacetatu (40 mL) in vodi (40 mL), ločimo fazi in organsko fazo speremo z vodo ($2 \times 20 \text{ mL}$) in nasičeno raztopino NaCl ($1 \times 20 \text{ mL}$), sušimo nad Na_2SO_4 ter odparimo pod znižanim tlakom. Trden preostanek prelijemo s petroletrom (20 mL), stresamo na ultrazvoku, neraztopljeno snov odfiltriramo in posušimo. Surov produkt prekrizaliziramo iz cikloheksana. Izkoristek reakcije: 50 %; beli kristali (3.23 g); tališče: 107 °C; R_f (EA/PE = 1/1): 0.23; ^1H NMR (400 MHz, DMSO-

d_6) δ 1.91 (m, 3H, CH₂, H_A iz CH₂), 2.30 (m, 1H, H_B iz CH₂), 3.46 (m, 2H, CH₂), 3.69 (s, 3H, CH₃), 4.52 (m, 1H, CH), 7.78-7.80 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar-H-2,6), 8.30-8.32 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar-H-3,5); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 25.37, 29.36, 49.79, 52.47, 59.33, 124.19, 128.94, 142.50, 148.64, 167.01, 172.52; IR (ATR) $\nu = 3113, 2980, 2862, 1744, 1626, 1594, 1520, 1425, 1354, 1317, 1199, 1161, 867, 850, 731, 710$ cm⁻¹.

Metil (4-nitrobenzoil)-D-prolinat (**8b**)

Suspenziji metilnega estra D-Pro (**7b**) (3.00 g, 23.2 mmol) in K₂CO₃ (6.42 g, 46.5 mmol) v acetonitrilu (40 mL) dodamo 4-nitrobenzoilklorid (**6**) (4.31 g, 23.2 mmol) in mešamo na sobni T čez noč. Odparimo topilo, preostanek raztopimo v etilacetatu (40 mL) in vodi (40 mL), ločimo fazi in organsko fazo speremo z vodo (2 × 20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 20 mL), sušimo nad Na₂SO₄ ter odparimo pod znižanim tlakom. Trden preostanek prelijemo s petroletrom (20 mL), stresamo na ultrazvoku, neraztopljeno snov odfiltriramo in posušimo. Surov produkt prekristaliziramo iz cikloheksana. Izkoristek reakcije: 54 %; beli kristali (3.49 g); tališče: 108 °C; R_f (EA/PE = 1/1): 0.23; ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.90 (m, 3H, CH₂, H_A iz CH₂), 2.30 (m, 1H, H_B iz CH₂), 3.46 (m, 2H, CH₂), 3.69 (s, 3H, CH₃), 4.52 (m, 1H, CH), 7.78-7.80 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar-H-2,6), 8.30-8.32 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar-H-3,5); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 25.37, 29.36, 49.79, 52.47, 59.33, 124.19, 128.94, 142.50, 148.64, 167.01, 172.52; IR (ATR) $\nu = 3113, 2980, 2862, 1744, 1626, 1594, 1520, 1425, 1354, 1317, 1199, 1161, 867, 850, 731, 710$ cm⁻¹.

Metil (4-aminobenzoil)-L-prolinat (**9a**)

Metil (4-nitrobenzoil)-L-prolinat (**8a**, 1.60 g, 5.75 mmol) raztopimo v zmesi tetrahidrofurana (80 mL) in etanola (10 mL) ter raztopino preprihomo z argonom. Dodamo Pd-C (500 mg), raztopino preprihomo z vodikom in mešamo čez noč pod vodikovo atmosfero. Odfiltriramo Pd-C in odparimo topilo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije 92 %; svetlorjavi kristali (1.47 g); tališče: 137-138 °C; R_f (EA/PE = 4/1): 0.20; ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.80-1.91 (m, 3H, CH₂, H_A iz CH₂), 2.21-1.26 (m, 1H, H_B iz CH₂), 3.35 (br s, 5H, CH₂N, CH₃), 4.42-4.44 (m, 1H, CH), 5.61 (s, 2H, NH₂), 6.53-6.55 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ar-H-3,5), 7.30-7.32 (d, 2H, Ar-H-2,6); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 25.37, 28.77, 49.76, 51.67, 59.22, 112.40, 121.90, 129.42, 150.97, 168.31, 172.72; IR (ATR) $\nu = 3429, 3330, 3221, 2972, 2878, 1728, 1563, 1438, 1360, 1308, 1202, 1173, 840,$

787, 761, 711, 643, 618 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z (%) = 249.1 ($[\text{M}-\text{H}]^+$), HRMS za $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$: izračunan 249.1239, izmerjen 249.1233.

Metil (4-aminobenzoil)-D-prolinat (**9b**)

Metil (4-nitrobenzoil)-D-prolinat (**8b**, 1.00 g, 3.59 mmol) raztopimo v tetrahidrofuranu (40 mL) ter reakcijsko zmes prepriamo z argonom. Dodamo Pd-C (500 mg), raztopino prepriamo z vodikom in mešamo čez noč pod vodikovo atmosfero. Odfiltriramo Pd-C in odparimo topilo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije 92 %; svetlorjavi kristali (0.92 g); tališče: 135-136 °C; R_f (EA/PE = 4/1): 0.18; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.84-1.85 (m, 3H, CH_2 , H_A iz CH_2), 2.10 (m, 1H, H_B iz CH_2), 3.63 (br s, 5H, CH_2N , CH_3), 4.42-4.43 (m, 1H, CH), 5.60 (s, 2H, NH_2), 6.53-6.55 (d, 2H, $J = 8.4$ Hz, Ar-H-3,5), 7.30-7.31 (d, 2H, Ar-H-2,6); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 25.24, 28.75, 49.76, 51.67, 59.24, 112.40, 121.90, 129.42, 150.97, 168.34, 172.78; IR (ATR) $\nu = 3424, 3330, 3222, 2973, 2878, 1727, 1563, 1438, 1360, 1308, 1202, 1173, 840, 787, 761, 711, 643, 619$ cm^{-1} ; MS (ESI) m/z (%) = 249.1 ($[\text{M}-\text{H}]^+$), HRMS za $\text{C}_{13}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_3$: izračunan 249.1239, izmerjen 249.1240.

Metil (4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)benzil)-L-prolinat (**10a**)

Spojino **1** (150 mg, 0.57 mmol) raztopimo v brezvodnem diklorometanu (5 mL), dodamo oksalilklorid (723 μL) in mešamo čez noč pod argonovo atmosfero. Odparimo topilo, preostanku dodamo svež brezvodni diklorometan (3 mL), piridin (3 mL) in spojino **9a** (92 mg, 0.37 mmol). Po šestih urah odparimo topilo in topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etilacetatu (10 mL). Organsko fazo speremo z 1M HCl (2×7 mL), z nasičeno raztopino NaHCO_3 (2×7 mL) in nasičeno raztopino NaCl (5 mL). Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , prefiltriramo, da odstranimo NaSO_4 ter uparimo pod znižanim tlakom. Spojino čistimo z gradientno kolonsko kromatografijo (EA/PE = 1/1 do 2/1).. Izkoristek reakcije: 40 %; beli kristali (117 mg); tališče: 222-225 °C; R_f (EA/PE = 2/1): 0.34; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.89 (m, 3H, CH_2 , H_A iz CH_2), 2.27-2.30 (m, 1H, H_B iz CH_2), 3.59 (s, 2H, CH_2N), 3.67 (s, 3H, CH_3), 4.47-4.49 (m, 1H, CH), 7.28 (s, 1H, pirol-CH), 7.56-7.58 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar-H-3,5), 7.80-7.82 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar-H-2,6), 10.04 (s, 1H, amidni-NH), 12.98 (s, 1H, pirol-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 25.08 (CH_2), 28.83 (CH_2), 49.60, 51.82, 59.04, 98.25, 106.34, 114.14, 119.02, 127.64, 128.25, 130.44, 140.61, 157.42 (CO), 167.81 (CO), 172.44 (CO); IR (ATR) $\nu = 3198,$

3116, 2950, 2871, 1657, 1631, 1597, 1521, 1424, 1406, 1329, 1247, 1223, 1186, 834, 750 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z (%) = 497.9 ($[\text{M}-\text{H}]^+$), HRMS za $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4\text{Br}_2$: izračunan 497.9664, izmerjen 497.9671; HPLC: retencijski čas: 9.924 min (97.0% pri 280 nm).

