

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTINA DURCIK

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA NOVIH
N-FENILPIROLAMIDNIH ZAVIRALCEV DNA-GIRAZE B**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARTINA DURCIK

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA NOVIH
N-FENILPIROLAMIDNIH ZAVIRALCEV DNA-GIRAZE B**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL
N-PHENYLPYRROLAMIDES AS DNA GYRASE B
INHIBITORS**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Naceta Zidarja, mag. farm. Masnospektrometrične meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo in 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 trud, prijaznost, pomoč in veliko pridobljenega znanja pri nastajanju magistrske naloge. Hvala za vse spodbudne besede, podporo in zaupanje vame.

Zahvalila bi se tudi vsem ostalim sodelavcem Katedre za farmacevtsko kemijo za njihovo pomoč in nasvete.

Izjava

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

Martina Durcik

Ljubljana, 2017

Predsednica komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin

Mentor: doc. dr. Nace Zidar

Član komisije: izr. prof. dr. Robert Roškar

VSEBINA

VSEBINA.....	ii
POVZETEK	iv
ABSTRACT	v
SEZNAM OKRAJŠAV	vi
1. UVOD.....	1
1.1. PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE.....	1
1.2. PO GRAMU POZITIVNE IN PO GRAMU NEGATIVNE BAKTERIJE	2
1.3. BAKTERIJSKA ODPORNOST	3
1.3.1. Biokemijski mehanizmi odpornosti.....	4
1.4. MOLEKULA DNA KOT TARČA ZDRAVILNIH UČINKOVIN.....	4
1.4.1. Vloga in zgradba molekule DNA	4
1.4.2. Podvajanje DNA.....	5
1.4.3. Topoizomeraze	6
1.4.4. Bakterijske topoizomeraze tipa IIA	6
1.4.5. Struktura in delovanje DNA-giraze	7
1.4.6. ATP-vezavno mesto na DNA-girazi B.....	8
1.5. UČINKOVINE Z DELOVANJEM NA TOPOIZOMERAZE IIA.....	9
1.5.1. Zaviralci DNA-giraze A	9
1.5.2. Zaviralci DNA-giraze B	10
2. NAČRT DELA	14
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. REAGENTI IN TOPILA	17
3.2. MERJENJE TEMPERATURE TALISČA	17
3.3. KROMATOGRAFSKE METODE.....	17
3.4. SPEKTROSKOPSKE METODE.....	18

3.5.	POLARIMetriJA.....	18
3.6.	IUPAC NOMENKLATURA IN RIsANJE SPOJIN.....	18
3.7.	SIDRANJE SPOJIN V AKTIVNO MESTO DNA-GIRAZE B.....	19
3.8.	ENCIMSKI TESTI IN DOLOČANJE VREDNOSTI IC ₅₀	19
3.9.	DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI.....	20
4.	EKSPERIMENTALNI DEL	21
4.1.	REAKCIJSKE SCHEME	21
4.2.	SPLOŠNI SINTEZNI POSTOPKI IN ANALIZNI PODATKI.....	27
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	41
5.1.	KOMENTAR NEKATERIH SINTEZNIH POSTOPKOV	41
5.1.1.	Tvorba amidov in estrov z aktivirano kislino (N- in O-aciliranje).....	41
5.1.2.	Tvorba amidne vezi s sklopitvenim reagentom TBTU	42
5.1.3.	Zaščita amino skupine z di- <i>terc</i> -butil dikarbonatom.....	43
5.1.4.	Sinteza 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolnega obroča	44
5.1.5.	Intramolekularna Michaelova adicija	45
5.1.6.	Hidroliza spojine z 1,4-benzoksazin-3-onskim skeletom.....	45
5.2.	REZULTATI IN KOMENTAR BIOLOŠKIH TESTIRANJ.....	48
5.2.1.	Encimski testi	48
5.2.2.	Protibakterijska aktivnost	55
6.	SKLEP	60
7.	LITERATURA	62
8.	PRILOGE	66
	Priloga 1: Ostali sintezni postopki in analizni podatki	66

POVZETEK

Bakterijska odpornost na znane protimikrobne učinkovine postaja vedno večji problem, zato so na tem področju nujne vedno nove raziskave. Pri razvoju novih učinkovin proti patogenim bakterijam sta možna dva pristopa, in sicer iskanje novih potencialnih tarč ali pa razvoj učinkovin, ki delujejo na že poznane tarče po drugačnem mehanizmu.

Ena od že poznanih in perspektivnih protibakterijskih tarč je encim DNA-giraza, ki skupaj s topoizomerozo IV spada v skupino bakterijskih topoizomeraz tipa IIA. Encima sta si strukturno podobna, zato obstaja možnost razvoja zdravil, ki poleg DNA-giraze hkrati zavirajo tudi topoizomerozo IV. DNA-giraza katalizira nastanek dodatnih negativnih zavojev v molekuli DNA med podvajanjem. Sestavljena je iz dveh podenot imenovanih DNA-giraza A (GyrA) in dveh podenot imenovanih DNA-giraza B (GyrB), ki skupaj tvorijo heterotetramerni protein A_2B_2 . Funkcija DNA-giraze A je cepitev in ponovna združitev molekule DNA med podvajanjem, energijo za to reakcijo pa zagotavlja DNA-giraza B s hidrolizo dveh molekul ATP.

S preučevanjem znanih kristalnih struktur kompleksov GyrB z vezanimi zaviralci smo načrtovali in sintetizirali serijo 30 novih potencialnih ATP-kompetitivnih zaviralcev DNA-giraze B. Naše spojine smo razdelili v štiri razrede: (A) spojine s 4-aminobenzoilnim oz. 4-amino-2-hidroksibenzoilnim centralnim delom, (B) spojine s 4-amino-3-izopropoksibenzamidnim centralnim delom, (C) spojine s 4-amino-3-aminoetoksibenzamidnim centralnim delom in (D) spojine z 1,4-benzoksazin-3-onskim centralnim skeletom, vsem pa je skupen *N*-fenilpirolamidni del molekule. Spojine smo testirali na encimu DNA-giraza iz bakterije *Escherichia coli*, štiri izmed najobetavnejših spojin pa smo testirali še na DNA-girazo iz bakterije *Staphylococcus aureus* in na topoizomerozo IV iz *E. coli* in *S. aureus*. Spojinam smo določili protibakterijsko aktivnost na po Gramu pozitivnih bakterijah *Enterococcus faecalis* in *S. aureus* ter na po Gramu negativnih bakterijah *E. coli* in *Pseudomonas aeruginosa*. Najbolj aktivna spojina proti DNA-girazi je bila spojina **21d** s srednjo zaviralno koncentracijo (IC_{50}) 44 nM, pri dodatnih trinajstih spojinah pa je bila rezidualna aktivnost DNA-giraze v prisotnosti 10 μ M zaviralca nižja od deset odstotkov. Dosegli smo tudi zelo nizke minimalne zaviralne koncentracije (MIK_{90}) na protibakterijskem testiranju, kjer je bila najbolj aktivna spojina **23** z MIK_{90} vrednostjo 1,56 μ M proti bakteriji *E. faecalis* in 3,13 μ M proti bakteriji *S. aureus*.

Ključne besede: protibakterijska učinkovina, zaviralec, DNA-giraza B, *N*-fenilpirolamid

ABSTRACT

Bacterial resistance to known antibacterial drugs is a growing problem, therefore new research and development of new antibacterial agents is much needed. Nowadays, the antibacterial drug discovery is focused either on discovering inhibitors of new potential targets, or on discovering inhibitors of already known targets working through new mechanisms of action.

DNA gyrase is an established and validated target for the development of new antibacterials. Together with topoisomerase IV it belongs to bacterial type IIA topoisomerases. Due to structural similarities of the two enzymes, dual inhibition is possible. The function of DNA gyrase is to introduce negative supercoiles into the circular DNA molecule during the process of replication. The enzyme consists of two DNA gyrase A (GyrA) subunits and two DNA gyrase B (GyrB) subunits that form a heterotetrameric protein A₂B₂. The role of the GyrA subunit is breakage and reunion of the DNA molecule during replication, while the GyrB subunit provides energy for the reaction through hydrolysis of two ATP molecules.

Through studies of known co-crystal structures of GyrB with its inhibitors we designed and synthesized a series of 30 novel potential ATP competitive DNA gyrase B inhibitors. Our compounds can be divided into four groups: (A) compounds possessing a 4-aminobenzoyl or 4-amino-2-hydroxybenzoyl central core, (B) compounds with a 4-amino-3-isopropoxybenzamide central part, (C) compounds with a 4-amino-3-aminoethoxybenzamide central part, and (D) compounds with a 1,4-benzoxazin-3-one skeleton. All compounds share the *N*-phenylpyrrolamide fragment. All compounds were tested on DNA gyrase from *Escherichia coli* and four of the most potent ones also on DNA gyrase from *Staphylococcus aureus* and topoisomerase IV from *E. coli* and *S. aureus*. Antibacterial activities of compounds were assessed against Gram-positive *Enterococcus faecalis* and *S. aureus* and Gram-negative *E. coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The most active compound against DNA gyrase was **21d** with a half-maximal inhibitory concentration (IC₅₀) of 44 nM. For thirteen other compounds the residual activity of GyrB at 10 μM concentration was lower than ten percent. The best antibacterial activity was determined for compound **23**, with a minimum inhibitory concentration (MIC₉₀) of 1.56 μM against *E. faecalis* and 3.13 μM against *S. aureus*.

Key words: antibacterial drug, inhibitor, DNA gyrase B, *N*-phenylpyrrolamide

SEZNAM OKRAJŠAV

ADPNP	adenozin 5'-(β,γ -imido)trifosfat
Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	asparaginska kislina
ATP	adenozintrifosfat
ATR	oslabljen popolni odboj (<i>attenuated total reflectance</i>)
br s	širok singlet
CDCl ₃	devteriran kloroform
CDI	1,1'-karbonildiimidazol
CH ₂ Cl ₂	diklorometan
d	dublet
dd	dublet dubleta
DMF	<i>N',N'</i> -dimetilformamid
DMSO- <i>d</i> ₆	devteriran dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
ESKAPE	<i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Acinetobacter baumannii</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Enterobacter species</i>
EtOH	etanol
G-	po Gramu negativna bakterija
G+	po Gramu pozitivna bakterija
GHL	giraza, Hsp90, histidin kinaza, MutL
Glu	glutaminska kislina
Gly	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	hertz
IC ₅₀	srednja zaviralna koncentracija
Ile	izolevcin
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
<i>K_D</i>	konstanta disociacije
Leu	levcin
Lys	lizin
m	multiplet
M	molarnost (mol/L)
MBK	minimalna baktericidna koncentracija
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MIK	minimalna zaviralna koncentracija
MRSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	masna spektrometrija
MS – ESI	masna spektrometrija - »Electrospray« ionizacija
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ParC	podenota C topoizomeraze IV
ParE	podenota E topoizomeraze IV
Pd/C	zmes paladija v aktivnem ogljiku
Phe	fenilalanin
ppm	delci na milijon (10 ⁻⁶)
Pro	prolin
q	kvartet
quint	kvintet
RA	rezidualna aktivnost
Rf	retencijski faktor
s	singlet
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

SAR	odnos med strukturo in delovanjem
SZO	Svetovna zdravstvena organizacija
t	triplet
T	temperatura
TBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilamonijev tetrafluoroborat
TFA	trifluoroocetna kislina
THF	tetrahidrofuran
Thr	treonin
TLC	tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
Topo IV	topoizomeraza IV
Tyr	tirozin
Val	valin
VRE	proti vankomicinu odporen <i>Enterococcus faecium</i>
VRSA	proti vankomicinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
δ	kemijski premik

1. UVOD

Odkritje antibiotikov in uspešno zdravljenje infekcijskih bolezni sta bila ena večjih uspehov farmacevtske in medicinske stroke v zadnjem stoletju. Veliko prelomnico v boju proti patogenim mikroorganizmom predstavlja odkritje sulfonamidov leta 1935, saj so bili ti prva in do uporabe penicilina tudi edina skupina zdravil učinkovitih za zdravljenje sistemskih infekcij. Penicilin je protibakterijska učinkovina, ki jo proizvaja gliva rodu *Penicillium notatum*. Njegovo naključno odkritje s strani Alexandra Fleminga je za družbo predstavljalo velik napredek v boju proti bakterijskim infekcijam, saj se je penicilin izkazal za še učinkovitejšega od sulfonamidov. Nastopila je t.i. zlata doba odkrivanja antibiotikov, saj so penicilinu sledila odkritja aminoglikozidnih antibiotikov, tetraciklinov, makrolidov, cefalosporinov, nalidiksne kisline – kot prve učinkovine iz razreda kinolonov – in kasneje še ciprofloksacina, ki spada v drugo generacijo kinolonov. Po mnenju številnih takratnih znanstvenikov je bil s tem problem bakterijskih okužb odpravljen, a dandanes vidimo, da temu ni tako. Po podatkih Svetovne zdravstvene organizacije (SZO) so namreč v letu 2015 okužbe spodnjih dihal predstavljale tretji najpogostejši vzrok smrti: zaradi okužbe s tuberkulozo je npr. v letu 2015 umrlo 1,8 milijona ljudi. V zadnjih desetletjih je bilo registriranih le malo novih protibakterijskih učinkovin, patogene bakterije, kot je npr. proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus*, pa razvijajo odpornost na znane protibakterijske učinkovine, zato je iskanje novih učinkovin nujno potrebno (1, 2, 3, 4).

1.1. PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE

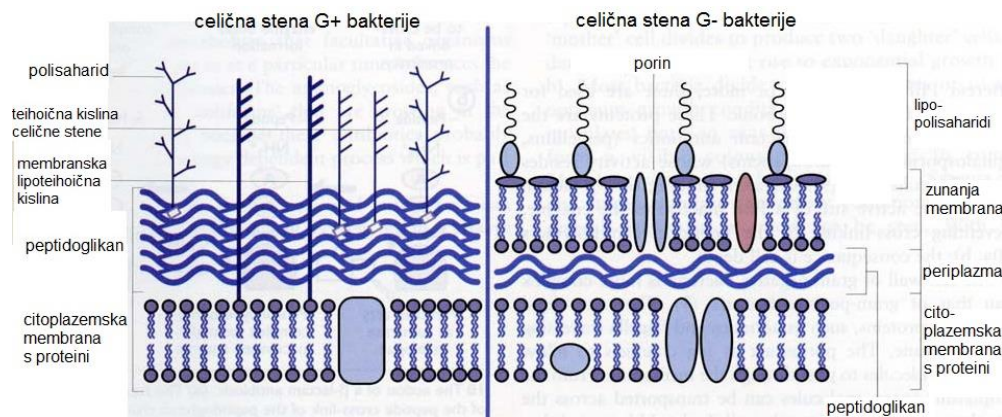
Protibakterijske učinkovine lahko pridobivamo biosintezno, pri čemer celotno sintezo izvedejo mikroorganizmi, polsintezno, ko osnovno spojino sintetizirajo mikroorganizmi, to pa kasneje kemijsko modificiramo ali popolnoma sintezno. Glede na izvor protibakterijskih učinkovin ločimo dva izraza, in sicer antibiotik in kemoterapevtik. Antibiotiki so snovi naravnega izvora, ki jih proizvajajo mikroorganizmi z namenom, da preprečijo rast drugim mikroorganizmom, medtem ko se izraz kemoterapevtik nanaša na učinkovine sinteznega izvora. Selektivna toksičnost protibakterijskih učinkovin temelji na razlikah med prokarionti in evkarionti, katerih celice se razlikujejo v zgradbi, strukturi nekaterih proteinov in nukleinskih kislin ter v biokemijskih in biosinteznih procesih. V bakterijah namreč poteka biosinteza določenih snovi, ki jih človek ne more sintetizirati sam, ampak jih mora pridobiti iz okolice (npr. folne kisline) in sinteza makromolekul, ki jih v človeških celicah ni (npr. peptidoglikana) (1, 5).