Metil (4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzil)-D-prolinat (10b)

Spojino **1** (150 mg, 0.57 mmol) raztopimo v brezvodnem diklorometanu (5 mL), dodamo oksalilklorid (723 μL) in mešamo čez noč pod argonovo atmosfero. Odparimo topilo, preostanku dodamo svež brezvodni diklorometan (3 mL), piridin (3 mL) in spojino **9b** (92 mg, 0.37 mmol). Po šestih urah odparimo topilo in topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etilacetatu (10 mL). Organsko fazo speremo z 1M HCl (2×7 mL), z nasičeno raztopino NaHCO_3 (2×7 mL) in nasičeno raztopino NaCl (5 mL). Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , prefiltriramo, da odstranimo NaSO_4 ter uparimo pod znižanim tlakom. Spojino čistimo z gradientno kolonsko kromatografijo (EA/PE = 1/1 do 2/1). Izkoristek reakcije: 37 %; svetlorjavi kristali (108 mg); tališče: 223-226 $^\circ\text{C}$; R_f (EA/PE = 1/1): 0.14; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.89 (m, 3H, CH_2 , H_A iz CH_2), 2.27-2.29 (m, 1H, H_B iz CH_2), 3.59 (s, 2H, CH_2N), 3.67 (s, 3H, CH_3), 4.47-4.49 (m, 1H, CH), 7.28 (s, 1H, pirol-CH), 7.56-7.58 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar-H-3,5), 7.80-7.82 (d, 2H, $J = 8.8$ Hz, Ar-H-2,6), 10.03 (s, 1H, amidni-NH), 12.98 (s, 1H, pirol-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 25.10 (CH_2), 28.84 (CH_2), 49.59, 51.80, 59.03, 98.22, 106.35, 114.16, 118.98, 127.66, 128.27, 130.44, 140.65, 157.41 (CO), 167.75 (CO), 172.44 (CO); IR (ATR) $\nu = 3195, 3115, 2950, 2871, 1657, 1631, 1596, 1521, 1424, 1406, 1329, 1247, 1223, 1173, 834, 750$ cm^{-1} ; MS (ESI) m/z (%) = 497.9 ($[\text{M}-\text{H}]^+$), HRMS za $\text{C}_{18}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4\text{Br}_2$: izračunan 497.9664, izmerjen 497.9661; HPLC: retencijski čas: 9.924 min (98.2% pri 280 nm).

(4-(4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzil)-L-prolin (11a)

Metil (4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzil)-L-prolinat (**10a**, 45 mg, 0.12 mmol) raztopimo v zmesi metanola (1 mL) in tetrahidrofurana (2 mL), dodamo 2 M natrijev hidroksid (0.305 μL , 0.61 mmol) in mešamo čez noč na sobni T. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etilacetatu (5 mL). Organsko fazo speremo z 1M HCl (2×4 mL), z nasičeno raztopino NaHCO_3 (2×4 mL) in nasičeno raztopino NaCl (4 mL). Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , prefiltriramo, da odstranimo NaSO_4 ter uparimo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije: 62 %; svetlorjavi kristali (43 mg); tališče: 208-210 $^\circ\text{C}$; R_f (EA/PE/AcOH = 2/1/0.01): 0.07; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ

1.89 (m, 3H, CH₂, H_A iz CH₂), 2.26-2.29 (m, 1H, H_B iz CH₂), 3.56-3.58 (m, 2H, CH₂), 4.39-4.41 (m, 1H, CH), 7.28 (s, 1H, pirol-CH), 7.55-7.57 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Ar-H-3,5), 7.79-7.81 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Ar-H-2,6), 10.03 (s, 1H, amidni-NH), 12.53 (s, 1H, COOH), 12.98 (s, 1H, pirol-NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 25.06 (CH₂), 28.90 (CH₂), 49.62, 59.09, 98.27, 106.31, 114.11, 119.00, 127.63, 128.19, 130.76, 140.44, 157.41 (CO), 167.80 (CO), 173.39 (CO); IR (ATR) ν = 3143, 3111, 2979, 2871, 1716, 1636, 1597, 1551, 1524, 1509, 1440, 1407, 1389, 1330, 1306, 1244, 1202, 1179, 831 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* (%) = 481.9 ([M-H]⁻), HRMS za C₁₇H₁₄N₃O₄Br₂: izračunan 481.9351, izmerjen 481.9343; HPLC: retencijski čas: 8.027 min (97.1% pri 280 nm).

(4-(4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzil)-D-prolin (11b)

Metil (4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzil)-D-prolinat (10b, 45 mg, 0.12 mmol) raztopimo v zmesi metanola (5 mL) in tetrahidrofurana (1 mL), dodamo 2 M natrijev hidroksid (0.305 μL, 0.61 mmol) in mešamo čez noč na sobni T. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etilacetatu (5 mL). Organsko fazo speremo z 1M HCl (2 × 4 mL), z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 4 mL) in nasičeno raztopino NaCl (4 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, prefiltriramo, da odstranimo NaSO₄ ter uparimo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije 66 %; svetlorjavi kristali (46 mg); tališče: 207-210 °C; R_f (EA/PE/AcOH = 2/1/0.01): 0.08; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.89 (m, 3H, CH₂, H_A iz CH₂), 2.26-2.29 (m, 1H, H_B iz CH₂), 3.56-3.58 (m, 2H, CH₂), 4.41 (m, 1H, CH), 7.28 (s, 1H, pirol-CH), 7.55-7.57 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Ar-H-3,5), 7.79-7.81 (d, 2H, *J* = 8.8 Hz, Ar-H-2,6), 10.03 (s, 1H, amidni-NH), 12.43 (s, 1H, COOH), 12.98 (s, 1H, pirol-NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 25.09 (CH₂), 28.91 (CH₂), 49.59, 59.08, 98.22, 106.31, 114.15, 118.99, 127.67, 128.21, 130.7, 140.77, 157.40 (CO), 167.75 (CO), 173.39 (CO); IR (ATR) ν = 3113, 2957, 2873, 2357, 1716, 1597, 1523, 1436, 1406, 1328, 1242, 1306, 1242, 1180, 832, 763 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* (%) = 481.9 ([M-H]⁻), HRMS za C₁₇H₁₄N₃O₄Br₂: izračunan 481.9351, izmerjen 481.9361; HPLC: retencijski čas: 8.029 min (98.4% pri 280 nm).

***tert*-Butil-(1-(*tert*-butiloksi)karbonil)(2-ciano-4-nitrofenil)karbamat (13)**

2-Ciano-4-nitroanilin (11, 3.00 g, 18.39 mmol) raztopimo v zmesi diklorometana (30 mL) in acetonitrila (30 mL), dodamo di-*tert*-butildikarbonat (10.00 g, 45.82 mmol) in DMAP (50.00 g, 0.41 mol) ter segrevamo 24 ur pri 70 °C. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in

preostanek raztopimo v etilacetatu (50 mL). Organsko fazo speremo z deionizirano vodo (2×20 mL), z nasičeno raztopino NaHCO_3 (2×20 mL), 0.5 M raztopino HCl (2×20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2×20 mL). Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , prefiltriramo, da odstranimo NaSO_4 ter uparimo pod znižanim tlakom. Suhi preostanek prekristaliziramo iz dietiletra (30 mL). Izkoristek reakcije: 40 %; svetlorumeni kristali (5.2 g); tališče: 87-88 °C; R_f (DKM/PE = 8/2): 0.19; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.39 (s, 18H, $2 \times \text{C}(\text{CH}_3)_3$), 7.93-7.95 (d, 1H, $J = 8.8$ Hz, Ar-H-6), 8.57-8.60 (dd, 1H, $J_1 = 8.8$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, Ar-H-5), 8.90 (d, $J = 2.44$ Hz, 1H, Ar-H-3); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 27.30 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 84.01 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 112.93, 114.34, 128.48, 129.01, 131.29, 146.58, 146.71, 149.08; IR (ATR) $\nu = 3080, 2978, 2936, 2237, 1798, 1529, 1368, 1347, 1276, 1254, 1150, 1095, 845, 832, 786, 776$ cm^{-1} ; MS (ESI) m/z (%) = 362.1 ($[\text{M}-\text{H}]^-$).

***terc*-Butil-*terc*-butil (2-(N'-hidroksikarbamimidol)-4-nitrofenil)karbamat (14)**

Spojino 13 (4.00 g, 11.0 mmol) raztopimo v absolutnem etanolu (50 mL), dodamo hidroksilamonijev klorid (2.29 g, 33.0 mmol) in trietilamin (6.10 mL, 44.0 mmol) ter segrevamo pri 65 °C čez noč. Odparimo topilo, preostanek raztopimo v etilacetatu (50 mL) in 0.5 M HCl (20 mL), ločimo fazi in vodno fazo ekstrahiramo z etilacetatom (2×20 mL). Združene organske faze speremo z nasičeno raztopino NaCl (20 mL), sušimo z Na_2SO_4 in uparimo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije: 53 %; svetlorumeni kristali (3.33 g); tališče: 155-156 °C; R_f (DKM/MeOH = 20/1): 0.60; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1.50 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 6.44 (s, 2H, NH_2), 8.23-8.26 (m, 1H, Ar-H), 8.45-8.51 (m, 2H, $2 \times$ Ar-H), 10.36 (s, 1H, OH/NH), 11.16 (s, 1H, OH/NH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 27.82 ($\text{C}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)_3$), 80.96 ($\underline{\text{C}}(\text{CH}_3)_3$), 118.00, 118.79, 123.36, 124.88, 140.93, 143.18, 151.02, 151.80; IR (ATR) $\nu = 3367, 2982, 1735, 1597, 1497, 1368, 1339, 1309, 1233, 1131, 900, 827, 771, 747, 706$ cm^{-1} ; MS (ESI) m/z (%) = 297.1 ($[\text{M}-\text{H}]^+$).

***terc*-Butil-(2-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)-4-nitrofenil)karbamat (15)**

Spojino 14 (2.86 g, 9.65 mmol) raztopimo v 100-odstotni očetni kislini (30 mL), dodamo acetanhidrid (1.37 mL, 14.48 mmol) in mešamo čez noč pri 85 °C. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etilacetatu (40 mL). Organsko fazo speremo z deionizirano vodo (2×20 mL), z nasičeno raztopino NaHCO_3 (2×20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (20 mL). Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , prefiltriramo, da odstranimo NaSO_4 ter uparimo pod znižanim tlakom. Surov produkt čistimo z gradientno kolonsko

kromatografijo (EA/PE = 1/8 do 1/4). Izkoristek reakcije: 37 %; rumeni kristali (1.6 g); tališče: 139-142 °C; R_f (EA/PE = 1/4): 0.50; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.52 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.76 (s, 3H, CH₃), 8.41-8.44 (dd, 1H, $J_1 = 9.2$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz, Ar-H), 8.49-8.51 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, Ar-H), 8.81-8.82 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, Ar-H-3), 9.83 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 11.98 (CH₃), 27.73 (C(CH₃)₃), 81.69 (C(CH₃)₃), 113.75, 119.23, 124.80, 127.26, 141.45, 143.30, 151.51, 165.68, 177.35; IR (ATR) $\nu = 3293, 3076, 2977, 1725, 1579, 1547, 1512, 1341, 1284, 1237, 1131, 1048, 1025, 871, 852, 765, 683, 640$ cm⁻¹; MS (ESI) m/z (%) = 221.1 ([M-H]⁺).

***tert*-Butil-(4-amino-2-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)fenil)karbamit (16)**

Spojino 15 (1.32 g, 4.11 mmol) raztopimo v zmesi etanola (25 mL) in etilacetata (25 mL), dodamo kositrov(II) klorid (3.89 g, 20.53 mmol) ter zmes segrevamo 6 h na 70 °C. Dodamo nasičeno raztopino natrijevega hidrogenfosfata (20 mL) in segrevamo 1 h na 70 °C. Odparimo topilo, preostanek raztopimo v etilacetatu (30 mL) in vodi (30 mL), ločimo fazi ter organsko fazo speremo z nasičeno raztopino NaCl (20 mL), sušimo z Na₂SO₄ in uparimo pod znižanim tlakom. Surov produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (EA/PE = 1/2 do 1/1). Izkoristek reakcije: 82 %; belorjavi kristali (1.08 g); tališče: 154-155 °C; R_f (EA/PE = 1/1): 0.42; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1.43 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.76 (s, 3H, CH₃), 5.20 (s, 2H, NH₂), 6.71-6.74 (dd, 1H, $J_1 = 8.8$ Hz, $J_2 = 2.8$ Hz, Ar-H-5), 7.24 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, Ar-H-3), 7.57-7.59 (m, 1H, Ar-H-6), 8.76 (s, 1H, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 11.30 (CH₃), 28.05 (C(CH₃)₃), 78.93 (C(CH₃)₃), 113.60 (2 x C, signala se prekrivata), 117.25, 123.45, 126.33, 144.96, 152.88, 167.26, 176.18; IR (ATR) $\nu = 3432, 3357, 2978, 2932, 2360, 2340, 1713, 1528, 1525, 1513, 1296, 1281, 1246, 1231, 1156, 1056, 879, 764, 662$ cm⁻¹; MS (ESI) m/z (%) = 291.1 ([M-H]⁺), HRMS za C₁₄H₁₉N₄O₃: izračunan 291.1457, izmerjen 291.1452.

Metil-3-((4-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-3-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)fenil)amino)-3-oksopropanoat (17)

Spojino 16 (844 mg, 2.91 mmol) raztopimo v acetonitrilu (20 mL), dodamo kalijev karbonat (804 mg, 5.81 mmol) in med mešanjem na ledeni kopeli počasi dokapavamo raztopino metilmalonilklorida (342.5 μL , 3.19 mmol) v acetonitrilu (5 mL). Reakcijsko zmes mešamo na sobni T 12 ur. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etilacetatu (20 mL). Organsko fazo speremo z deionizirano vodo (2 \times 15 mL),

z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 15 mL) in nasičeno raztopino NaCl (15 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, prefiltriramo, da odstranimo NaSO₄ ter uparimo pod znižanim tlakom. Spojino **17** dodatno čistimo s kolonsko kromatografijo (EA/PE= 1/2 do 1/1). Izkoristek reakcije: 43 %; belorjavi kristali (550 mg); tališče: 143 °C; R_f (EA/PE = 1/1): 0.29; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.47 (s, 9H, C(CH₃)₃), 2.71 (s, 3H, CH₃), 3.49 (s, 2H, CH₂), 3.67 (s, 3H, OCH₃), 7.65-7.69 (dd, 1H, *J*₁ = 9.2 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz, Ar-H-5), 8.05-8.07 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar-H-6), 8.38-8.39 (d, 1H, *J* = 2.0 Hz, Ar-H-3), 9.26 (s, 1H, NH), 10.37 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.94 (CH₃), 27.92 (C(CH₃)₃), 43.36 (CH₂), 51.98 (OCH₃), 78.96 (C(CH₃)₃), 115.02, 119.66, 120.95, 122.61, 133.21, 134.01, 152.29, 163.98, 166.80, 168.04, 176.66; IR (ATR) ν = 3275, 3109, 2976, 2360, 2340, 1746, 1729, 1662, 1561, 1512, 1391, 1362, 1295, 1267, 1230, 1155, 1048, 1018, 766, 751 cm⁻¹; MS (ESI) m/z (%) = 389.1 ([M-H]⁻), HRMS za C₁₈H₂₁N₄O₆: izračunan 389.1461, izmerjen 389.1454.

Metil 3-((4-amino-3-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)fenil)amino)-3-oksopropanoat (18**)**

Spojino **15** (50 mg, 0.13 mmol) raztopimo v 1,4-dioksanu (4 mL), dodamo 4 M HCl v 1,4-dioksanu (320 μL, 1.28 mmol) ter mešamo na sobni T čez noč. Dodamo svežo 4 M HCl v 1,4-dioksanu (160 μL, 0.64 mmol) in mešamo na sobni T dodatnih 24 ur. Uparimo topilo pod znižanim tlakom, suh preostanek prelijemo z dietiletom (15 mL), stresamo na ultrazvoku, neraztopljeno spojino filtriramo pri znižanem tlaku in posušimo. Izkoristek reakcije: 84 %; sivi kristali (42 mg); tališče: 122-123 °C; R_f (DKM/MeOH/NH₃ = 20/1/0.01): 0.61; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.69 (s, 3H, CH₃), 3.48 (s, 2H, CH₂), 3.57 (s, 3H, OCH₃), 5.21 (s, 2H, NH₂), 7.07-7.09 (d, 1H, *J* = 8.0 Hz, Ar-H-5), 7.52-7.55 (dd 1H, *J*₁ = 8.8 Hz, *J*₂ = 2.4 Hz, Ar-H-6), 8.28-8.29 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, Ar-H-2), 10.34 (s, 1H, NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.85 (CH₃), 43.24 (CH₂), 51.93 (OCH₃), 110.66, 118.59, 120.04, 123.79, 130.70, 139.14, 163.60, 167.05, 168.20, 176.04; IR (ATR) ν = 3531, 3469, 3226, 3051, 2847, 2580, 1727, 1717, 1582, 1553, 1508, 1362, 1346, 1264, 1131, 833, 717 cm⁻¹; MS (ESI) m/z (%) = 291.1 ([M-H]⁺), HRMS za C₁₃H₁₅N₄O₄: izračunan 291.1093, izmerjen 291.1092.