Poznamo pet razredov protibakterijskih učinkovin: (i) zdravila, ki zavirajo celični metabolizem (npr. sulfonamidi, ki so antimetaboliti folne kisline), (ii) zdravila, ki zavirajo biosintezo celične stene (npr. penicilini, ki zavirajo transpeptidazo in s tem biosintezo peptidoglikana), (iii) učinkovine, ki interagirajo s celično membrano (npr. gramicidin), (iv) zdravila, ki ovirajo sintezo proteinov (npr. aminoglikozidi, tetraciklini) in (v) zdravila, ki zavirajo transkripcijo, replikacijo in zvijanje DNA (npr. kinoloni, novobiocin) (1).

Za uspešno zdravljenje morajo protibakterijske učinkovine poleg selektivne toksičnosti izkazovati tudi širok spekter delovanja, dolgo razpolovno dobo v plazmi, dobro prodiranje v medceličnino in likvor, šibko vezavo na beljakovine v plazmi, možnost peroralnega jemanja in odsotnost neželenih učinkov. Dejstvo, da morajo spojine ustrezati vsem tem lastnostim, predstavlja za načrtovanje novih protimikrobnih učinkovin velik izziv (4).

1.2. PO GRAMU POZITIVNE IN PO GRAMU NEGATIVNE BAKTERIJE

Glede na razliko v sestavi celične stene bakterije delimo na po Gramu pozitivne (G+) in na po Gramu negativne (G-). Razlike so prikazane na sliki 1.



Slika 1: Zgradba celične stene po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije (prirejeno po 6).

Celična stena G+ bakterij je debela 20-40 nm in je sestavljena iz peptidoglikana, polisaharidnih molekul ter lipoteihoične in teihoične kisline. Lipoteihoična kislina je kovalentno povezana z glikolipidi citoplazemske membrane in ima endotoksinu podobne lastnosti, teihoična kislina pa sodeluje pri pritrjevanju bakterij na gostiteljsko celico. V G-organizmih je celična stena tanjša (2-7 nm), a je njena sestava kljub temu kompleksnejša, saj poleg citoplazemske membrane vsebujejo tudi zunanjo membrano, ki vsebuje transmembranske vodne kanale, imenovane porine, skozi katere lahko majhne hidrofilne učinkovine prosto prehajajo. Na zunanji strani so pripeti lipopolisaharidi, ki predstavljajo veliko oviro za prehod antibiotikov. Med zunanjo in citoplazemsko membrano je

periplazemski prostor, v katerem se lahko nahajajo encimi, ki zavirajo delovanje različnih antibiotikov (npr. β -laktamaze). Težaven prehod zunanje membrane G- bakterij je eden izmed razlogov, da je večina antibiotikov bolj učinkovitih proti G+ bakterijam (4).

1.3. BAKTERIJSKA ODPORNOST

Širjenje odpornosti (rezistence) bakterij na obstoječe protibakterijske učinkovine in pomanjkanje novih učinkovin predstavljata sodobni družbi vedno večjo grožnjo. Da bi omejili hitrost širjenja bakterijske rezistence, je ključno racionalno jemanje in smiselna uporaba obstoječih antibiotikov, tako v zdravstvu kot v veterini in kmetijstvu, ter razvoj novih skupin protimikrobnih učinkovin (7).

V bolnišničnem okolju so najbolj problematični na meticilin odporen *S. aureus* (MRSA), na vankomicin odporen *S. aureus* (VRSA) in na vankomicin odporni *Enterococci* (VRE). Zelo problematično skupino odpornih patogenov imenujemo »ESKAPE« (*Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella Pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Enterobacter species*), ki povzročajo veliko število infekcij in visoko smrtnost. Večina patogenov iz skupine »ESKAPE« je multirezistentnih, kar predstavlja enega največjih izzivov v klinični praksi (8).

Odpornost je lahko intrinzična (naravna), torej prisotna še pred stikom bakterije s protimikrobno učinkovino, ali pridobljena, torej tista, ki nastane po stiku s kemoterapevtikom. Pri naravno odpornih bakterijah lahko pride do spontane genske mutacije (npr. insercije, delecije, duplikacije in inverzije), lahko pa bakterija sploh nima tarčnega mesta, na katero deluje antibiotik. Pri bakterijah, ki so odporne na več učinkovin hkrati, govorimo o navzkrižni odpornosti (4, 5, 9).

Pridobljena odpornost je posledica prenosa gena za odpornost med bakterijskimi celicami. Dedni material bakterij je največkrat prosta krožna dvojnovijačna molekula DNA, ki ni obdana z jedrno membrano. Številne bakterije pa imajo v citoplazmi še manjše krožne zunajkromosomske molekule DNA (plazmide), ki se delijo neodvisno od kromosoma in lahko nosijo zapis za gene za rezistenco. Nekateri odseki plazmidne DNA, imenovni transpozoni, se lahko prenesejo iz enega plazmida na drugega ali pa iz plazmida na kromosom in tako širijo odpornost znotraj celice. Prenos genov za rezistenco med različnimi bakterijskimi celicami poteka predvsem s konjugacijo in s transdukcijo. Pri transdukciji gre za prenos plazmidov z bakteriofagi, ki zapustijo odporno celico in nato »okužijo« še

neodporno celico. Na tak način se prenaša npr. gen, ki nosi zapis za sintezo β -laktamaz, t.j. encimov, ki razgrajujejo β -laktamske antibiotike. Konjugacija je prenos genske informacije z neposrednim stikom med dvema bakterijama preko izrastka, imenovanega pilus. Manj pomemben način prenosa je transformacija, pri kateri pride do neposrednega vstopa DNA iz okolice v celico (1, 4, 5).

1.3.1. Biokemijski mehanizmi odpornosti

Ker se bakterije razmnožujejo hitro, se tudi odpornost hitro izrazi. Bakterije se proti antibiotikom borijo na več načinov, npr. (i) z izločanjem encimov, ki razgradijo zdravilo (npr. β -laktamaze), (ii) z modifikacijo vezavnega mesta (npr. z mutacijo penicilin vezočih proteinov (PBP)), (iii) z zmanjšano akumulacijo učinkovine v bakteriji zaradi črpanja učinkovine iz celice preko izlivnih črpalk ali zmanjšane prepustnosti celične membrane (npr. zaradi spremembe strukture porinov v zunanji membrani G- bakterij, kar zmanjša prehod hidrofilnih antibiotikov v bakterijo), (iv) s spremembo presnovne poti, na katero deluje antibiotik ali (v) z nastankom biofilmov, t.j. kompleksnih kolonij mikroorganizmov, ki lahko živijo na različnih površinah in ustvarjajo okolje v katerem je učinkovitost antibiotika manjša (npr. nizka koncentracija O_2 , nizek pH in odsotnost vode) (4, 8).

Izlivne črpalke predstavljajo enega izmed najpomembnejših mehanizmov za razvoj t.i. multirezistentnosti (*angl.* multidrug resistance, MDR). Ne le, da izlivne črpace črpajo učinkovine iz celice, ampak se posledično zaradi (pre)nizke znotrajcelične koncentracije antibiotika tudi mutacije hitreje razvijajo. Poznamo več vrst izlivnih črpalk, ki so razširjene med skoraj vsemi bakterijskimi vrstami. Zelo raziskana skupina črpalk je družina RND (*angl.* resistance nodulation division), ki jo najdemo le v G- bakterijah. Vanjo spada kompleks AcrAB-TolC bakterije *E. coli*, za katerega se je izkazalo, da iz celice črpa veliko število učinkovin, npr. kloramfenikol, novobiocin, rifampicin, penicilin, nalidiksno kislino, tetracikline, makrolide ter tudi številna barvila, detergente, hormone, itd. (7, 10).

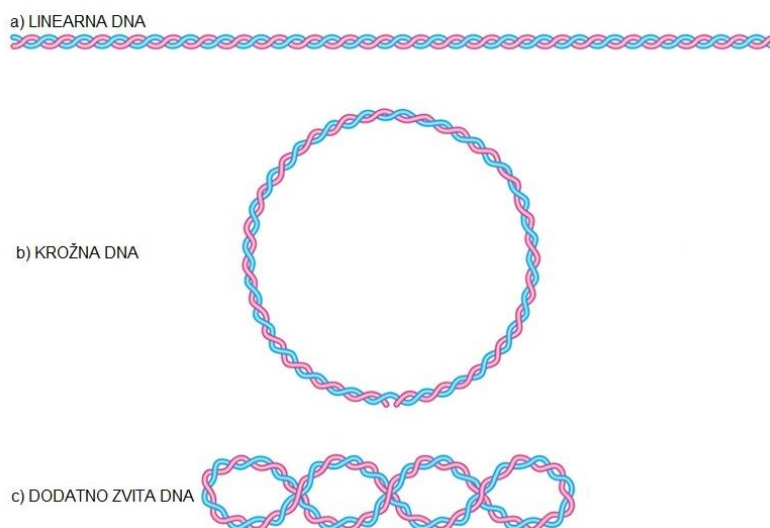
1.4. MOLEKULA DNA KOT TARČA ZDRAVILNIH UČINKOVIN

1.4.1. Vloga in zgradba molekule DNA

Deoksiribonukleinsko kislino (DNA) lahko imenujemo tudi informacijska molekula, saj je nosilka dedne informacije in vsebuje genetski zapis za sintezo vseh proteinov ter s tem za razvoj in delovanje živih organizmov. Makromolekula DNA je sestavljena iz dveh nerazvejanih heteropolimernih verig, povezanih v dvojno vijačnico. Vsaka veriga je

sestavljena iz monomernih nukleotidnih enot, vsak nukleotid pa iz dušikove organske baze (adenina, timina, gvanina ali citozina), sladkorja (deoksiriboze) in fosfata. Baze obeh verig se med seboj povezujejo z vodikovimi vezmi, pri čemer nastanejo komplementarni bazni pari: adenin-timin in gvanin-citozin. Zaporedje nukleotidov (sekvenca DNA) predstavlja shranjeno informacijo (11).

Pri evkariontih je jedrna DNA v obliki linearne dvojne vijačnice (slika 2a), pri mikroorganizmih pa se oba konca linearne verige povežeta s kovalentnimi vezmi do nastanka zaprte krožne molekule (slika 2b). Krožno obliko kromosomske DNA najdemo pri bakterijah, prisotna pa je tudi v evkariontih, in sicer v mitohondrijih in kloroplastih. Iz sproščene krožne oblike lahko nastane nova konformacija, dodatno zvita DNA (slika 2c), ki nastane, če se linearna oblika, tik preden se zapre, vsaj še enkrat zasuka okrog svoje osi (11).



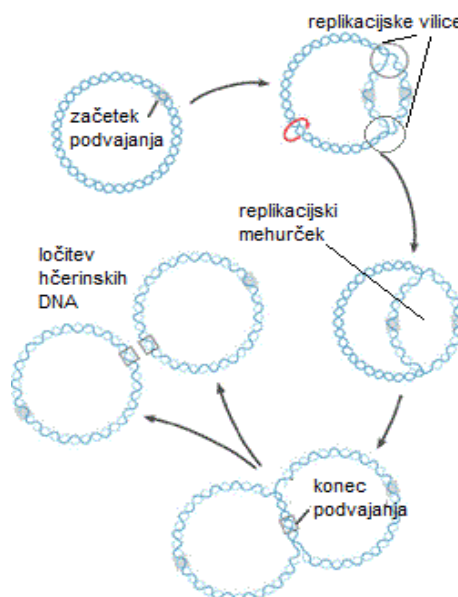
Slika 2: Linearna (a), krožna (b) in dodatno zvita oblika DNA (c) (prirejeno po 12).

Prehod med bolj stabilno sproščeno obliko in dodatno zvito obliko krožne DNA katalizirajo encimi iz skupine topoizomeraz. Dodatno zvitje ima lahko več pomenov. Molekula DNA postane na ta način bolj kompaktna in zavzame manj prostora v celici, lahko pa zvitje vpliva tudi na uravnavanje podvajanja in prepisovanja DNA. Negativna nadzvitost (v obratni smeri dvojne vijačnice) namreč omogoča lažje razklepanje baznih parov (11).

1.4.2. Podvajanje DNA

Podvajanje DNA je semikonzervativno, kar pomeni, da se vijačnica DNA odvijne, vsaka od verig pa služi kot matrica za nastanek nove, komplementarne verige. Hčerinska DNA je torej sestavljena iz ene novonastale verige in ene verige, ki je služila kot predloga. Podvajanje se začne na več točno določenih mestih, kjer nastanejo replikacijske ali podvojevalne vilice.

Replikacijski mehurček se z nadaljevanjem podvajanja povečuje, ob tem pa se v molekuli povečuje napetost. Sprostitev napetosti omogoči encim DNA-giraza, ki katalizira odstranjevanje dodatnega zvitja, kar pomaga pri odvijanju verig. Pri podvajanju molekule DNA se dvojce podvojevalnih vilic pomika v nasprotnih smereh, dokler se na drugi strani krožne DNA ne sreča. Encim topoizomeraza IV katalizira ločitev novonastalih krožnih hčerinskih DNA, s čimer se podvajanje konča (11).



Slika 3: Podvajanje krožne oblike DNA (prirejeno po 13).

1.4.3. Topoizomeraze

Topoizomeraze so encimi, ki spreminjajo topološka stanja molekule DNA. Sodelujejo pri procesih, pri katerih je za dostop do informacij, shranjenih v DNA, potrebna ločitev obeh vijačnic. Ločitev je lahko začasna, npr. pri procesih transkripcije, rekombinacije in popravila DNA, ali pa stalna, npr. pri podvajanju. Mehanizem cepitve je pri vseh topoizomerazah enak. Najprej pride do nastanka fosfodiesterne vezi med fosfatno skupino DNA in tirozinskim ostankom v aktivnem mestu encima, pri čemer nastane s kovalentno vezjo povezan intermediat. V času obstoja intermedata se lahko topologija DNA spremeni, čemur sledi sprostitve encima in ponovno združitve molekule DNA (14).