Metil-3-((4-(4,5-dibromo-1*H*-pirole-2-karboksamido)-3-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)fenil)amino)-3-okopropanoat (19)

4,5-Dibromopirrol-2-karboksilno kislino (1, 297 mg, 1.01 mmol) raztopimo v diklorometanu (7 mL), dodamo 2 M oksalilklorid v diklorometanu (1.66 mL, 1.66 mmol) in mešamo čez noč pod argonovo atmosfero. Odparimo topilo, preostanku dodamo svež diklorometan (5 mL), piridin (2.5 mL) in spojino 19 (161 mg, 0.55 mmol) ter mešamo 6 ur na sobni T. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etilacetatu (15 mL). Organsko fazo speremo z 1M HCl (2 × 10 mL), z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (10 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, prefiltriramo, da odstranimo NaSO₄ ter uparimo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije: 38 %; svetlorjavi kristali (176 mg); tališče: 225-227 °C; R_f (EA/PE = 2/1): 0.21; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.72 (s, 3H, CH₃), 3.51 (s, 2H, CH₂), 3.68 (s, 3H, OCH₃), 7.03 (s, 1H, pirol-CH), 7.71-7.74 (dd 1H, *J*₁ = 9.0 Hz, *J*₂ = 2.6 Hz, Ar-H-6), 8.16-8.19 (d, 1H, *J* = 8.8 Hz, Ar-H-5), 8.43-8.44 (d, 1H, *J* = 2.4 Hz, Ar-H-2), 10.28 (s, 1H, NH), 10.46 (s, 1H, NH), 13.07 (s, 1H, pirol-NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 11.96 (CH₃), 43.41 (CH₂), 52.01 (OCH₃), 98.44, 106.52, 113.29, 117.17, 119.60, 122.33, 123.60, 127.95, 132.25, 135.23, 157.02, 164.13, 166.73, 168.03, 176.83; IR (ATR) ν = 3231, 3116, 2955, 2360, 1725, 1671, 1608, 1584, 1524, 1390, 1350, 1324, 1303, 1252, 1217, 1168, 808, 751, 636 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* (%) = 537.9 ([M-H]⁻), HRMS za C₁₈H₁₄N₅O₅Br₂: izračunan 537.9362, izmerjen 537.9370; HPLC: retencijski čas: 12.046 min (95.4 % pri 280 nm).

3-((4-(4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)fenil)amino)-3-oksopropanojska kislina (20)

Spojino 19 (51 mg, 0.096 mmol) raztopimo v tetrahidrofuranu (6 mL), dodamo 2 M raztopino NaOH (145 μL, 0.29 mmol) in vodo (2 mL) ter mešamo čez noč na sobni T. Reakcijsko zmes nevtraliziramo z 1 M HCl in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etilacetatu (10 mL). Organsko fazo speremo z 1M HCl (2 × 7 mL), z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 7 mL) in nasičeno raztopino NaCl (7 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, prefiltriramo, da odstranimo NaSO₄ ter uparimo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije: 63 %; sivi kristali (32 mg); tališče: 243-246 °C; R_f (DKM/MeOH/AcOH = 10/1/0.01): 0.18; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 2.72 (s, 3H, CH₃), 3.38 (s, 2H, CH₂), 7.03 (s, 1H, pirol-CH), 7.71-7.75 (dd

^1H , $J_1 = 9.0$ Hz, $J_2 = 2.6$ Hz, Ar-H-5), 8.16-8.18 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, Ar-H-6), 8.43-8.44 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, Ar-H-2), 10.27 (s, 1H, NH), 10.40 (s, 1H, NH), 12.66 (s, 1H, OH), 13.06 (s, 1H, pirol-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 12.46 (CH₃), 44.43 (CH₂), 98.94, 107.00, 113.78, 117.74, 120.07, 122.78, 124.15, 128.45 132.62, 135.90, 157.53, 165.19, 167.25, 169.68, 177.30; IR (ATR) $\nu = 3269, 3114, 3070, 2961, 2926, 2617, 2520, 1709, 1588, 1526, 1393, 1319, 1252, 1082, 1017, 798, 760$ cm⁻¹; MS (ESI) m/z (%) = 518.7 ([M-H]⁻); HPLC: retencijski čas: 10.231 min (79.0 % pri 280 nm).

4,5-Dibromo-*N*-(4-(3-hidrazinil-3-oksopropanamido)-2-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)fenil)-1*H*-pirol-2-karboksamid (21)

Spojino **19** (110 mg, 0.21 mmol) raztopimo v zmesi absolutnega etanola (5 mL) in tetrahidrofurana (4 mL) ter dodamo hidrazin monohidrat (105 μL , 2.08 mmol). Reakcijsko zmes segrevamo čez noč pri 80 °C, ohladimo na ledeni kopeli, izpadlo oborino odfiltriramo pri znižanem tlaku, speremo z etanolom (3 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije 35 %; svetlorjavi kristali (75 mg); tališče: 251-253 °C; R_f (DKM/MeOH = 20/1): 0.17; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.72 (s, 3H, CH₃), 3.21 (s, 2H, CH₂), 4.31 (s, 2H, NH₂), 7.02 (s, 1H, pirol-CH), 7.73-7.76 (dd 1H, $J_1 = 8.8$ Hz, $J_2 = 2.4$ Hz, Ar-H), 8.16-8.18 (m, 1H, Ar-H), 8.41-8.42 (d, 1H, $J = 2.8$ Hz, Ar-H), 9.21 (s, 1H, NH), 10.27 (s, 1H, NH), 10.34 (s, 1H, NH), 13.06 (s, 1H, pirol-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 11.96 (CH₃), 42.95 (CH₂), 98.42, 106.49, 113.27, 117.14, 119.62, 122.32, 123.56, 127.98, 132.07, 135.41, 157.02 (CO), 165.57, 165.79, 166.76, 176.73; IR (ATR) $\nu = 3294, 3118, 2932, 2851, 2795, 2687, 1649, 1580, 1511, 1407, 1390, 1326, 1237, 762, 683$ cm⁻¹; MS (ESI) m/z (%) = 537.9 ([M-H]⁻), HRMS za C₁₇H₁₄N₇O₄Br₂: izračunan 537.9474, izmerjen 537.9489; HPLC: retencijski čas: 7.626 min (95.6% pri 254 nm, 93.8% pri 280 nm).

4,5-Dibromo-*N*-(2-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)-4-(2-(5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-il)acetamido)fenil)-1*H*-pirol-2-karboksamid (22)

Spojino **21** (48 mg, 0.09 mmol) raztopimo v 1,4-dioksanu (6 mL), dodamo 1,1-karbonildiimidazol (21.5 mg, 0.13 mmol) in čez noč segrevamo na 100 °C. Naslednji dan dodamo dimetilformamid (3 mL) in 1,1-karbonildiimidazol (21.5 mg, 0.13 mmol) ter pustimo mešati nadaljnjih 24 ur. Odparimo topilo in preostanek čistimo z gradientno kolonsko kromatografijo (DKM/MeOH = 20/1 do 10/1). Suh preostanek prelijemo z

dietiletom (7 mL), stresamo na ultrazvoku, neraztopljeno spojino odfiltriramo pri znižanem tlaku in posušimo. Izkoristek reakcije: 45 %; svetlorjavi kristali (31 mg); tališče: 172-173 °C; R_f (DKM/MeOH = 10/1): 0.36; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2.74 (s, 3H, CH₃), 3.82 (s, 2H, CH₂), 7.03 (s, 1H, pirol-CH), 7.72-7.75 (dd, 1H, $J_1 = 9.0$ Hz, $J_2 = 2.6$ Hz, Ar-H), 8.18-8.21 (d, 1H, $J = 9.2$ Hz, Ar-H), 8.43-8.44 (d, 1H, $J = 2.4$ Hz, Ar-H), 10.29 (s, 1H, NH), 10.60 (s, 1H, NH), 12.31 (s, 1H, NH), 13.06 (s, 1H, pirol-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 11.95 (CH₃), 34.73 (CH₂), 98.44, 106.57, 113.32, 117.15, 119.77, 122.41, 123.58, 127.94, 132.41, 134.99, 152.32, 154.96, 157.03, 164.10, 166.71, 176.81; IR (ATR) $\nu = 3231, 1659, 1574, 1523, 1391, 1327, 1223, 1184, 742, 639$ cm⁻¹; MS (ESI) m/z (%) = 563.9 ([M-H]⁻), HRMS za C₁₈H₁₂N₇O₅Br₂: izračunan 563.9267, izmerjen 563.9280; HPLC: retencijski čas: 10.513 min (95.9% pri 280 nm).

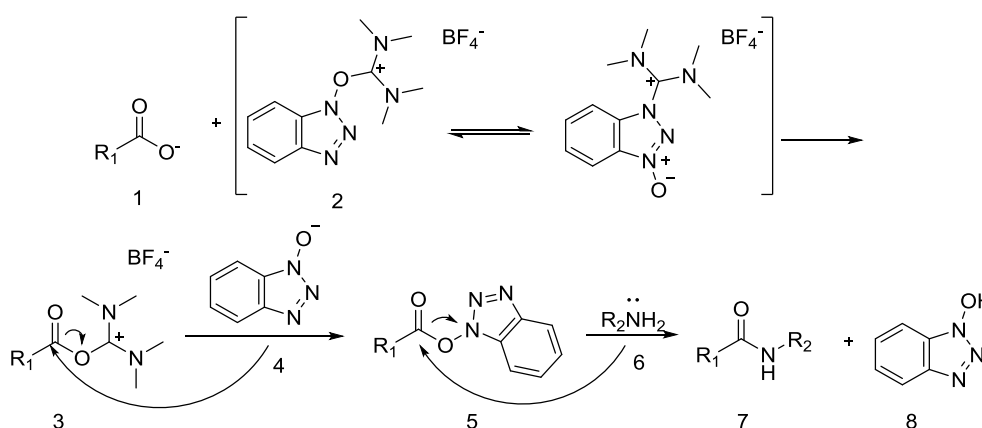
5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. Komentar nekaterih sinteznih postopkov

5.1.1. Sinteza amidne vezi z reagentom TBTU

Sintezo amidne vezi v spojini **3**, smo izvedli z dodatkom sklopitvenega reagenta 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijevega tetrafluoroborata (TBTU) (**2**), saj pri navadnih razmerah karboksilne kisline (**1**) niso dovolj reaktivne. Ker je OH skupina slabo iztopajoča skupina, smo 4,5-dibromopirrol-2-karboksilno kislino v prvi stopnji aktivirali z reagentom TBTU. Zaradi hitrega poteka reakcije (nekaj minut) smo lahko v zmes aktivirane karboksilne kisline in TBTU takoj dodali amin.

Karboksilna skupina 4,5-dibromopirrol-2-karboksilne kisline, ki je zaradi prisotnosti baze *N*-metilmorfolina v ionizirani obliki (COO⁻), v prvi stopnji nukleofilno napade elektrofilni del molekule TBTU, pri čemer se tvori aktiviran ester (**3**). V naslednji stopnji poteče preestrenje z benzotriazol-1-olatnim ionom (**4**), kjer kot stranski produkt izstopi tetrametilsečnina. V zadnji stopnji poteče nukleofilna substitucija tipa S_N2 med karbonilno skupino aktiviranega intermedata (**5**) in primarno aminsko skupino vstopajočega amina (**6**), kjer najprej poteče pripenjanje amina na karbonilni ogljikov atom, ki mu sledi odcepitev 1-hidroksibenzotriazolnega dela (**8**). Shematski potek reakcije je prikazan na sliki 17. (25, 26, 27)

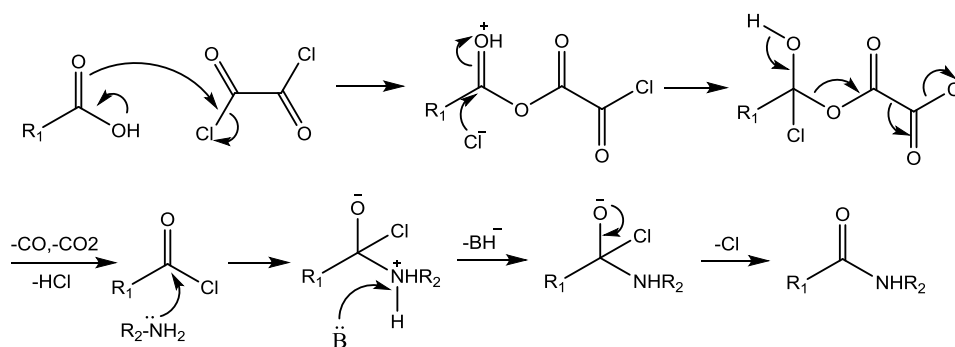


Slika 17: Mehanizem reakcije nastanka amidne vezi s sklopitvenim reagentom TBTU (prirejeno po 27).

5.1.2. Sinteza amidne vezi preko tvorbe kislinskega klorida

Pri spojinah **10a-b** in **19** nismo uspeli sintetizirati amidne vezi s pomočjo sklopitvenega reagenta TBTU, zato smo 4,5-dibromo-pirrol-2-karboksilno kislino predhodno pretvorili v

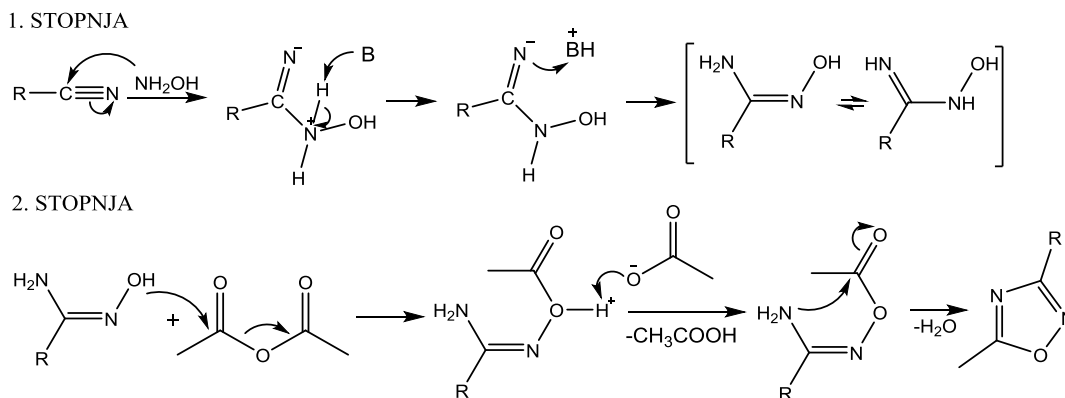
kislinski klorid. Pretvorbo smo opravili s pomočjo oksalilklorida, ki je povečal elektrofilnost karbonylne skupine, poleg tega pa je halogen (klor) dobra iztopajoča skupina. Zaradi sproščanja klorovodikove kisline smo v reakcijsko zmes kot bazo dodali piridin, ki je obenem, skupaj z diklorometanom, služil tudi kot topilo. Reakcija nastanka amidne vezi je potekla preko tetraedrnega intermedata po mehanizmu S_N2 nukleofilne substitucije. Mehanizem reakcije je prikazan na sliki 18. (25, 26)



Slika 18: Tvorba kislinskega klorida z oksalilkloridom in sinteza amidne vezi po S_N2 mehanizmu nukleofilne substitucije (prirejeno po 26,28).

5.1.3. Tvorba 5-metil-1,2,4-oksadiazolnega obroča

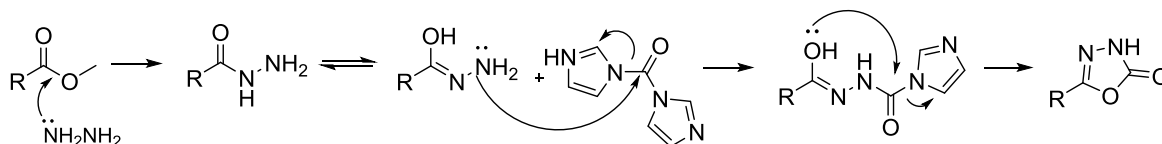
Pri sintezi 5-metil-1,2,4-oksadiazolnega obroča (spojini **14** in **15**) smo v prvi stopnji izhajali iz ciano skupine, ki smo ji po mehanizmu elektrofilne adicije pripeli hidroksilamin v prisotnosti trietilamina kot baze. Kot produkt smo dobili amidin-amidin tautomer. V drugi stopnji smo izvedli reakcijo z acetanhidridom, kjer se je acilirala OH skupina, kot stranski produkt pa je iztopila očetna kislina. Sledila je nukleofilna adicija amino skupine na karbonylni ogljik s posledično ciklizacijo in eliminacijo vode. Podrobnejši mehanizem reakcije je prikazan na sliki 19. (25, 26, 29)



Slika 19: Mehanizem tvorbe 5-metil-1,2,4-oksadiazola iz ciano skupine.