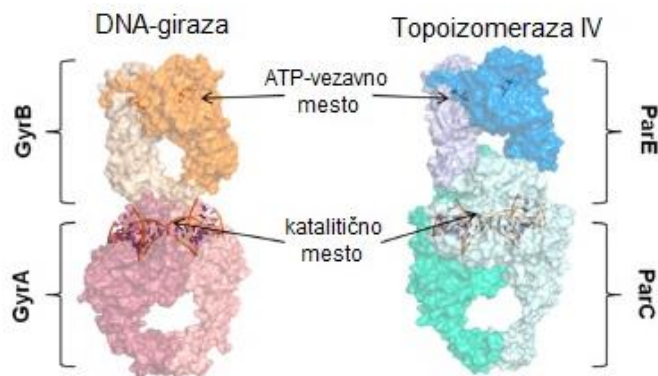
Poznamo topoizomeraze tipa I, ki cepijo eno verigo DNA, in topoizomeraze tipa II, ki cepijo obe verigi nukleinske kisline hkrati. Tako v evkariontskih kot v prokariontskih celicah najdemo oba tipa topoizomeraz. Bakterijske topoizomeraze tipa IIA so strukturno homologne človeškim topoizomerazam II, ki so pogosta tarča za razvoj protitumornih učinkovin. Tako bakterijske kot človeške topoizomeraze kot vir energije uporabljajo ATP. Ker je ATP-vezavno mesto bakterijskih topoizomeraz IIA podobno mnogim človeškim encimom, se je pri razvoju zaviralcev bakterijskih encimov, z namenom doseganja selektivnosti delovanja, potrebno osredotočati na strukturne razlike med njimi (14, 15).

1.4.4. Bakterijske topoizomeraze tipa IIA

V bakterijah najdemo dva predstavnika topoizomeraz tipa IIA, DNA-girazo in topoizomerazo IV (topo IV). DNA-giraza katalizira sprostitve dodatnega zvitja pred

podvojevalnimi vilicami v molekuli DNA, kar pomaga pri sprostitvi torzijske napetosti med podvajanjem. Topoizomeraza IV je odgovorna za razklenitev dveh novonastalih hčerinskih molekul DNA po koncu replikacije (15).

Encima imata podobno strukturo. DNA-giraza je heterotetramerni protein, sestavljen iz dveh podenot imenovanih DNA-giraza A (GyrA) in dveh podenot imenovanih DNA-giraza B (GyrB), ki skupaj tvorita strukturo A_2B_2 . Funkcija GyrA je cepitev in ponovna združitev molekule DNA med podvajanjem.



Slika 4: Strukturi heterotetramernih encimov DNA-giraze (levo) in topoizomeraze IV (desno) (prirejeno po 17).

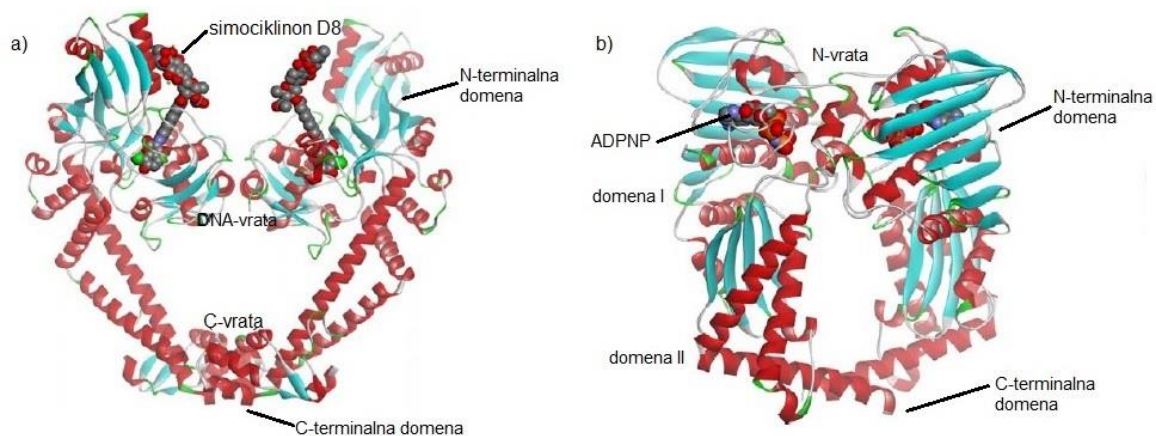
To je katalitičen proces, pri katerem pride do konformacijskih sprememb encima, za kar je potrebna energija, ki se sprosti ob vezavi in hidrolizi molekule ATP na podenoti GyrB. Topoizomeraza IV je sestavljena iz dveh podenot ParC, ki sta homologni podenotama GyrA in dveh podenot ParE, homolognih podenotama GyrB, ki skupaj prav tako tvorijo heterotetramerni protein C_2E_2 (15, 16).

1.4.5. Struktura in delovanje DNA-giraze

Kristalna struktura celotne DNA-giraze ali topoizomeraze IV še ni bila objavljena, določili pa so že številne kristalne strukture fragmentov obeh encimov, kar je pomagalo pri razjasnitvi strukture in funkcije DNA-giraze. Na sliki 5a je prikazana kristalna struktura GyrA v kompleksu z njenim zaviralcem simociklinonom D8, na sliki 5b pa kristalna struktura GyrB iz bakterije *E. coli* v kompleksu z ADPNP (nehidrolizirajoči analog ATP). Encim v prisotnosti zaviralca oz. ATP ali ADPNP tvori dimer (16).

Podenota GyrA DNA-giraze je sestavljena iz N-končne domene (*angl.* winged helix domain, WHD), odgovorne za cepitev in ponovno združitev DNA ter C-terminalne domene (CTD), ki je pomembna za zvijanje DNA. Podenoto GyrB sestavljata N-terminalna domena, kjer se nahaja ATP-vezavno mesto, ki ima podobno strukturo kot ATP-vezavno mesto večje naddružine encimov GHKL (giraza, Hsp90, histidin kinaza, MutL) in C-končna domena (TOPRIM - topoizomeraza-primaza) z vezavnim mestom za Mg^{2+} ione (15).

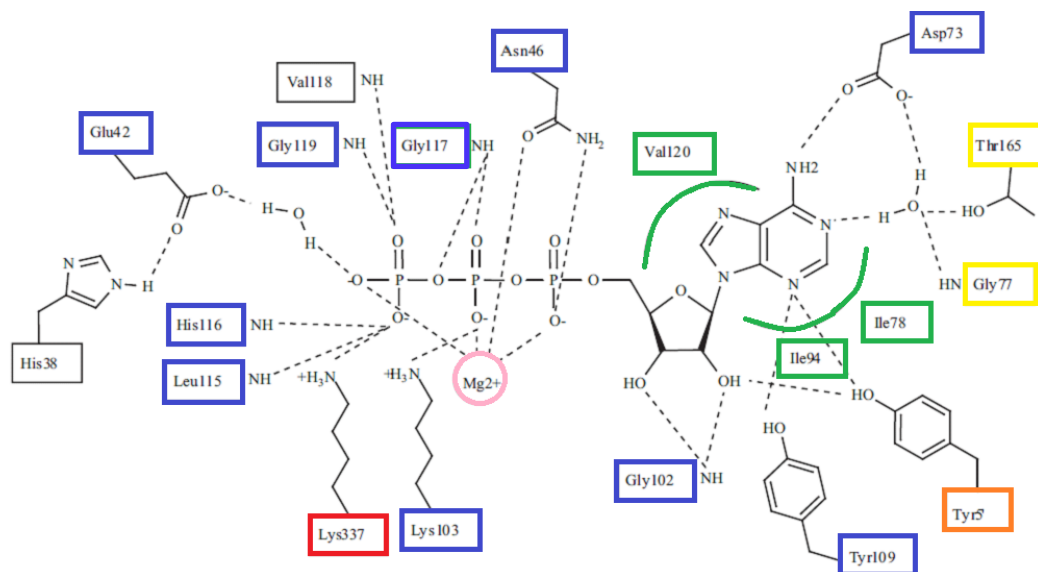
DNA-girazo lahko razdelimo na tri dele, N-vrata, DNA-vrata in C-vrata, ki se zaporedoma odpirajo in zapirajo in omogočajo prehod dvojnovijačne DNA v različnih fazah katalitičnega cikla. N-vrata tvorita N-končni domeni podenot GyrB, DNA-vrata ležijo med N-terminalno domeno GyrA in C-končno domeno GyrB (TOPRIM domeno), C-vrata pa tvorita C-terminalni domeni GyrA (slika 5) (15).



Slika 5: Kristalna struktura podenot GyrA iz *E. coli* v kompleksu s simociklinom D8 (a) in podenot GyrB v kompleksu z ADPNP (b) (prirejeno po 15).

1.4.6. ATP-vezavno mesto na DNA-girazi B

Glavna tarča za razvoj novih zaviralcev DNA-giraze B je njeno ATP vezavno mesto. Molekula ATP se v vezavno mesto GyrB veže s fosfatnimi skupinami, ki tvorijo koordinacijsko vez z Mg^{2+} ionom (slika 6 – roza barva), vezava pa je stabilizirana z vodikovimi vezmi. Te se tvorijo z ostanki Glu42, Asn46, Asp73, Gly102, Lys103, Tyr109, Leu115, His116, Gly117 in Gly119 iz domene I (slika 6 – modra barva). Aminokislinski ostanki Ile78, Ile94 in Val120 pa tvorijo hidrofobne interakcije z adeninom in ribozo iz molekule ATP (slika 6 – zelena barva). Lys337 iz C-terminalnega konca je tudi del ATP-vezavnega mesta in tvori dodatno vodikovo vez z γ -fosfatno skupino ATP (slika 6 – rdeča barva). Pomemben del kompleksa je kristalna molekula vode, preko katere se tvorijo posredne vodikove vezi med adeninskim obročem in aminokislinskimi ostanki Asp73, Gly77 in Thr165 (slika 6 – rumena barva). Tudi drugi monomer tega kompleksa pripomore k vezavi ATP. Stranska veriga Tyr5' se preko dveh vodikovih vezi veže z 2'-hidroksilno skupino riboze in dušikovim atomom na 3. mestu adeninskega obroča (slika 6 – oranžna barva). Stranska skupina Ile10' pa stabilizira dimer preko hidrofobnih interakcij (15, 16).



Slika 6: Podrobnejši prikaz interakcij med molekulo ATP in vezavnim mestom GyrB. Aminokislinski (AK) ostanki, ki tvorijo vodikove vezi so označeni z modro barvo, tisti, ki tvorijo hidrofobne interakcije pa z zeleno barvo. Lys337, ki tvori ionsko vez je označen z rdečo, AK ostanki, ki se vežejo posredno preko kristalne molekule vode z rumeno, AK, ki tvori vodikovi vezi z ribozo in dušikom na adeninu z oranžno, Mg^{2+} ion, ki tvori koordinacijske vezi pa z roza barvo (prirejeno po 16).

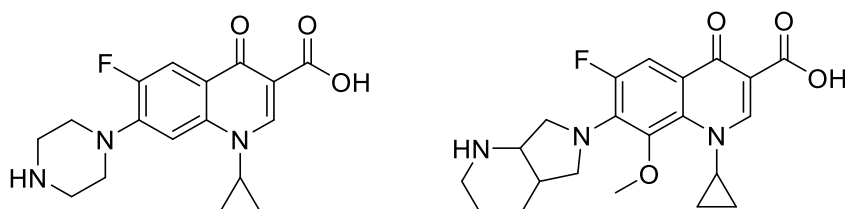
1.5. UČINKOVINE Z DELOVANJEM NA TOPOIZOMERAZE IIA

DNA-giraza in topoizomeraza IV se v 40% ujemata v sekvenci aminokislin in imata podobni vezavni mesti. To omogoča načrtovanje t.i. dualnih zaviralcev, ki bi hkrati delovali na oba encima. Take učinkovine imajo bolj učinkovito protibakterijsko delovanje, bakterije pa nanje težje razvijejo odpornost, saj bi morala mutacija poteči na dveh različnih mestih hkrati. DNA-girazo in topoizomerazo IV najdemo le v bakterijskih celicah in kljub podobnostim z nekaterimi encimi, npr. ATP-azami iz družine GHKL, so v vezavnem mestu določene razlike, zato sta primerni tarči za doseganje selektivne toksičnosti (15, 18).

1.5.1. Zaviralci DNA-giraze A

Kljub številnim raziskavam na tem področju so fluorokinoloni še vedno edini zaviralci DNA-giraze in topo IV, ki so trenutno v klinični uporabi. Odkrili so jih v zgodnjih 60-ih letih 20. stoletja, njihov najbolj znan predstavnik pa je ciprofloksacin, ki velja za enega izmed najbolj širokospektralno delujočih antibiotikov. Fluorokinoloni se vežejo na podenoto GyrA/ParC in stabilizirajo kompleks med DNA-girazo/topo IV ter molekulo DNA. Tako preprečijo združitev dveh verig DNA in ustavijo replikacijski cikel, kar vodi v smrt celice. Fluorokinoloni delujejo baktericidno tako na G⁺ kot na G⁻ bakterije in atipične bakterije in se uporabljajo za zdravljenje urinarnih in sistemskih infekcij ter infekcij respiratornega

trakta. Zaradi pojavljanja resnih neželenih učinkov in nastanka rezistentnih sevov pa postaja njihova uporaba v klinični praksi omejena. Odpornost na kinolone se v glavnem pojavi zaradi črpanja učinkovin iz celice preko izlivnih črpalk ali zaradi zmanjšane permeabilnosti zunanje membrane za vstop učinkovin. Pojav rezistence je zlasti pogost pri G- bakterijah s kompleksnejšo celično steno. Manj pogosto pride do mutacij v genih, ki nosijo zapis za topoizomeroze, kar zmanjša njihovo afiniteto do učinkovin (5, 15, 18).



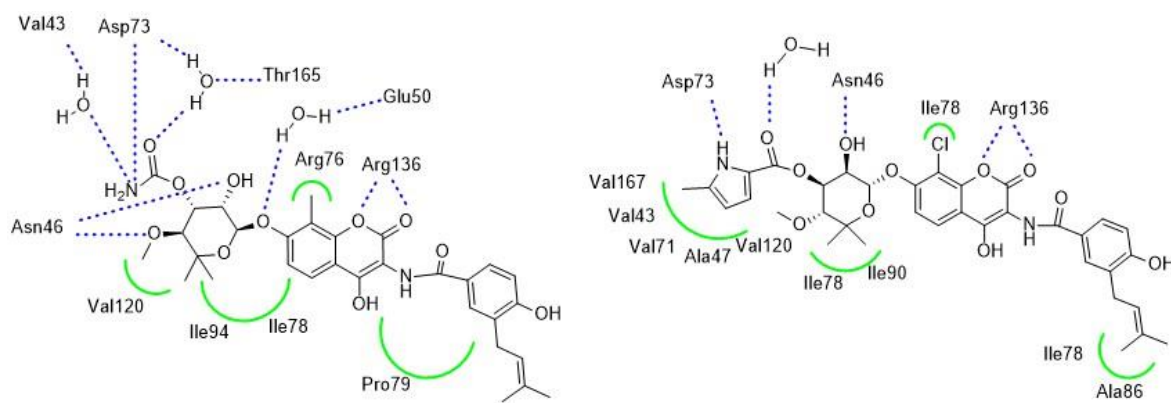
Slika 7: Fluorokinolona ciprofloksacin (levo) in moksifloksacin (desno).

1.5.2. Zaviralci DNA-giraze B

ATP-vezavno mesto DNA-giraze B je privlačna tarča za raziskovanje in razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Spojine, ki kompetitivno zavirajo ATP-azno aktivnost podenot GyrB in ParE, predstavljajo dober obet za doseganje napredka v boju z bakterijsko rezistenco, saj niso podvržene že obstoječim mehanizmom rezistence in ne pride do navzkrižne odpornosti s fluorokinoloni. Odkritje klinično uporabnega ATP-kompetitivnega zaviralca DNA-giraze in topoizomeroze IV bi pomenil velik napredek v boju proti rezistentnim patogenom, vključno z G- bakterijami kot so *P. aeruginosa*, *A. baumannii* in *K. pneumoniae* (17, 18).

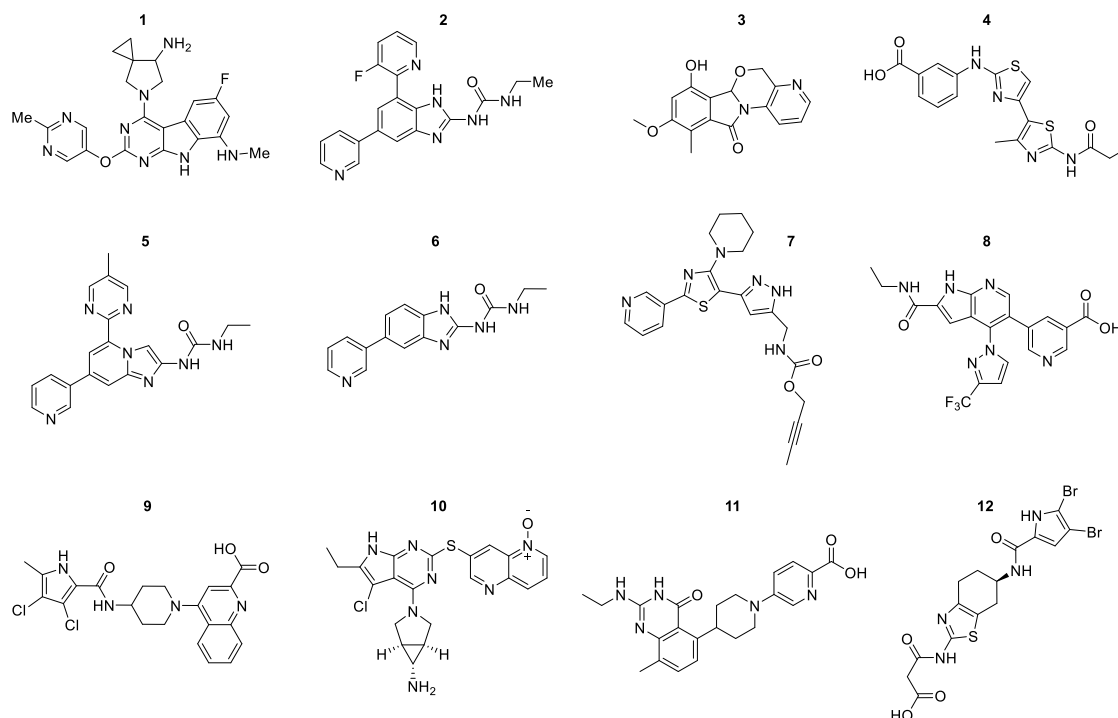
Prvi znani ATP-azni zaviralci DNA-giraze so bili aminokumarini, h katerim spadajo naravni produkti novobiocin, klorobiocin in kumeromicin A₁. Aminokumarine proizvajajo mikroorganizmi rodu *Streptomyces*. Edini zaviralec GyrB, ki je kdaj prišel v klinično rabo je bil novobiocin. Novobiocin izkazuje zelo dobro baktericidno delovanje na G⁺ bakterije, zato se je uporabljal za zdravljenje MRSA, a so ga kasneje zaradi težav z akutno toksičnostjo in razvojem bakterijske odpornosti umaknili iz uporabe. S študijem kristalne strukture kompleksa med novobiocinom in 24 kDa velikim N-terminalnim delom DNA-giraze, GyrB24 so potrdili, da se vezavno mesto za novobiocin delno prekriva z vezavnim mestom za naravni substrat ATP. Kot je prikazano na sliki 8, se sladkorni fragment v novobiocinu, L-novioza, veže v adeninski del vezavnega mesta za ATP in tvori dve vodikovi vezi z Asn46, preko karbamatne skupine pa še dve vodikovi vezi z Asp73: eno direktno, drugo pa preko kristalno vezane molekule vode. Novobiocin tvori skupno pet direktnih vodikovih vezi z

aminokislinskimi ostanki Asn46, Asp73 in Arg136, indirektno pa še štiri vodikove vezi z Val43, Glu50, Asp73 in Thr165 preko treh kristalnih molekul vode. Konformacija novobiocina v vezavnem mestu je dodatno stabilizirana s hidrofobnimi interakcijami z aminokislinskimi ostanki Arg76, Ile78, Pro79, Ile94 in Val120. Dokazali so, da novobiocin zavira tudi ATPazno aktivnost topoizomeraze IV, kar odpira možnost načrtovanja spojin, ki bi hkrati delovale na obe tarči. Klorobiocin se v vezavno mesto veže na podoben način kot novobiocin, a mu strukturna razlika, t.j. zamenjava karbamatne skupine s 5-metilpirolo-2-karboksilatno skupino, omogoča močnejšo vezavo. Metilpirolni obroč tvori vodikovo vez z Asp73, poleg tega pa zasede tudi lipofilni žep vezavnega mesta in vstopa v hidrofobne interakcije z Val43, Ala47, Val71 in Val167, medtem ko je pri novobiocinu ta žep zapolnjen z dvema molekulama vode. To pripomore k približno 20-krat večji vezavni afiniteti klorobiocina (K_D [klorobiocin] = 1,2 nM; K_D [novobiocin] = 28 nM) (slika 8) (15, 16).



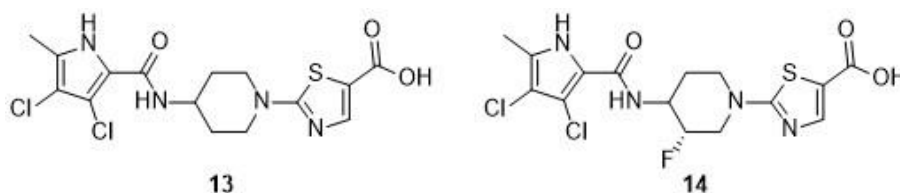
Slika 8: Prikaz interakcij novobiocina (levo) ter klorobiocina (desno) v aktivnem mestu GyrB24. Vodikove vezi so predstavljene z modro prekinjeno črto, hidrofobne interakcije pa z zeleno krivuljo (prirejeno po 16 in 18).

Z namenom izboljšanja fizikalno-kemijskih lastnosti ter *in vitro* in *in vivo* učinkovitosti je bilo razvitih veliko novih razredov zaviralcev DNA-giraze B. Dobro izhodišče za načrtovanje izboljšanih spojin predstavlja dostopnost do mnogih kristalnih struktur podenot GyrB in ParE v kompleksu z ADPNP ali inhibitorji ter analiza odnosa med njihovo strukturo in delovanjem. Pri načrtovanju novejših razredov DNA-giraze B so se številni raziskovalci posluževali tehnik rešetanja visoke zmogljivosti (*angl.* high-throughput screening, HTS), virtualnega rešetanja (*angl.* virtual screening, VS) in strukturno podprtega načrtovanja (*angl.* structure-based design, SBD). Na ta način so prišli do mnogo novih razredov zaviralcev GyrB, od katerih so nekateri prikazani na sliki 9 (15, 17, 19).



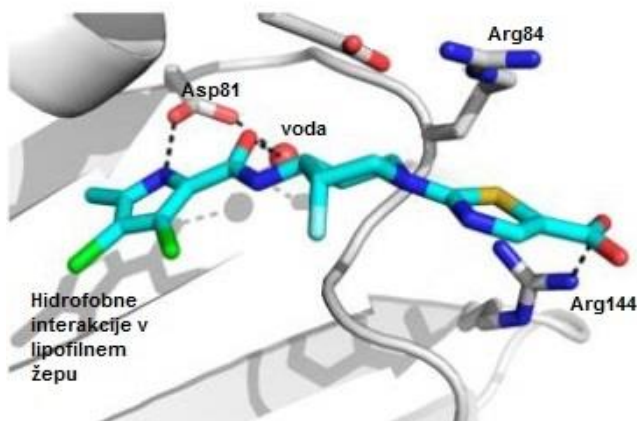
Slika 9: Predstavniki novejših strukturnih razredov zaviralcev GyrB: 1: triciklični pirimidini, 2: aminobenzimidazoli, 3: indazoli, 4: 4,5'-bitiazoli, 5: imidazo[1,2-a]piridini, 6: benzimidazolsečnine, 7: pirazoltiazoli, 8: azaindoli, 9: pirolamidi, 10: pirolopirimidini, 11: kinazolinoni, 12: tetrahydrobenzotiazoli (prirejeno po 15, 17, 18, 19, 20, 21).

V podjetju AstraZeneca so s pomočjo reševanja na osnovi fragmentov z uporabo NMR-spektroskopije odkrili skupino t.i. pirolamidnih zaviralcev DNA-giraze B (spojina **9**, slika 9) (15). Ti predstavljajo enega izmed novejših razredov zaviralcev GyrB in so dobro izhodišče za nadaljnjo optimizacijo in sintezo novih analogov. Spojina **13** (slika 10), eden novejših predstavnikov pirolamidnih zaviralcev, poleg dobre encimske aktivnosti in ustrezne topnosti deluje tudi baktericidno na bakterije *S. aureus*, *S. pneumoniae* in *H. influenzae* z minimalnimi baktericidnimi koncentracijami (MBK) 8 $\mu\text{g/mL}$, 0,5 $\mu\text{g/mL}$ in 4 $\mu\text{g/mL}$ (15). Njen analog, spojina **14** (slika 10), izkazuje proti DNA-girazi iz bakterije *S. aureus* vrednost IC_{50} 4 nM, njena minimalna inhibitorna koncentracija na to bakterijo (MIK) pa je 2 $\mu\text{g/mL}$ (15). Proti bakteriji *E. coli* spojina ne izkazuje protibakterijskega delovanja, najverjetneje zaradi prisotnosti izlivnih črpalk pri G- bakterijah, ki učinkovino aktivno črpajo iz celice, na kar nakazuje aktivnost spojine **14** na sev *E. coli* brez izlivnih črpalk (15).



Slika 10: Predstavniki pirolamidne serije, ki so jih razvili v podjetju AstraZeneca (prirejeno po 15).

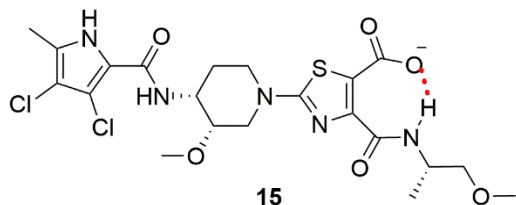
Kristalna struktura spojine **14** v kompleksu z GyrB iz *S. aureus* razkriva vezavo te spojine v aktivnem mestu encima. 3,4-Dikloro-5-metil-1*H*-pirolni del molekule se veže v lipofilni žep



Slika 11: Prikaz kristalne strukture spojine **14** v kompleksu z GyrB iz *S. aureus* (PDB koda: 3TTZ). Vodikove vezi so prikazane s črno prekinjeno črto (prirejeno po 20).

ATP-vezavnega mesta, kamor se sicer veže adeninski del molekule ATP. Pirolamidni del tvori vodikovi vezi z Asp81 (Asp73 v primeru bakterije *E. coli*) in kristalno vezano molekulo vode, med tiazolnim obročem in aminokislinskim ostankom Arg84 (Arg76 v primeru bakterije *E. coli*) prihaja do π - π interakcij, karboksilna skupina pa se z vodikovo vezjo veže s stransko verigo Arg144 (Arg136 v primeru bakterije *E. coli*) (15).

Fluorov atom spojine **14** je sicer obrnjen proti t.i. hidrofobnemu dnu encima, a ga ne doseže, zato so pri nadaljnji modifikaciji spojine na to mesto uvedli metoksi substituent, s čemer se je aktivnost spojine povečala (spojina **15**, slika 12). Dodatno so na tiazolni obroč uvedli *N*-



Slika 12: Spojina **15** s prikazano intramolekularno H-vezjo (rdeča črtkana črta) (prirejeno po 22).

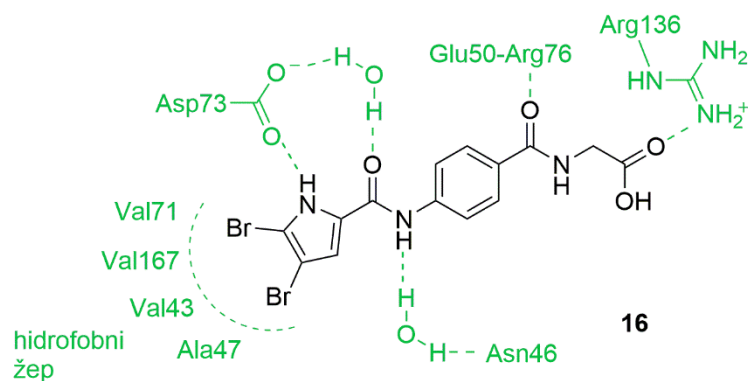
(1-metoksiprop-2-il)acetamidni fragment, preko katerega lahko nastane intramolekularna vodikova vez s karboksilno kislino (spojina **15**, slika 12). Na ta način so želeli zmanjšati kislost karboksilne kisline ter tako doseči boljšo penetracijo spojine skozi bakterijsko membrano in posledično boljšo protibakterijsko aktivnost.

Spojina **15** je izkazovala zelo dobro encimsko zaviralno aktivnost ($IC_{50} = <10$ nM proti DNA girazi iz *S. aureus*) (17), nizke minimalne zaviralne koncentracije proti G^+ in nekaterim G^- bakterijam z MIK vrednostmi na *S. aureus*, *S. pneumoniae* in *H. influenzae* 0,036 μ g/mL, 0,016 μ g/mL in 0,13 μ g/mL (17), nizko frekvenco spontanega razvoja odpornosti pri bakterijah *S. aureus* in *S. pneumoniae*, dobro vodotopnostjo in zmerno vezavo na plazemske proteine (2,5% proste spojine). Spojina **15** je dosegla fazo I kliničnih študij, a so bile nadaljnje klinične raziskave prekinjene zaradi variabilnosti na majhni skupini zdravih prostovoljcev in opaženih mitohondrijskih sprememb v predkliničnih študijah (17, 22).

2. NAČRT DELA

Cilj magistrske naloge je pripraviti spojine, ki bi izkazovale dobro zaviralno delovanje na DNA-girazo in dobro protibakterijsko aktivnost. Načrtovali in sintetizirali bomo štiri serije novih potencialnih ATP-kompetitivnih zaviralcev GyrB, jih biološko ovrednotili s testiranjem na encimih DNA-giraza in topoizomeraza IV iz bakterij *E. coli* in *S. aureus* in na štirih različnih bakterijskih sevih ter preučili odnos med strukturo in delovanjem (SAR). Istovetnost ter ustrezno čistost spojin bomo določili z analiznimi metodami, kot so jedrska magnetna resonanca (NMR), masna spektrometrija (MS), infrardeča spektroskopija (IR), polarimetrija in tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC). Vezavo načrtovanih spojin v ATP-vezavno mesto bomo ocenili z molekulskim sidranjem spojin s programom GOLD.