5.1.4. Priprava 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolnega obroča

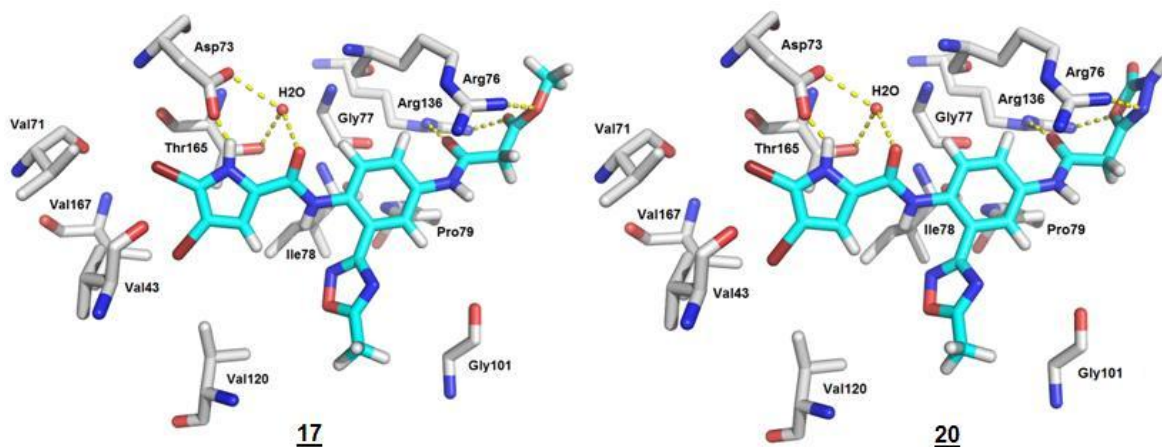
Sintezo 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolnega obroča smo pričeli z metilnim estrom karboksilne kisline, ki smo ga preko nukleofilne substitucije s hidrazinom pretvorili v hidrazid. V drugi stopnji smo pripravljenemu hidrazidu dodali 1,1'-karbonildiimidazol (CDI), pri čemer je prišlo do nukleofilnega napada hidrazinske NH₂ skupine na karbonilno skupino 1,1'-karbonildiimidazola, kot stranski produkt pa je nastal imidazol. Laktam-laktim tautomerija in nastanek nukleofilne OH skupine je privedla do novega nukleofilnega napada, kjer je laktimska OH skupina napadla karbonilno skupino preostalega dela molekule 1,1'-karbonildiimidazola. Pri tem je prišlo do ciklizacije in izstopa imidazolnega dela. Mehanizem reakcije prikazuje slika 20. (25, 26, 30)



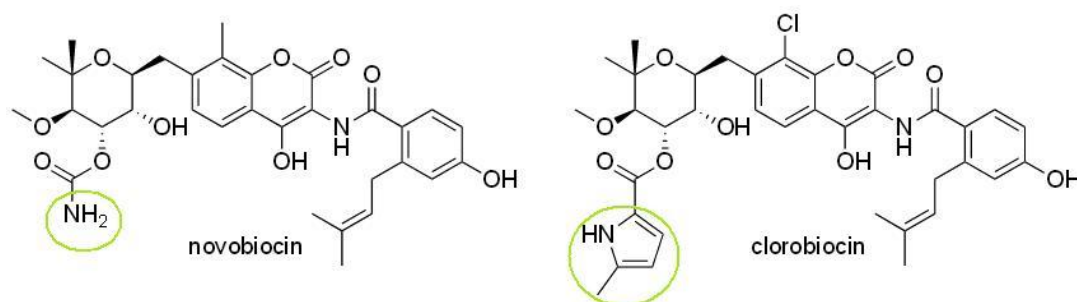
Slika 20: Potek priprave 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolnega obroča.

5.2. Načrtovanje zaviralcev DNA-giraze B

Z analiziranjem kristalnih struktur kompleksov poznanih zaviralcev DNA giraze B v aktivnem mestu encima (10, 14, 16, 21) smo ugotovili, da je za zaviralno aktivnost pomemben fragment z zaporedno vezanima donorjem in akceptorjem vodikove vezi, ki je sposoben tvoriti interakcije z Asp73 ter s kristalno molekulo vode v vezavnem mestu encima (slika 21). Ta vzorec opazimo tudi pri adeninskem delu ATP, ki je naravni substrat GyrB. Znano je, da je vezavna afiniteta naravnega antibiotika klorobiocina (IC₅₀ [klorobiocin] = 1.2 nM) večja od vezavne afinitete novobiocina (IC₅₀ [novobiocin] = 2.8 nM), kar lahko pripisujemo zamenjavi primarne aminske skupine, ki je prisotna v primeru novobiocina, z 2-aminopirrolnim heterociklom, ki je prisoten v primeru klorobiocina (slika 13, stran 14) in, ki lahko tvori dodatne hidrofobne interakcije z aminokislinskimi ostanki Val43, Ala47, Val71, Val167 v adeninskem vezavnem žepu. To dejstvo bomo upoštevali tudi pri načrtovanju naše serije zaviralcev GyrB, tako da bomo na ta del molekule vgradili večji 4,5-dibromopirrolni obroč. Potencialno neselektivnosti, torej delovanje spojin tudi na druge tarče z vezavnim mestom za ATP, bomo poskušali preprečiti z izkoriščanjem interakcij z aminokislinskimi ostanki, ki ležijo v bližini vezavnega mesta za ATP, kot je npr. Arg136 z usmerjenostjo proti zunanemu delu encima.



Slika 21: Najbolje ocenjeni konformaciji spoji 19 in 22 (v sinje modrem) v aktivnem mestu GyrB iz *E. coli* (PDB koda: 4DUH) napovedani z molekulskim sidranjem s programom GOLD. (20) Spojini 19 in 22 ter izbrani aminokislinski ostanki v aktivnem mestu so prikazani v različnih barvah: $C_{17/20}$ v sinje modrem, C_{GyrB} v sivem, Br v rjavem, O v rdečem in N v modrem. Kristalna voda je prikazana kot rdeča kroglica. Napovedane vodikove vezi med aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu, kristalno vodo in spojinama 19 oz. 22, so prikazane kot rumene prekinjene črte. Za pripravo slike smo uporabili program PyMOL. (22)



Slika 22: Strukturi novobiocina in klorobiocina, s prikazom strukturne razlike, zaradi katere v primeru molekule klorobiocina lahko pride do tvorbe dodatnih hidrofobnih interakcij z aminokislinskimi ostanki v aktivnem mestu encima GyrB (prirejeno po 10).

V okviru magistrske naloge bomo sintetizirali več serij spojin, ki bodo vsebovale 4,5-dibromo-*N*-fenil-1*H*-pirol-2-karboxamidni del, razlikovale pa se bodo po substituentih na fenilnem obroču. Razdelili jih bomo v tri strukturne razrede, (A) spojine s 3-aminoanilinskim centralnim delom, (B) spojine s 3-aminobenzoilnim fragmentom in (C) spojine z 2-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzen-1,4-diaminskim centralnim delom (slika 13, stran 14).

S pirolamidnim fragmentom bomo skušali posnemati vezavo adenina v vezavnem mestu, saj pirolamid tako kot adenin, vsebuje zaporedno vezana donor (amino skupina) in akceptor (karbonilna skupina) vodikove vezi, ki sta bistven strukturni del zaviralcev GyrB. Z dvema bromovima atomoma na pirolnem obroču želimo v vezavnem žepu za adenin tvoriti dodatne hidrofobne vezi, s substitucijo pirolnega obroča z elektron akceptorsko skupino pa bomo poleg tega povečali kislost pirolne aminske skupine in s tem zvečali jakost vodikove vezi z Asp73. Pirolamidnemu delu bo sledil fenilni obroč, ki ni tako pomemben z vidika interakcij, ampak bo služil predvsem kot ogrodje za pripenjanje funkcionalnih skupin z ustrezno prostorsko razporeditvijo. Na *para ali meta* mesto fenilnega obroča glede na pirolamidni del bomo uvedli skupine, ki bodo lahko interagirale z Arg76 ali Arg136. Preverili bomo še, ali je uvedba dodatnega lipofilnega substituenta na *orto* mesto fenilnega obroča ugodna za doseganje večje jakosti delovanja. Predpostavljamo, da je za tvorbo ionske vezi z Arg136 pomembna kislja funkcionalna skupina, kot je npr. karboksilna skupina. Spojine bomo preverili tako, da jih bomo biološko ovrednotili ter primerjali aktivnosti spojin s prostimi karboksilnimi skupinami, njihovimi metilnimi estri in spojine z mimetiki karboksilne kisline, kot sta hidrazid in 1,3,4-okadiazolonski obroč. Vezavo načrtovanih spojin v aktivno mesto DNA giraze bomo ocenili s programom GOLD. Na sliki 20 je prikazana vezava spojin **19** in **22** v aktivno mesto GyrB iz bakterije *E. coli*. Rumene prekinjene črte prikazujejo predpostavljene interakcije, ki so ključne za inhibitorno aktivnost.

5.3. Rezultati bioloških testov

5.3.1. Encimski testi

Na encimu DNA-giraza iz bakterije *E. coli* je bilo testiranih vseh deset končnih spojin. Slabše aktivnim spojinam smo ugotovili le rezidualno aktivnost (RA), to je razmerje med aktivnostjo encima ob dodatku zaviralca in aktivnostjo v njegovi odsotnosti, aktivnejšim spojinam pa tudi vrednosti IC₅₀, torej koncentracijo zaviralca, ki zmanjša aktivnost encima za 50 %. Najaktivnejše končne spojine smo ovrednotili tudi na DNA-girazo iz bakterije *S. aureus* ter na encima topoizomeraza IV iz bakterij *E. coli* in *S. aureus*. Rezultati encimskih testov so prikazani v preglednici I.