Pri načrtovanju spojin si bomo pomagali s preučevanjem že znanih struktur zaviralcev DNA-giraze B, sintetiziranih na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani in zaviralcev, opisanih v strokovni literaturi. Za enega izmed pirolamidnih zaviralcev sintetiziranih na Katedri za farmacevtsko kemijo je bila nedavno razrešena kristalna struktura v kompleksu z *E. coli* GyrB (spojina **16**: $IC_{50} = 450$ nM, PDB koda 4ZVI, slika 13) (18). Z našimi spojinami bomo poskusili posnemati interakcije opažene v tej kristalni strukturi in tvoriti dodatne interakcije za aminokislinskimi ostanki v aktivnem mestu, ki so pri spojini **16** še neizkoriščene. Opirali se bomo tudi na kristalni strukturi novobiocina in klorobiocina v vezavnem mestu (slika 8).

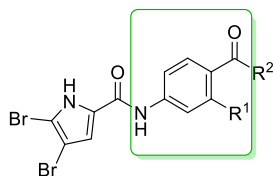
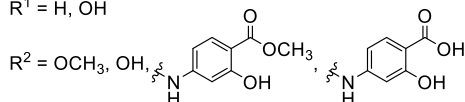


Slika 13: Kristalna struktura kompleksa spojine **16** in GyrB iz *E. coli*. Najpomembnejše interakcije in aminokislinski ostanki so prikazani z zeleno barvo (prirejeno po 18).

Vsem sintetiziranim spojinam bo skupen *N*-fenilpirolamidni del molekule, razlikovale pa se bodo v substituentih na pirolovem in fenilnem obroču. Strukturno jih lahko razdelimo v štiri razrede: (i) spojine s 4-aminobenzoilnim oz. 4-amino-2-hidroksibenzoilnim centralnim delom (A, slika 14), (ii) spojine s 4-amino-3-izopropoksibenzamidnim centralnim delom (B,

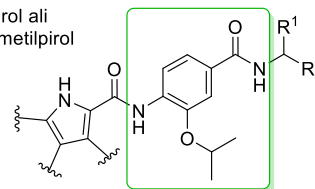
slika 14), (iii) spojine s 4-amino-3-aminoetoksibenzamidnim centralnim delom (C, slika 14) in (iv) spojine z 1,4-benzoksazin-3-onskim centralnim skeletom (D, slika 14).

A) Spojine s 4-aminobenzoilnim oz.
4-amino-2-hidroksibenzoilnim centralnim delom


$$R^1 = H, OH$$


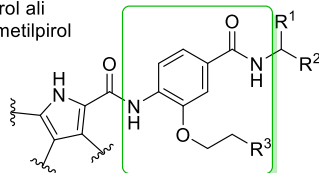
B) Spojine s 4-amino-3-izopropoksibenzamidnim centralnim delom

4,5-dibromopirol ali
3,4-dikloro-5-metilpirol


$$R^1 = \text{CH}_3, \text{Bzl}$$
$$R^2 = \text{COOCH}_3, \text{COOH}, \text{CONHNH}_2, \text{N} \begin{array}{c} \diagup \text{C} \diagdown \\ \diagdown \text{N} \diagup \\ \text{H} \end{array} \text{C}=\text{O}$$

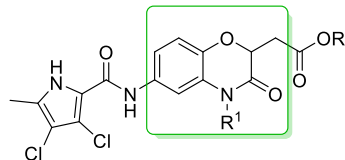
C) Spojine s 4-amino-3-aminoetoksibenzamidnim centralnim delom

4,5-dibromopirol ali
3,4-dikloro-5-metilpirol


$$R^1 = \text{CH}_3, \text{Bzl}$$

$R^2 = \text{COOCH}_3, \text{COOH}, \text{CONHNH}_2,$
 $R^3 = \text{NHBOc}, \text{NH}_3^+\text{Cl}^-$

D) Spojine z 1,4-benzoksazin-3-onskim centralnim skeletom


$$R^1 = H, Bzl$$
$$R^2 = \text{CH}_2\text{CH}_3, \text{H}$$

Slika 14: Štirje strukturni razredi načrtovanih *N*-fenilpirolamidnih zaviralcev DNA-giraze B.

Iz razlik v aktivnosti med spojinami, ki bodo na levem delu molekule vsebovale 4,5-dibromopirolni ali 3,4-dikloro-5-metilpirolni fragment bomo ugotavljali, kateri substituenti na pirolnem obroču so bolj optimalni za vezavo v adeninski del ATP-vezavnega mesta DNA-giraze B. Vloga Br- oz. Cl-atomov bo povečati lipofilnost pirolnega obroča in omogočiti dodatne interakcije z Val167, Val71, Val43, Ala47 in Val120 v hidrofobnem žepu encima. Zaradi elektronakceptorskih lastnosti, klor in brom pripomoreta tudi k znižanju pKa pirolne NH skupine in s tem k večji jakosti vodikove vezi, ki se tvori med pirolno NH skupino in aminokislinskim ostankom Asp73. Podobno kot pri spojin **16** bomo tudi pri naših zaviralcih ohranili nesubstituirano pirolamidno NH skupino, ki je pomembna za tvorbo vodikove vezi z Asn46 (slika 13). Preostali del molekule se ne veže v ATP-vezavno mesto encima. Na ta del bomo uvedli substituent, ki lahko tvori π - π interakcije s solnim mostičkom Glu50-Arg76 ali ionske interakcije z Arg136. Naravni substrat ATP interakcij z omenjenimi skupinami ne tvori, kar je pomembno za zagotavljanje selektivnosti vezave naših spojin na DNA-girazo in ne na druge encime, ki tudi vsebujejo vezavno mesto za ATP (npr. različne kinaze in encimi iz družine GHKL).

S pripravo spojin iz razreda A bomo med drugim preverjali vpliv dolžine molekul na njihovo aktivnost. Preverjali bomo tudi vpliv uvedbe OH skupine na mesto R^1 (slika 14A). Z uvedbo različnih substituentov na *orto* mesto centralnega benzenovega obroča glede na pirolamdini del pri spojinah iz razredov B in C, bomo predvidoma tvorili dodatne interakcije s t.i. hidrofobnim dnom vezavnega mesta, ki ga sestavljajo aminokislinski ostanki Ile78, Ile90 ali Pro79. Predvidevamo, da bomo na ta način dosegli izboljšano jakost delovanja spojin. Na *para* mesto fenilnega obroča bomo pripeli skupine, ki so sposobne tvoriti interakcije z Arg76 ali Arg136. Predpostavljamo, da so kisle skupine, kot je npr. COOH skupina, pomembne za tvorbo ionske vezi z Arg136, kar bomo preverili s primerjavo aktivnosti spojin s prostimi karboksilnimi kislinami ($R^2 = \text{COOH}$), njihovimi metilnimi estri ($R^2 = \text{COOCH}_3$) in hidrazidi ($R^2 = \text{CONHNH}_2$). Pripravili bomo tudi spojine razredov B in C v katerih bomo COOH skupino bioizosterno zamenjali z oksadiazolonskim obročem. Pri razredih B in C bomo ugotavljali tudi razliko v aktivnosti spojin, ki bodo na mestu R^1 vsebovale manjšo metilno skupino ($R^1 = \text{CH}_3$) in spojini s sterično večjo benzilno skupino ($R^1 = \text{Bn}$). Z namenom izboljšanja vodotopnosti in povečanja spektra protibakterijskega delovanja bomo pri spojinah iz razreda C na *orto* mesto (R^3) uvedli substituent z bazičnim centrom. Z 1,4-benzoksazin-3-onskimi derivati (razred D) bomo preučili morebiten vpliv rigidizacije osrednjega dela spojin na njihovo delovanje. Predvidevamo tudi, da lahko pride pri spojinah razreda D s prosto karboksilno kislino do tvorbe intramolekularne vodikove vezi med COOH skupino in karbonilno skupino 1,4-benzoksazin-3-onskega skeleta, zaradi česar bi lahko dosegli boljšo penetracijo spojin v bakterijsko celico.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. REAGENTI IN TOPILA

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

3.2. MERJENJE TEMPERATURE TALIŠČA

Tališča spojin smo določili na mikroskopu Cambridge instruments z ogrevalno mizico Reichert in so nekorrigirana.

3.3. KROMATOGRAFSKE METODE

Tankoplastna kromatografija (TLC): uporabljali smo plošče Merck Kieselgel 60 F₂₅₄ z 0.20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescentnim indikatorjem fluoresceinom. Za razvijanje plošč smo uporabljali zmesi metanola in diklorometana ali etil acetata in petroletra v različnih razmerjih. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko z valovno dolžino 254 nm in orositveni reagent ninhidrin.

Kolonska kromatografija: za izvedbo kolonske kromatografije smo kot stacionarno fazo uporabili silikagel proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm. Kot mobilno fazo smo uporabljali zmesi etil acetata in petroletra ali diklorometana in metanola v različnih razmerjih. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko z valovno dolžino 254 nm in orositveni reagent ninhidrin.

Reverzno fazna »flash« kromatografija: Čiščenje spojine **39** smo izvedli na Biotage Isolera One System sistemu. Uporabili smo kolono Biotage SNAP Cartridge KP-C18-HS 12 g. Kot mobilno fazo smo uporabili mešanico 0,1% trifluoroocetne kisline v destilirani vodi in acetonitrila (15%-60% acetonitrila v 0,1% TFA). Spojino smo detektirali pri valovni dolžini 254 nm.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC): HPLC-analize smo izvedli na instrumentu Agilent Technologies HP 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B, za spojino **39** pa na instrumentu Thermo Scientific Dionex Ultimate 3000 HPLC/UHPLC. Spojine smo detektirali pri 220, 254 in 280 nm. Uporabili smo kolono Agilent Eclipse Plus C18 (5 µm, 4,6 mm × 150 mm). Kot mobilno fazo smo uporabili zmes 0,1% trifluoroocetne kisline v

ultračisti vodi (A) in acetonitrila (B) (30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, do 20 min pri 90% acetonitrila), za spojino **13** pa zmes 0,1% trifluoroocetne kisline v ultračisti vodi (A) in metanola (B) (60-90% metanola v 0,1% TFA v 16 min, do 20 min pri 90% metanola). Pretok mobilne faze je bil 1,0 mL/min, volumen injiciranja pa 10 µL. Ultračista voda je bila pridobljena s sistemom Milipore Advantage A10.

3.4. SPEKTROSKOPSKE METODE

Jedrska magnetna resonanca (NMR): ^1H NMR in ^{13}C NMR spektre smo posneli na spektrometru Bruker Avance III 400 pri 400 MHz (^1H NMR) oz. 100 MHz (^{13}C NMR) ali na spektrometru Bruker Avance DPX₃₀₀ pri 300 MHz (^1H NMR). Kot interni standard smo uporabili TMS, za topilo pa DMSO- d_6 ali CDCl_3 , pri spojini **38** pa acetone- d_6 . Kemijske premike (δ) smo podali v enotah »parts per million« (ppm). Spektre smo analizirali s pomočjo programov MestReC 4.8.6.0 in MestReNova 11.0 proizvajalca Mestrelab Research S. L.

Infrardeča spektroskopija (IR): IR spektre smo posneli na spektrofotometru Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR z uporabo tehnike oslabiljene popolne odbojnosti (*angl.* attenuated total reflectance, ATR). Spektre smo analizirali s programom Omnic E.S.P. 5.2.

Masna spektrometrija (MS): Masne spektre in HR-MS (masna spektrometrija visoke ločljivosti) analize so opravili na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani, na spektrometru Q-TOF Premier z ESI tehniko. Masne spektre nekaterih spojin je opravila ga. Damijana Zalar na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, na spektrometru Advion expression CMSL z ESI tehniko.

3.5. POLARIMETRIJA

Optično rotacijo spojin smo izmerili na polarimetru Perkin-Elmer 241 MC. Specifična rotacija je podana kot povprečna vrednost desetih zaporednih meritev z integracijskim časom 5 s.

3.6. IUPAC NOMENKLATURA IN RISANJE SPOJIN

Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 15.0 proizvajalca CambridgeSoft.

3.7. SIDRANJE SPOJIN V AKTIVNO MESTO DNA-GIRAZE B

Priprava proteinov in ligandov: Sidranje spojin v ATP-vezavno 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 15.0.

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 100 neodvisnih ponovitvah. Uporabili smo parametre GA, ki jih je predlagal program GOLD 5.2. Uporabili smo cenilno funkcijo GOLDScore. Najboljših dvajset 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).

3.8. ENCIMSKI TESTI IN DOLOČANJE VREDNOSTI IC₅₀

Encimske teste je opravila Michaela Barančoková na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Spojinam smo določili rezidualno aktivnost (RA), to je razmerje med aktivnostjo encima ob dodatku zaviralca in v njegovi odsotnosti pri različnih koncentracijah zaviralca (10 µM, 1 µM, 0,1 µM), bolj aktivnim spojinam pa tudi srednjo zaviralno koncentracijo (IC₅₀), to je koncentracija zaviralca, ki povzroči 50% zaviranje encimske aktivnosti. Vsem spojinam smo določili aktivnost na encimu DNA-giraza iz bakterije *E. coli*, aktivnejšim spojinam pa tudi aktivnost na encimu DNA-giraza iz bakterije *S. aureus* in na encimih topoizomeraze IV iz bakterij *E. coli* in *S. aureus*. Za testiranje smo uporabili mikrotitrne plošče prekrte s streptavidinom in testni komplet proizvajalca Inspiralis. Vrednosti IC₅₀ smo izračunali s programom GraphPad Prism. Kot interni standard smo uporabili novobiocin (IC₅₀ = 0,168 µM za *E. coli* girazo, 0,041 µM za *S. aureus* girazo, 11 µM za *E. coli* topo IV in 27 µM za *S. aureus* topo IV) (18).

3.9. DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI

Spojinam, ki so izkazovale dobro aktivnost na encimih, je bila določena tudi protibakterijska aktivnost. Protibakterijske teste so opravili na Univerzi v Helsinkih na Finskem.

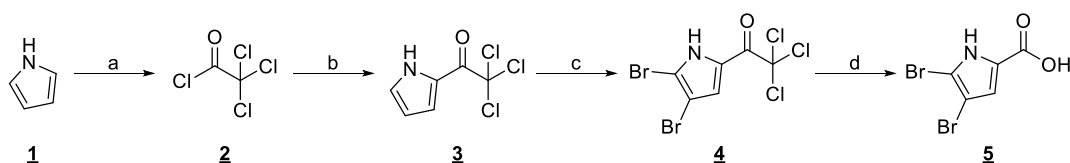
Za testiranje so uporabili klinično nadzorovane seve *Enterococcus faecalis* (Gram-pozitiven, ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitiven, ATCC 25923), *Escherichia coli* (Gram-negativna, ATCC 25922; 3 sevi: wt, $\Delta tolC$, $\Delta lpxC$) in *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativna, ATCC 27853). Bakterijske seve so gojili na agarju Mueller Hinton II (MHA, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) in na tekočem gojišču Mueller Hinton II (MHB, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Teste so izvedli z metodo mikrodilucije bujona v skladu s smernicami CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) in EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Protibakterijsko aktivnost so izmerili s primerjavo absorbanc vzorcev (po 0, 8 in 24 h) in kontrol pri 620 nm, izražena pa je v odstotkih zaviranja rasti. Spojine so testirali pri koncentraciji 50 μ M. Najbolj aktivnim spojinam so bile določene tudi minimalne zaviralne koncentracije (MIK vrednosti). Kot pozitivno kontrolo so na vsaki testni plošči uporabili referenčni antibiotik ciprofloksacin. MIK₅₀ vrednost ciprofloksacina za *E.coli* je < 0,015 μ g/mL, MIK₉₀ za *E.coli* je 0,016 μ g/mL (oz. 0,05 μ M), za *S. aureus* 0,5 μ g/mL (oz. 1,51 μ M), za *E. faecalis* 1 μ g/mL (oz. 3,02 μ M) in za *P. aeruginosa* 1 μ g/mL (oz. 3,02 μ M) (18, 19).

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. REAKCIJSKE SCHEME

Na shemi 1 je predstavljena sinteza 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline (**5**). V prvi stopnji smo na pirol (**1**) v prisotnosti trietilamina pripeli trikloroacetilklorid (**2**). Dobili smo spojino **3**, ki smo jo v naslednji stopnji bromirali z uporabo broma in tako pripravili spojino **4**. Trikloroacetilno skupino spojine **4** smo v tretji stopnji z 2 M NaOH hidrolizirali do proste karboksilne kisline in po nakisanju dobili spojino **5**.

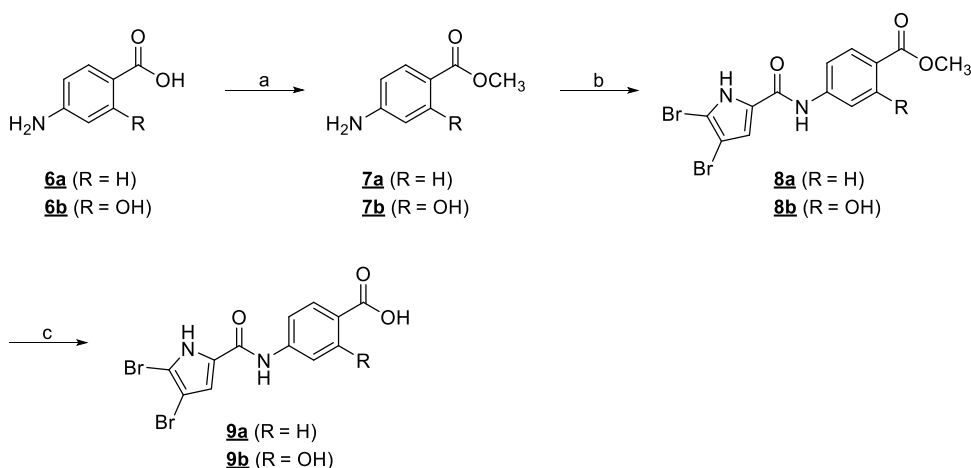
Shema 1. Sinteza 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline.



Reagenti in pogoji: (a) pirol, Et₃N, THF, 0 °C, nato sobna T, 15 h; (b) Br₂, CHCl₃, 0 °C, nato sobna T, 15 h; (c) 2 M NaOH, THF, sobna T, 15 h.

Shema 2 prikazuje sintezo spojin **9a-b**. Najprej smo v kislih pogojih, z uporabo tionil klorida iz 4-aminosalicilne kisline oz. 4-aminobenzojske kisline (**6a-b**) pripravili njuna metilna estra **7a-b**. V prisotnosti piridina smo na spojini **7a-b** pripeli 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino (**5**), ki smo jo predhodno aktivirali v obliki kislinskega klorida z oksalil kloridom. Na ta način smo dobili spojini **8a-b**, ki smo jima v zadnji stopnji z uporabo 1 M NaOH odstranili metilni estrski skupini in po nakisanju dobili produkta **9a-b**.

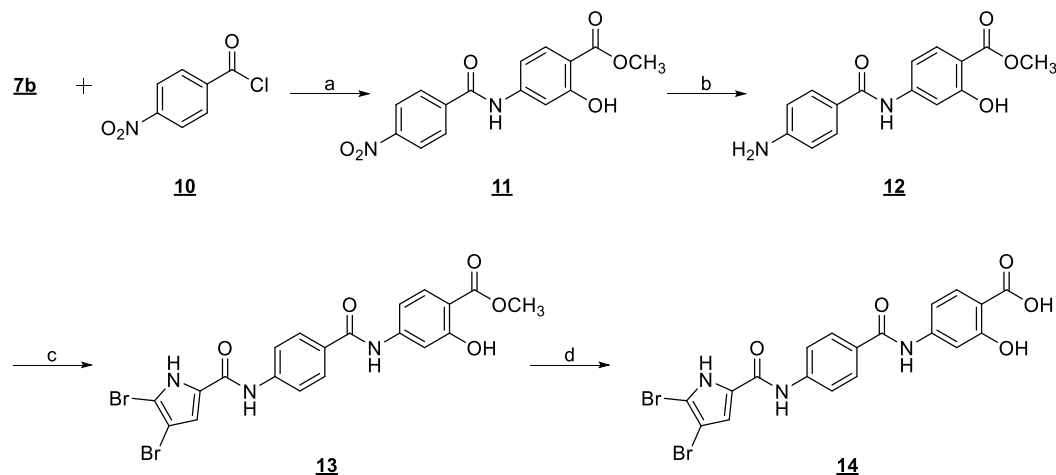
Shema 2. Sinteza spojin razreda A **9a-b**.



Reagenti in pogoji: (a) SOCl₂, MeOH, 0 °C, nato 70 °C, 15-30 h (b) i) **5**, oksalil klorid, CH₂Cl₂, sobna T, 15 h, nato ii) **7a-b**, piridin, CH₂Cl₂, sobna T, 5 h (za sintezo spojine **8a**) ali 72 h (za sintezo spojine **8b**); (c) 1 M NaOH, MeOH/THF, sobna T ali 60 °C, 5-15 h.

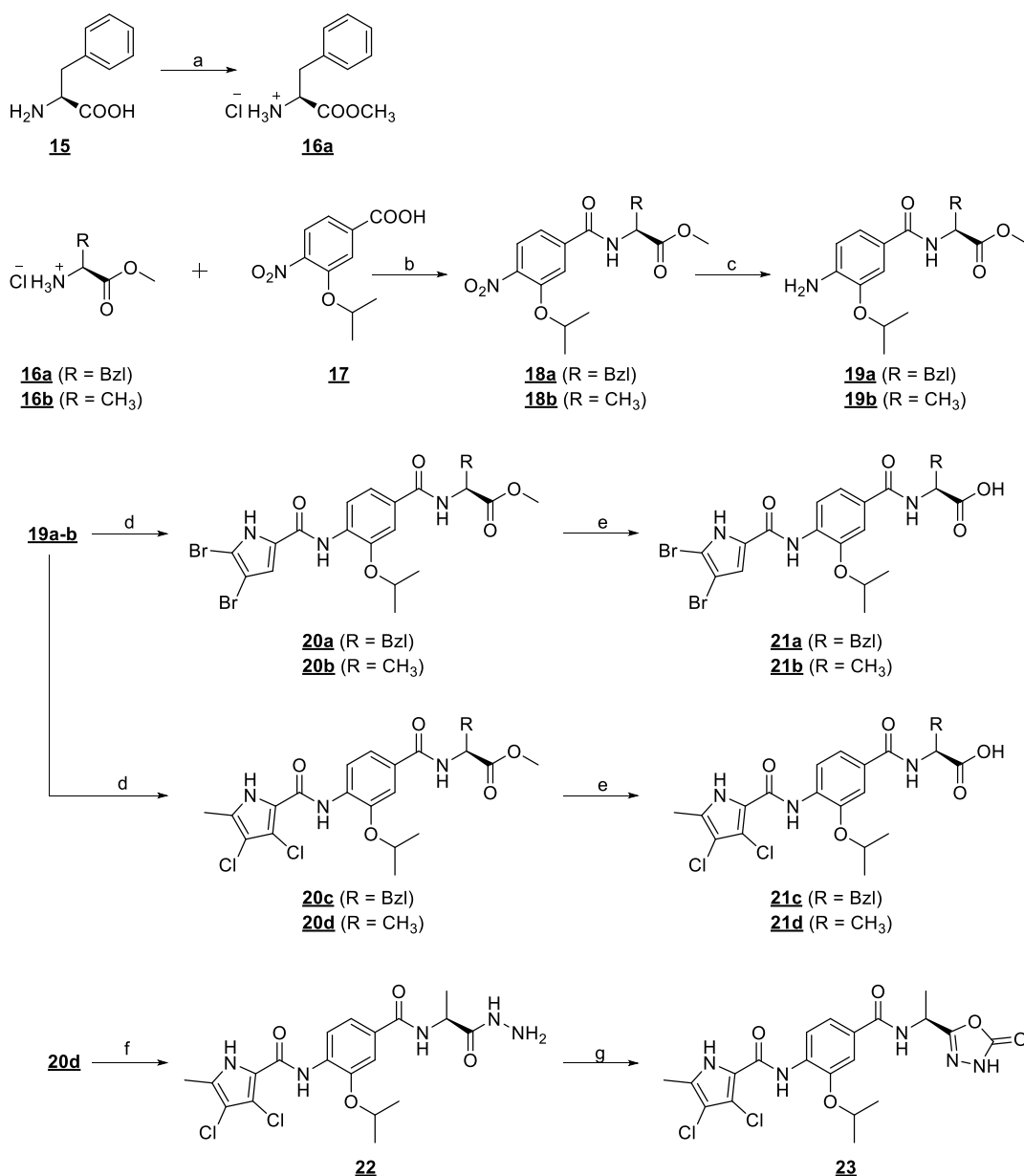
Na shemi 3 je prikazana sinteza spojine **14**. Spojini **7b** smo v bazičnih pogojih najprej pripeli 4-nitrobenzoil klorid (**10**) in tako pripravili amid **11**, ki smo ga v naslednji stopnji s katalitskim hidrogeniranjem po redukciji nitro skupine v amin pretvorili v spojino **12**. Na spojino **12** smo nato pripeli z oksalil kloridom pripravljen kislinski klorid spojine **5**. Tako pripravljenemu amidu **13** smo nato odstranili metilno estrsko skupino z uporabo vodne raztopine NaOH in po nakisanju prišli do končne spojine **14**.

Shema 3. Sinteza spojine razreda A **14**.



Reagenti in pogoji: (a) CH₂Cl₂, piridin, sobna T, 15 h; (b) H₂, Pd/C, MeOH/THF, sobna T, 3 h; (c) i) **5**, oksalil klorid, CH₂Cl₂, sobna T, 15 h, nato ii) **12**, piridin, CH₂Cl₂, sobna T, 72 h; (e) 1 M NaOH, MeOH/THF, sobna T, 15 h.

Sinteza spojin s 4-amino-3-izopropoksibenzamidnim centralnim delom (razred B) je predstavljena na shemi 4. Z uporabo tionil klorida v metanolu smo L-fenilalanin (**15**) najprej pretvorili v metilni ester L-fenilalanina (**16a**). S pomočjo sklopitvenega reagenta TBTU smo nato tvorili amidno vez med spojino **16a** oz. spojino **16b** (metilni ester L-alanina) in 3-izopropoksi-4-nitrobenzojsko kislino (**17**). Na ta način smo prišli do spojin **18a-b**, ki smo jima v naslednji stopnji s katalitskim hidrogeniranjem reducirali aromatski nitro skupini. Tako pridobljena amina **19a-b** smo preko amidne vezi pripeli na 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karbonil klorid oz. 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karbonil klorid, ki smo ju pripravili s pomočjo oksalil klorida iz spojin **5** oz. 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline. Na ta način smo dobili spojine **20a-b** in **20c-d**. Nato smo v bazičnih pogojih metilne estrske skupine spojin **20a-b** in **20c-d** hidrolizirali do prostih karboksilnih kislin in po nakisanju s klorovodikovo kislino dobili končne spojine **21a-b** in **21c-d**. Del spojine **20d** smo ob segrevanju na 65 °C v prisotnosti hidrazin monohidrata pretvorili v hidrazid **22**, nato pa smo iz hidrazidne skupine z 1,1'-karbonildiimidazolom (CDI) pripravili 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolni obroč in tako prišli do končne spojine **23**.

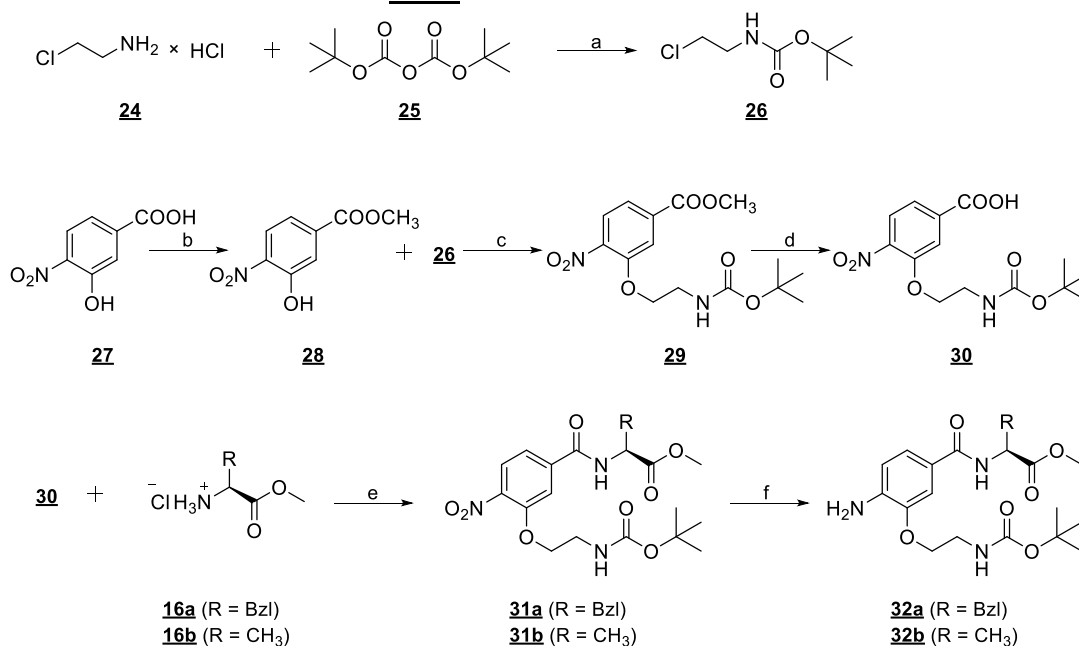
Shema 4. Sinteza spojin razreda B.

Reagenti in pogoji: (a) SOCl_2 , MeOH, 0 °C, nato sobna T, 15 h; (b) TBTU, NMM, CH_2Cl_2 , sobna T, 15 h; (c) H_2 , Pd/C, MeOH, sobna T, 3 h; (d) i) **5** (za sintezo spojin **20a-b**) ali 3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksilna kislina (za sintezo spojin **20c-d**), oksalil klorid, CH_2Cl_2 , sobna T, 15 h, nato ii) **19a-b**, piridin, CH_2Cl_2 , sobna T, 15 h; (e) 1 M NaOH, MeOH/THF, sobna T, 15 h; (f) hidrazin monohidrat, MeOH/THF, 65 °C, 15 h; (g) 1,1'-karbonildiimidazol, 1,4-dioksan/DMF, 101 °C, 15 h.