Rezultati iz preglednice I v večini primerov kažejo, da so spojine s prosto karboksilno skupino aktivnejše od njihovih analogov z metilno estersko skupino, saj prosta karboksilna skupina lahko tvori ionsko interakcijo z Arg136. Izjema sta le spojini **10a** in **10b**, kjer sta

spojini z metilno estersko skupino bolj aktivni (**10a**, $IC_{50} = 2,85 \mu M$, **10b**, $IC_{50} = 13,5 \mu M$), kot spojini s prosto karboksilno skupino (**11a**, $IC_{50} = 7,00 \mu M$, **11b**, $IC_{50} = 13,8 \mu M$). Po pričakovanju je spojina **21** ($IC_{50} = 0,141 \mu M$), kjer smo karboksilno skupino nadomestili s hidrazidom manj aktivna od izhodne spojine **20** ($IC_{50} = 0,0858 \mu M$), saj hidrazidna skupina ni sposobna tvoriti ionske vezi. Tudi bioizosterna zamenjava proste karboksilne kisline s 5-okso-1,3,4-oksadiazolnim obročem je povzročila rahlo zmanjšanje aktivnosti spojine **22** ($IC_{50} = 0,0366 \mu M$) v primerjavi s spojino **20**. Kljub temu pa, zaradi manjše kislosti 5-okso-1,3,4-oksadiazolnega fragmenta od -COOH skupine pričakujemo, da bo spojina **22** bolje prehajala bakterijsko celično steno od spojine **20** s prosto karboksilno skupino in bo zato imela večjo protibakterijsko aktivnost. Spojina **5** (RA = 65 %) z malonilnim substituentom na 3-NH₂ skupini fenilnega obroča ni izkazovala dobre zaviralne aktivnosti na DNA-girazo. Aktivnost se je povečala pri derivatih **10** in **11**, kjer smo na desni del molekule uvedli L- ali D-prolin (IC_{50} [**10a**] = $2,85 \mu M$, IC_{50} [**10b**] = $13,5 \mu M$, IC_{50} [**11a**] = $7,00 \mu M$, IC_{50} [**11b**] = $13,8 \mu M$). Razlog za povečanje aktivnosti je lahko rigidifikacija molekule in bolj optimalna usmeritev -COOH skupine za interakcijo z Arg136. Rezultati encimskih testov za serijo spojin z dodatnim 5-metil-1,2,4-oksadiazolnim obročem na *orto* mestu fenilnega obroča glede na pirolamidno skupino (spojine **19-22**) kažejo na veliko povečanje zaviralne aktivnosti na encimu DNA-giraza, kar je najverjetneje posledica dodatnih hidrofobnih interakcij v adenozinskem žepu. Najaktivnejša je spojina s prosto karboksilno kislino (**20**, $IC_{50} = 0,0154 \mu M$), sledi ji spojina **22** s 5-okso-1,3,4-oksadiazolnim fragmentom ($IC_{50} = 0,0366 \mu M$), spojini z metilnim estrom (**19**, $IC_{50} = 0,0858 \mu M$) in hidrazidom (**21**, $IC_{50} = 0,141 \mu M$) pa sta nekoliko manj aktivni. Povzamemo lahko, da je kombinacija kisle funkcionalne skupine na mestu *para* fenilnega obroča glede na pirolamidni substituent in substitucija mesta *orto* fenilnega obroča glede na pirolamidni substituent ključna za povečanje zaviralne aktivnosti na DNA-girazo B iz bakterije *E. coli*.

Zaviralne aktivnosti testiranih spojin (**19-22**) na DNA-girazo iz *S. aureus* in topoizomerozo IV iz *E. coli* ter *S. aureus* so bile opazno nižje (preglednica I), kar lahko pojasnimo s primerjavo prostorske strukture adenozinskih žepov obeh encimov v *E. coli* in *S. aureus*. Predpostavljamo, da je prileganje spojin v vezavno mesto GyrB iz *S. aureus* manj optimalno zaradi zamenjave nekaterih aminokislinskih ostankov z večjimi, na primer metionina z levcinom, dveh valinov pa z izolevcinom, zaradi česar je aktivno mesto GyrB

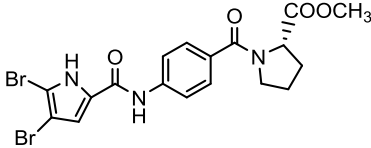
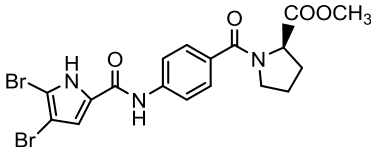
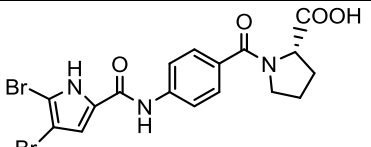
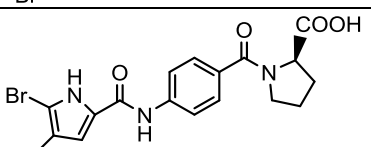
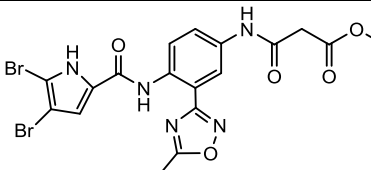
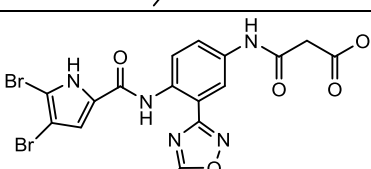
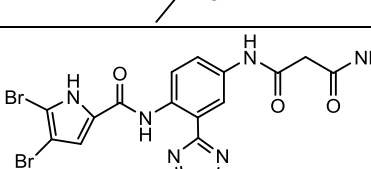
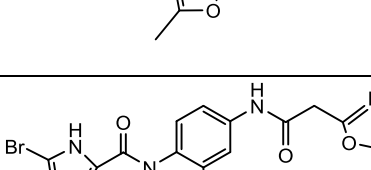
iz *S. aureus* manjše. Predvidevamo, da je 4,5-dibromopirolni fragment prevelik, da bi se optimalno prilegal v vezavno mesto GyrB iz *S. aureus*, in da bi bilo za povečanje zaviralne aktivnosti na ta encim na mesto 4,5-dibromopirola smiselno uvesti sterično manjše skupine. Najboljšo zaviralno aktivnost na vseh testiranih encimih je pokazala spojina **20** (IC_{50} (*S. aureus*, GyrB) = 1,38 μ M, IC_{50} (*E.coli*, topo IV) = 10 μ M IC_{50} (*S. aureus*, topo IV) = 5 μ M).

5.3.2. Protibakterijska aktivnost

Protibakterijska aktivnost so ugotavljali na Univerzi v Helsinkih na Finskem na dveh po Gramu pozitivnih bakterijskih sevih (*Enterococcus faecalis*, ATCC 29212 in *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923). Rezultati so podani v preglednici II kot odstotek zaviranja bakterijske rasti pri 50 μ M koncentraciji zaviralca po 24 h izpostavitvi. Kot pozitivno kontrolo smo uporabili ciprofloksacin.

Testirane spojine **10a-b**, **11a-b**, **19-22** niso pokazale učinkovitega protibakterijskega delovanja, saj je bila najvišja izmerjena vrednost 19-odstotno zaviranje rasti bakterije *E. faecalis* pri spojini **22**. Predpostavljamo, da je vzrok za šibkejšo protibakterijsko aktivnost prevelika polarnost spojin, zaradi česar je otežen njihov prehod skozi bakterijsko celično steno in tako spojine ne uspejo v polni meri priti do mesta delovanja. Za izboljšanje učinkovitosti spojin, bi bilo potrebno optimizirati njihove fizikalno-kemijskih lastnosti, predvsem iz vidika povečanja njihove sposobnosti za prehod celične stene. Ena izmed možnosti za izboljšanje permeabilnostnih lastnosti je zamenjava preveč kislih funkcionalnih skupin, kot je npr. prosta karboksilna skupina, z njenimi manj polarnimi mimetiki, npr. z hidrazidom ali z 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolom, ki kažejo boljšo protibakterijsko aktivnost, oziroma z drugimi heterocikli.