Shemi 5 in 6 predstavljata sintezo spojin s 4-amino-3-aminoetoksibenzamidnim centralnim delom (razred C). Z uporabo di-*terc*-butil dikarbonata (**25**) in trietilamina smo na aminsko skupino soli kloroetilamina s klorovodikovo kislino (**24**) uvedli Boc zaščitno skupino in tako dobili spojino **26**. Vzporedno smo iz 3-hidroksi-4-nitrobenzojske kisline (**27**) z uporabo tionil klorida v metanolu pripravili njen metilni ester (**28**), ki smo mu nato v bazičnih pogojih

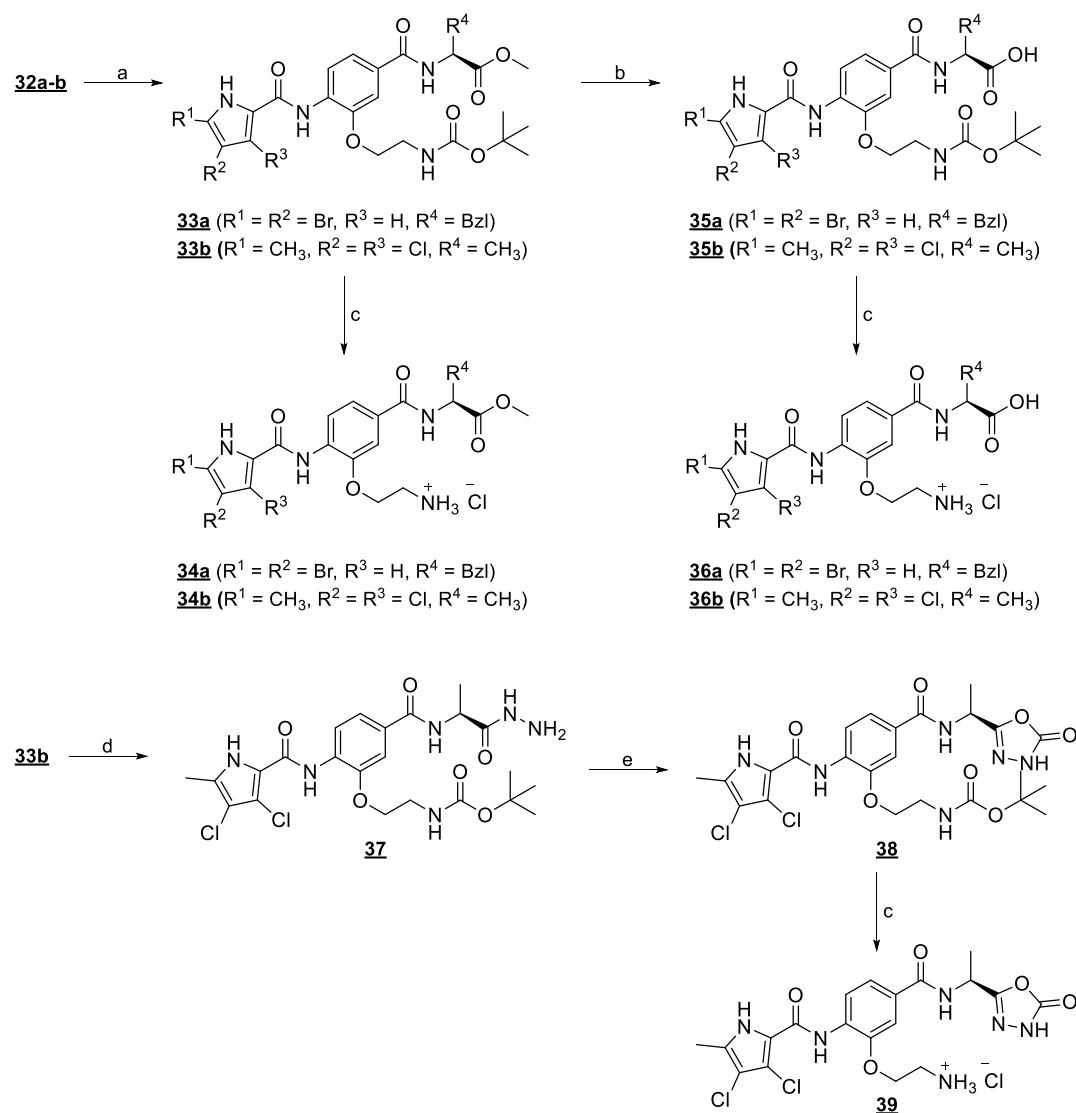
alikirali hidroksilno skupino z uporabo spojine **26** kot alkilirajočega reagenta. Tako pripravljeni spojini **29** smo z 1 M NaOH hidrolizirali metilno estrsko skupino do proste karboksilne kisline (**30**). Z uporabo TBTU smo preko amidne vezi na spojino **30** pripeli metilni ester L-Phe (**16a**) oz. metilni ester L-Ala (**16b**) in tako prišli do spojin **31a-b**, ki smo jima v naslednji stopnji nitro skupini zreducirali v amino skupino (**32a-b**). Na amino skupino spojine **32a** smo nato v prisotnosti piridina pripeli 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino (**5**), ki smo jo predhodno aktivirali z oksalil kloridom in tako dobili spojino **33a**. Spojino **33b** pa smo pripravili s tvorbo amidne vezi med amino skupino spojine **32b** in 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karbonil kloridom. Produkta **33a-b** smo nato uporabili v dveh različnih sinteznih poteh. Po prvi poti smo jima v kislih pogojih – 4 M HCl v dioksanu – odstranili Boc zaščitno skupino in tako dobili končni spojini **34a-b**, po drugi poti pa smo z 1 M NaOH najprej hidrolizirali metilni estrski skupini do nastanka produktov **35a-b** in nato tudi tema spojinama z uporabo 4 M HCl v dioksanu odstranili Boc zaščitni skupini ter pripravili končna produkta **36a-b**. Iz spojine **33b** smo v nadaljevanju z uporabo hidrazin monohidrata pripravili hidrazid **37**, tega pa smo v naslednji stopnji z reagentom CDI pretvorili do 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolnega obroča in tako dobili spojino **38**. V zadnji stopnji smo z acidolizo odstranili Boc zaščitno skupino in tako pripravili končno spojino **39**.

Shema 5. Sinteza intermediatov **32a-b.**



Reagenti in pogoji: (a) Et₃N, CH₃CN, sobna T, 15 h; (b) SOCl₂, MeOH, 0 °C, nato sobna T, 15 h; (c) K₂CO₃, KI, DMF, 60 °C, 48 h; (d) 1 M NaOH, MeOH, sobna T, 15 h; (e) TBTU, NMM, CH₂Cl₂, sobna T, 15 h; (f) H₂, Pd/C, MeOH, sobna T, 3 h.

Shema 6. Sinteza spojin razreda C.

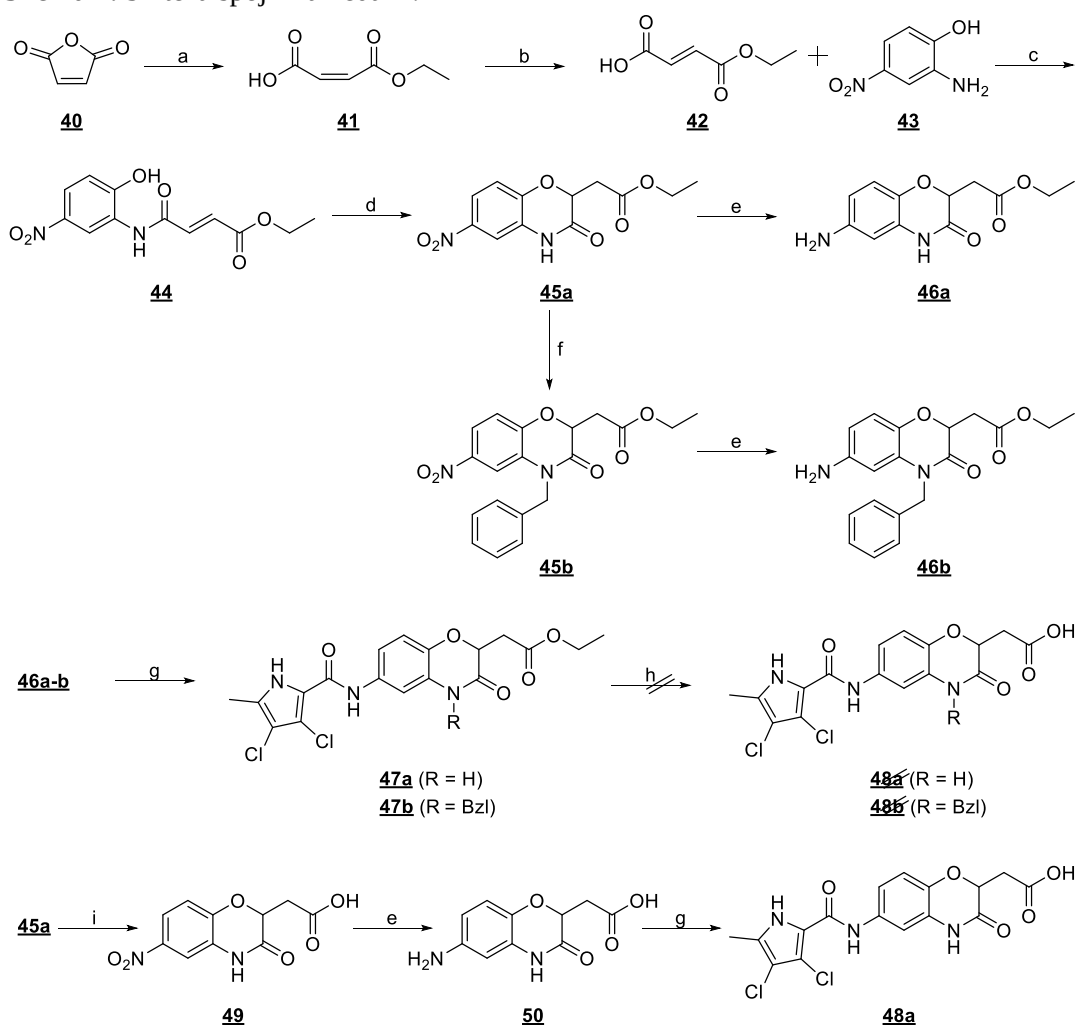


Reagenti in pogoji: (a) i) **5** (za sintezo spojine **33a**) ali 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilna kislina (za sintezo spojine **33b**), oksalil klorid, CH₂Cl₂, sobna T, 15 h, nato ii) **32a-b**, piridin, CH₂Cl₂, sobna T, 15 h; (b) 1 M NaOH, MeOH/THF, sobna T, 15 h; (c) 4 HCl v 1,4-dioksanu, THF, sobna T, 2-5 h; (d) hidrazin monohidrat, MeOH/THF, 65 °C, 15 h, nato sobna T, 72 h; (e) 1,1'-karbonildiimidazol, 1,4-dioksan/DMF, 101 °C, 15 h.

Na shemi 7 je prikazana sinteza spojin razreda D z 1,4-benzoksazin-3-onskim centralnim skeletom (**47a-b**, **48a**). Najprej smo z uporabo natrijevega karbonata v etanolu anhidrid maleinske kisline (**40**) pretvorili v monoetilni ester maleinske kisline (**41**), tega pa smo s segrevanjem v prisotnosti AlCl_3 izomerizirali do monoetilnega estra fumarne kisline (**42**). Z oksalil kloridom smo pripravili kislinski klorid spojine **42**, ki smo ga nato v naslednji stopnji uporabili za tvorbo amidne vezi z 2-amino-4-nitrofenolom (**43**) v prisotnosti NaHCO_3 kot baze. Produkt **44** smo s segrevanjem v etanolu ob uporabi trietilamina ciklizirali do spojine **45a**, ki smo mu nato obročno amidno skupino s pomočjo kalijevega fluorida substituirali z

benzil bromidom in na ta način prišli do spojine **45b**. Nitro skupini spojin **45a-b** smo v naslednji stopnji s katalitskim hidrogeniranjem zreducirali v amino skupini in prišli do spojin **46a-b**. Tako pripravljena nukleofila smo z amidno vezjo pripeli na 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karbonil klorid in dobili spojini **47a-b**. Do končnih karboksilnih kislin **48a** in **48b** smo iz spojin **47a-b** poskušali priti na več različnih načinov, ki so se izkazali za neuspešne (glej poglavje 5.1.6). Za pripravo spojine **48a** smo zato najprej hidrolizirali etilno estrsko skupino spojine **45a** in pripravili spojino **49**. Z redukcijo nitro skupine smo prišli do spojine **50**, nato pa smo to spojino preko amidne vezi pripeli na 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino in prišli do končnega produkta **48a**.

Shema 7. Sinteza spojin razreda D.



Reagenti in pogoji: (a) Na₂CO₃, EtOH, sobna T, 50 min; (b) AlCl₃, 80 °C, 4 h; (c) i) **42**, oksalil klorid, CH₂Cl₂, DMF, sobna T, 3 h, nato ii) **43**, NaHCO₃, 1,4-dioksan, sobna T, 15 h; (d) Et₃N, abs. EtOH, 75 °C, 15 h; (e) H₂, Pd/C, EtOH/THF, sobna T, 3 h; (f) benzil bromid, KF, DMF, sobna T, 15 min, nato **45a**, 60 °C, 15 h; (g) i) 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilna kislina, oksalil klorid, CH₂Cl₂, sobna T, 15 h, nato ii) **46a-b** ali **50**, piridin, CH₂Cl₂, sobna T, 15 h; (h) 1 M NaOH ali K₂CO₃ ali 1 M HCl ali konc. HCl ali LiI ali lipaza (glej poglavje 5.1.6); (i) 2 M NaOH, EtOH, sobna T, 5 min.

4.2. SPLOŠNI SINTEZNI POSTOPKI IN ANALIZNI PODATKI

2,2,2-Trikloro-1-(1*H*-pirol-2-il)etan-1-on (3). V bučko odmerimo pirol (**1**, 7,75 mL, 110 mmol) in trietilamin (18,7 mL, 135 mmol), dodamo tetrahidrofuran (150 mL), ohladimo na 0 °C in preprihamo z argonom. Nato na ledeni kopeli dokapavamo trikloroacetilklorid (**2**, 18,8 mL, 168 mmol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni T. Reakcijo ustavimo z dodatkom NaHCO₃ (10 mL) in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Preostanek raztopimo v etil acetatu (100 mL), organsko fazo spiramo z nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 × 30 mL) in nasičeno raztopino NaCl (3 × 30 mL), sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Produkt očistimo s kristalizacijo iz heksana. Izkoristek reakcije: 49 %; sivo črni kristali (11,4 g); tališče 72-74 °C; Rf (etil acetat/petroleter = 1/4): 0,33; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6,40-6,43 (m, 1H, Pyrr-CH-4), 7,19-7,21 (m, 1H, Pyrr-CH-3), 7,40-7,42 (m, 1H, Pyrr-CH-5), 9,51 (s, 1H, NH); IR (ATR) ν = 3315, 3145, 1650, 1535, 1423, 1383, 1264, 1136, 1036, 932, 807, 686 cm⁻¹.