Preglednica II: Rezultati protibakterijskih testov na *E. faecalis* in *S. aureus* za najbolj obetavne zaviralce DNA-giraze B.

| SPOJINA | STRUKTURNA FORMULA | Zaviranje rasti bakterij po 24 h pri 50 μ M koncentraciji (%) | |
|------------|---|---|------------------|
| | | <i>E. faecalis</i> | <i>S. aureus</i> |
| 10a |  | -12 % | 0 % |
| 10b |  | -4 % | -13 % |
| 11a |  | 14 % | 1 % |
| 11b |  | 10 % | 5 % |
| 19 |  | -18 % | -60 % |
| 20 |  | 9 % | -18 % |
| 21 |  | 17 % | -6 % |
| 22 |  | 19 % | -49 % |

6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo pripravili in ovrednotili 10 potencialnih zaviralcev bakterijske DNA-giraze B, ki so vsebovale skupen 4,5-dibromo-*N*-fenil-1*H*-pirol-2-karboksamidni del. Sintetizirane končne spojine smo biološko ovrednotili z encimskimi testi na DNA-girazo in topoizomerazo IV iz bakterij *E. coli* in *S. aureus* ter protibakterijskimi testi na dveh po Gramu pozitivnih bakterijah, *E. faecalis* in *S. aureus*. Potrdili smo našo hipotezo, da so spojine, ki vsebujejo prosto karboksilno skupino aktivnejše na encim GyrB in topo IV od analogov z metilnimi estri, encimska aktivnost pa se je močno zvišala tudi ob substituciji *orto* mesta fenilnega obroča glede na pirolamidno skupino z aromatskim heterociklom. Spojine **19**, **20**, **21** in **22** so imele IC₅₀ vrednosti na encimu DNA-giraza B iz *E. coli* nižje od 0,14 μM, najaktivnejša spojina **20** pa le 15,4 nM, kar jo uvršča med najboljše poznane zaviralce GyrB. Slabšo encimsko aktivnost so spojine izkazovale na encimu topoizomeraza IV iz bakterij *E. coli* in *S. aureus* ter DNA-girazi B iz bakterije *S. aureus*. Do razlike v aktivnosti najverjetneje pride zaradi strukturnih razlik med vezavnimi mesti na encimih v obeh vrstah bakterij. Dobro zaviranje aktivnosti DNA-giraze B iz *S. aureus* in topoizomeraze IV iz *E. coli* in *S. aureus* je pokazala le spojina **20** (IC₅₀ [*S. aureus*, giraza] = 1,38 μM, IC₅₀ [*E. coli*, topo IV] = 10 μM, IC₅₀ [*S. aureus*, topo IV] = 5 μM). Nobena izmed testiranih spojin ni izkazovala obetavnejšega protibakterijskega delovanja, saj je le spojina **22** dosegla 19-odstotno zaviranje rasti seva *E. faecalis*, kar lahko pripisujemo manjši polarnosti te spojine in posledično nekoliko lažjemu prehajanju spojine skozi bakterijsko celično steno.

Pridobljeni rezultati predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnji razvoj novih zaviralcev bakterijske DNA-giraze B, saj so encimski testi pokazali spodbudne aktivnosti, ki odpirajo nove možnosti za optimizacijo. Spojine bi lahko v nadaljnji stopnji še izboljšali s strukturno podprtim načrtovanjem ter iskanjem novih, za vezavo še bolj optimalnih substituentov na *orto* mestu fenilnega obroča ali z iskanjem heterocikličnih mimetikov karboksilne skupine, s katerimi bi dosegli izboljšanje fizikalno-kemijskih lastnosti ter boljše prehajanje spojin skozi bakterijsko celično steno do tarčnega mesta.

7. LITERATURA

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G: Rang and Dale's Pharmacology 7thed, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 2012: 609-637.
2. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry 5th ed, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2002: 37-62, 100-112, 819-830.
3. Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, 2002: 4-5, 33-47, 427-446, 509-512.
4. http://www.nature.com/nrmicro/journal/v4/n1/fig_tab/nrmicro1325_F2.html
(dostopano 28.4.2015)
5. <https://adailydeed.files.wordpress.com/2015/03/antibioticmechanisms-flat.jpg>
(dostopano 1.5.2015)
6. Trzoss M, Bensen DC, Li X, Chen Z, Lam T, Zgang J, Creighton CJ, Cunningham ML, Kwan B, Stidham M, Nelson K, Brown-Driver V, Castellano A, Shaw KJ, Lightstone FC, Wong S, Nguyen TB, Finn J, Tari LW: Pyrrolopyrimidine inhibitors of DNA gyrase B (GyrB) and topoisomerase IV (ParE), Part II: Development of inhibitors with broad spectrum, Gram-negative antibacterial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2013; 23 (5): 1537-1543.
7. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 244-257, 277-282.
8. http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/large_fig/c_fig06_04.html (dostopano 2.5.2015)
9. <http://academic.pgcc.edu/~kroberts/Lecture/Chapter%207/replication.html>
(dostopano 2.5.2015)
10. Tomašić T, Peterlin-Mašič L: Prospects for developing new antibacterial targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2014; 14 (1): 130-151.

11. Nelson David L., Cox Michael M.: *Leninger principles of biochemistry* 5thed, W.H. Freeman and company, New York, 2008: 954-962.
12. <http://www.biochem.arizona.edu/classes/bioc461/GRAPHICS/Chapter27/Slide28.JPG> (dostopano 3.5.2015)
13. http://www.lookfordiagnosis.com/mesh_info.php?term=Dna+Topoisomerase+Iv&lang=4 (dostopano 3.5.2015)
14. Sherer B, Hull K, Green O, Basarab G, Hauck S, Hill P, Loch III JT, Mullen G, Bist S, Bryant J, Boriack-Sjordin A, Read J, DeGrace N, Uria-Nickelsen M, Illingworth RN, Eakin AE: Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: Optimization of antibacterial activity and efficacy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2011; 21 (24): 7416-7420.
15. Patrick Chene. ATPases as drug targets: learning from their structure. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2002, 1: 665-673.
16. Oblak M, Kotnik M, Solmajer T: Discovery and development of ATPase inhibitors of DNA gyrase as antibacterial agents. *Current Medicinal Chemistry* 2007; 14 (19): 2033-2047.
17. Škedelj V, Tomašič T, Peterlin Mašič L, Zega A: ATP-binding site of bacterial enzymes as a target for antibacterial drug design. *Journal of Medicinal Chemistry* 2010; 54: 915-929.
18. Frederic Collin, Shantani Karkare, Anthony Maxwell. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011, 90: 479-497.
19. Basarab GS, Manchester JI, Bist S, Boriack-Sjordin AP, Dangel B, Illingworth R, Sherer BA, Sriram S, Uria-Nickelsen M, Eakin AE: Fragment-to-hit-to-lead discovery of a novel pyridylurea scaffold of ATP competitive dual targeting type II topoisomerase inhibiting antibacterial agents. *Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 56 (21): 8712-8735.

20. Brvar M, Perdih A, Renko M, Anderluh G, Turk D, Solmajer T: Structure-Based Discovery of substituted 4,5'-bithiazoles as novel DNA gyrase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012; 55 (14): 6413-6426.
21. Eakin AE, Green O, Hales N, Walkup GK, Bist S, Singh A, Mullen G, Byrant 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-Sjordin A, Hauck S, MacPherson LJ, Ni B, Sherer B: Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: fragment-based nuclear magnetic resonance screening to identify antibacterial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2012; 56 (3): 1240-1246.
22. PyMOL, Delano Scientific LLC, San Francisco, CA, <http://pymol.sourceforge.net>.
23. Zidar N, Macut H, Tonašič T, Brvar M, Montavao S, Tammela P, Solmajer T, Mašoč L, Ilaš J, Kikelj D: *N*-Phenyl-4,5-dibromopyrrolamides and *N*-phenylindolamides as ATP competitive DNA Gyrase B inhibitors: design, synthesis, and evaluation. Članek poslan v revijo *Journal of Medicinal Chemistry*.
24. Zidar N, Jakopin Ž, Madge DJ, Chan F, Tytgat J, Peigneur S, Sollner Dolenc M, Tomašič T, Ilaš J, Peterlin Mašič L, Kikelj D: Substituted 4-phenyl-2-aminoimidazoles and 4-phenyl-4,5-dihydro-2-aminoimidazoles as voltage-gated sodium channel modulators. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 74: 23-30.
25. Tišler M: *Organska kemija* 3. izdaja, DZS, Ljubljana, 1988: 128-131, 159-172.
26. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: *Farmacevtska kemija III. Vaje in seminarji*, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
27. Movassagh B, Balalaie S, Shaygan P: A new and efficient protocol for preparation of thiol esters from carboxylic acids and thiols in the presence of 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborate (TBTU). *ARKIVOC* 2007; 13: 47-52.
28. Ayman El-Faham, Fernando Albericio: Peptide coupling reagents, more than a letter soup, *Chemical Reviews* 2011, 111: 6557–6602

29. http://www.researchgate.net/profile/Andrea_Pace/publication/38012684_The_new_era_of_124-oxadiazoles/links/0f31752ef929c23f3b000000.pdf (dostopano 20.5.2015)
30. <http://140.123.79.90/~seekwei/thesis-reference/37-b-1-s2.0-S0040402005013876-main-Amide%20bond%20formation.pdf> (dostopano 19.5.15)