2,2,2-Trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etan-1-on (4). (23) Spojino **3** (11,1 g, 52,5 mmol) suspendiramo v kloroformu (300 mL), preprihamo z argonom, ohladimo na 0 °C in na ledeni kopeli dokapavamo brom (5,90 mL, 115 mmol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni T. Potek reakcije spremljamo s pomočjo tankoplastne kromatografije in dodamo še 3 mL broma. Mešamo 4 ure pri sobni T in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Preostanku dodamo vodo (200 mL), vodno fazo ekstrahiramo z diklorometanom (3 × 75 mL) in nato združene organske faze spiramo z nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 × 75 mL) in nasičeno raztopino NaCl (3 × 75 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Produkt očistimo s kristalizacijo iz heksana. Izkoristek reakcije: 75 %; sivo rjavi kristali (14,5 g); Rf (etil acetat/petroleter = 1/4): 0,52; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7,36 (d, 1H, ⁴J = 2,8 Hz, Pyrr-CH), 9,61 (s, 1H, NH); IR (ATR) ν = 3282, 3134, 2964, 1654, 1530, 1402, 1364, 1223, 1160, 1134, 982, 838, 683 cm⁻¹.

4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilna kislina (5). (23) Spojino **4** (14,4 g, 38,9 mmol) raztopimo v tetrahidrofuranu (300 mL), dodamo 2 M NaOH (97 mL, 195 mmol) in mešamo čez noč pri sobni T. Reakcijski zmesi uparimo topilo pod znižanim tlakom in preostanek nakisamo z 1 M HCl do pH 1. Dodamo etil acetat (300 mL), organsko fazo spiramo z vodo (3 × 75 mL) in nasičeno raztopino NaCl (3 × 75 mL), sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije: 86 %; rjavi kristali (9,01 g); Rf (diklorometan/metanol/ocetna kislina = 10/1/0,01): 0,39; ¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆) δ

6,83 (d, 1H, $^4J = 2,7$ Hz, Pyrr-CH), 12,81 (br s, 1H, COOH), 12,95 (s, 1H, NH); IR (ATR) $\nu = 3383, 3125, 2970, 2895, 2699, 2576, 1658, 1542, 1428, 1359, 1204, 1177, 983, 842, 769, 612$ cm $^{-1}$.

Metil 4-aminobenzoat (7a). 4-Aminobenzojsko kislino (**6a**, 5,00 g, 36,5 mmol) raztopimo v metanolu (150 mL), ohladimo na 0 °C in na ledeni kopeli počasi dokapavamo tionil klorid (7,90 ml, 109 mmol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri 70 °C. Topilo in tionil klorid uparimo pod znižanim tlakom. Surov preostanek raztopimo v etil acetatu (120 mL) in vodi (40 mL). Organsko fazo spiramo z nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 × 40 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 × 40 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, odfiltriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije: 89 %; sivo beli kristali (4,88 g); tališče: 106-107 °C (107-109 °C, lit. (24)); R_f (diklorometan/metanol/NH₃ = 9/1): 0,65; ^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3,88 (s, 3H, CH₃), 4,08 (s, 2H, NH₂), 6,66 (d, 2H, $^3J = 8,8$ Hz, Ar-H-3,5), 7,87 (d, 2H, $^3J = 8,8$ Hz, Ar-H-2,6); IR (ATR) $\nu = 3464, 3368, 3248, 2952, 1677, 1592, 1520, 1434, 1313, 1248, 1166, 1075, 964, 835, 769, 698$ cm $^{-1}$.

Metil 4-amino-2-hidroksibenzoat (7b). 4-Aminosalicilno kislino (**6b**, 5,00 g, 32,6 mmol) raztopimo v metanolu (130 mL), ohladimo na 0 °C in na ledeni kopeli počasi dokapavamo tionil klorid (4,70 mL, 64,8 mmol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri 70 °C. Potek reakcije spremljamo s TLC, dodamo 10 mL THF in na ledeni kopeli dokapavamo dodaten tionil klorid (4,70 mL, 64,8 mmol). Mešamo čez noč pri 82 °C. Del topila uparimo pod znižanim tlakom in z 1 M NaOH (približno 80 mL) uravnamo pH na 12. Vodno fazo ekstrahiramo z etil acetatom (3 × 100 mL) in združene organske faze spiramo z nasičeno raztopino NaCl (3 × 100 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, odfiltriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt čistimo s kristalizacijo iz vode (150 mL). Izkoristek reakcije: 26 %; rožnati kristali (1,43 g); tališče: 120-121 °C (121 °C, lit. (25)); R_f (etil acetat/petroleter = 2/1): 0,71; ^1H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3,79 (s, 3H, CH₃), 5,99 (d, 1H, $^4J = 2,0$ Hz, Ar-H-3), 6,11-6,15 (m, 3H, Ar-H-5, NH₂), 7,45 (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, Ar-H-6), 10,77 (s, 1H, OH); IR (ATR) $\nu = 3472, 3378, 3247, 2953, 2717, 1620, 1514, 1434, 1353, 1279, 1188, 1108, 954, 842, 774, 621$ cm $^{-1}$.

Splošni postopek A. Sinteza spojin 8a-b, 13, 20a-d, 33a-b, 47a-b in 48a (spojino 8a smo podali kot primer). 4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino (**5**, 268 mg, 0,997 mmol) raztopimo v brezvodnem diklorometanu (9 mL), preprihomo z argonom in dodamo oksalil klorid (384 μ L, 4,48 mmol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni T. Topilo uparimo

pod znižanim tlakom in produkt posušimo na membranski črpalki. Dodamo metil 4-aminobenzoat (**7a**, 126 mg, 0,833 mmol), brezvodni diklorometan (9 mL) in brezvodni piridin (4,5 mL) in mešamo čez noč pri sobni T. Topilo uparimo pod znižanim tlakom, preostanku dodamo etil acetat (15 mL) in vodo (10 mL) in stresamo. Neraztopljeni del spojine odnučamo, fazi matičnice pa ločimo in organsko fazo spiramo z 1 M HCl (3 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 × 10 mL), sušimo z Na₂SO₄, odfiltriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom.

Metil 4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)benzoat (8a). Del spojine dobljen z odparevanjem organske faze po ekstrakciji in odnučani del spojine združimo ter čistimo s prelivanjem z metanolom (10 mL), nastalo suspenzijo stresamo na ultrazvoku, segrevamo do vrenja, oborino odnučamo, speremo z metanolom (2 × 5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije: 29 %; svetlo rjava trdna snov (96 mg); tališče: 230-233 °C, R_f (diklorometan/metanol = 10/1): 0,69; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3,84 (s, 3H, CH₃), 7,30 (d, 1H, ⁴J = 2,4 Hz, Pyr-CH), 7,88 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, Ar-H-3,5), 7,96 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, Ar-H-2,6), 10,14 (s, 1H, CONH), 13,01 (d, 1H, ⁴J = 2,0 Hz, Pyr-NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 51,89 (CH₃), 98,30, 106,68, 114,43, 119,10, 123,97, 127,50, 130,19, 143,36, 157,48, 165,80; IR (ATR) ν = 3395, 3240, 3113, 2949, 1697, 1591, 1516, 1409, 1273, 1219, 1174, 1106, 974, 857, 816, 750 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* = 398,9 ([M-H]⁻). HRMS za C₁₃H₉Br₂N₂O₃: izračunan 398,8980, izmerjen 398,8985; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm, 4,6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL; retencijski čas: 11,022 min (96,4 % pri 280 nm).

Splošni postopek B. Sinteza spojin 9a-b in 14 (spojino 9a podajamo kot primer). Spojino **8a** (70 mg, 0,174 mmol) raztopimo v metanolu (7 mL) in THF (2 mL), dodamo 1 M NaOH (0,696 mL, 0,696 mmol) in mešamo čez noč pri sobni T. Potek reakcije spremljamo s TLC, dodamo 1 M NaOH (0,696 mL, 0,696 mmol) in reakcijsko zmes mešamo 5 ur pri 60 °C. Topilo uparimo pod znižanim tlakom, bazično vodno fazo najprej speremo z etil acetatom (10 mL) nato pa nakisamo do pH = 1 z 1 M HCl. Vodno fazo ekstrahiramo z etil acetatom (3 × 15 mL), združene organske faze spiramo z vodo (3 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (10 mL), sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt (55 mg) čistimo s prelivanjem z dietil etrom (15 mL). Suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietil etrom (5 mL) in posušimo.

4-(4,5-Dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)benzojska kislina (9a). Izkoristek reakcije: 62 %; svetlo rjava trdna snov (42 mg); tališče: >300 °C; Rf (diklorometan/metanol/ocetna kislina = 10/1/0,01): 0,63; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,29 (d, 1H, ⁴J = 2,8 Hz, Pyrr-CH), 7,84 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, Ar-H-3,5), 7,93 (d, 2H, ³J = 8,8 Hz, Ar-H-2,6), 10,10 (s, 1H, CONH), 12,71 (s, 1H, COOH), 13,00 (d, 1H, ⁴J = 2,4 Hz, Pyrr-NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 98,28, 106,57, 114,35, 119,02, 125,19, 127,55, 130,30, 142,97, 157,47, 166,91; IR (ATR) ν = 3206, 3121, 3071, 2965, 2845, 2656, 2551, 1669, 1592, 1408, 1316, 1226, 1175, 1119, 975, 850, 768, 691 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* = 384,9 ([M-H]⁻). HRMS za C₁₂H₇Br₂N₂O₃: izračunan 384,8823, izmerjen 384,8827; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm, 4,6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL; retencijski čas: 8,485 min (96,1 % pri 280 nm).

Metil 2-hidroksi-4-(4-nitrobenzamido)benzoat (11). 4-Nitrobenzoil klorid (10, 550 mg, 2,96 mmol) in metil 4-amino-2-hidroksibenzoat (7b, 495 mg, 2,96 mmol) raztopimo v brezvodnem diklorometanu (20 mL) in piridinu (10 mL). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni T, pod argonovo atmosfero. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanku dodamo etil acetat (40 mL) in vodo (20 mL). Fazi ločimo, organsko fazo speremo z vodo (10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 × 15 mL) in nasičeno raztopino NaCl (3 × 10 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt čistimo s prelivanjem z dietil etrom (15 mL), suspenzijo stresamo na ultrazvoku, odnučamo in speremo z dietil etrom (2 × 5 mL). Izkoristek reakcije: 68 %; bela trdna snov (641 mg); tališče: 200-202 °C; Rf (diklorometan/metanol = 10/1): 0,78; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3,89 (s, 3H, CH₃), 7,36 (dd, 1H, ³J₁ = 8,8 Hz, ⁴J₂ = 2,0 Hz, Ar-H-5), 7,58 (d, 1H, ⁴J = 2,0 Hz, Ar-H-3), 7,81 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, Ar-H-6), 8,18 (d, 2H, ³J = 9,2 Hz, Ar-H-2',6'), 8,38 (d, 2H, ³J = 9,2 Hz, Ar-H-3',5'), 10,65 (s, 1H, CONH/OH), 10,80 (s, 1H, CONH/OH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 52,27 (CH₃), 107,36, 108,30, 111,43, 123,56, 129,37, 130,72, 140,10, 145,10, 149,28, 160,93, 164,63, 168,88; IR (ATR) ν = 3380, 3112, 2961, 1694, 1663, 1519, 1436, 1344, 1299, 1155, 1090, 954, 848, 710, 693 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* = 315,27 ([M-H]⁻).

Splošni postopek C. Sinteza spojin 12, 19a-b, 32a-b, 46a-b in 50 (spojino 12 smo podali kot primer). Spojino 11 (613 mg, 1,94 mmol) raztopimo v metanolu in tetrahidrofuranu

(1,5:1, 50 mL), prepihamo z argonom, dodamo Pd/C (200 mg) in mešamo pod vodikovo atmosfero pri sobni T 3 ure. Odfiltriramo paladij in uparimo topilo pod znižanim tlakom.

Metil 4-(4-aminobenzamido)-2-hidroksibenzoat (12). Surov produkt očistimo s prelivanjem z dietil etrom (20 mL), suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietil etrom (2×5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije: 83 %; bela trdna snov (458 mg); tališče: 207-210 °C; Rf (diklorometan/metanol = 10/1): 0,54; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,88 (s, 3H, CH₃), 5,87 (s, 2H, NH₂), 6,61 (d, 2H, $^3J = 8,8$ Hz, Ar-H-3',5'), 7,34 (dd, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz, Ar-H-5), 7,58 (d, 1H, $^4J = 2,0$ Hz, Ar-H-3), 7,71-7,75 (m, 3H, Ar-H-2',6', Ar-H-6), 10,02 (s, 1H, CONH/OH), 10,63 (s, 1H, CONH/OH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 52,16 (CH₃), 106,57, 106,80, 111,17, 112,48, 120,32, 129,66, 130,36, 146,51, 152,59, 161,15, 165,71, 169,18; IR (ATR) $\nu = 3417, 3362, 3323, 3215, 3101, 2961, 2858, 1660, 1505, 1439, 1348, 1238, 1195, 1148, 1076, 956, 834, 722, 660\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 285,26$ ([M-H]⁻).

Splošni postopek D. Sinteza spojin 16a in 28 (spojino 16a smo podali kot primer). L-Fenilalanin (15, 2,45 g, 14,8 mmol) suspendiramo v metanolu (40 mL), ohladimo na 0 °C in na ledeni kopeli počasi dokapavamo tionil klorid (SOCl₂, 1,60 mL, 22,3 mmol) in mešamo čez noč pri sobni T. Reakcijski zmesi uparimo topilo in tionil klorid. Surov produkt čistimo s prelivanjem z dietil etrom (20 mL), suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietil etrom (2×10 mL) in posušimo.

((S)-1-Metoksi-1-okso-3-fenilpropan-2-aminijev klorid) (16a). Izkoristek reakcije: 98 %; beli kristali (3,13 g); tališče: 158-161 °C (159-160 °C, lit. (26)), Rf (diklorometan/metanol/NH₃ = 9/1): 0,78; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,08-3,23 (m, 2H, CH₂), 3,66 (s, 3H, CH₃), 4,26 (t, 1H, $^3J = 6,0$ Hz, CH), 7,24-7,34 (m, 5H, 5 x Ar-H), 8,72 (s, 3H, NH₃⁺); IR (ATR) $\nu = 3369, 2837, 2619, 2480, 1743, 1584, 1494, 1399, 1239, 1146, 1084, 934, 810, 742, 701\text{ cm}^{-1}$.

Splošni postopek E. Sinteza spojin 18a-b, 31a-b (spojino 18a smo podali kot primer). 3-Izopropoksi-4-nitrobenzojsko kislino (17, 882 mg, 3,92 mmol) in TBTU (1,64 g, 5,09 mmol) suspendiramo v diklorometanu (110 mL), dodamo N-metilmorfolin (1,30 mL, 11,8 mmol) in mešamo pri sobni T 30 minut. Dodamo metilni ester L-fenilalanina (16a, 1,014 g, 4,70 mmol) in mešamo čez noč pri sobni T. Reakcijski zmesi uparimo topilo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etil acetatu (100 mL) in vodi (30 mL). Organsko fazo

spiramo z nasičeno raztopino NaHCO_3 (3×30 mL) in nasičeno raztopino NaCl (3×30 mL). Sušimo z Na_2SO_4 , filtriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom.

Metil (3-izpropoksi-4-nitrobenzoil)-L-fenilalaninat (18a). Produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: etil acetat/petroleter = 1/4 do 1/2). Izkoristek reakcije: 82 %; rumeni kristali (1,24 g); tališče: 97-99 °C; Rf (etil acetat/petroleter = 1/2): 0,39; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -79,4 (c 0,772, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1,30-1,33 (m, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,08 (dd, 1H, $^2J = 13,6$ Hz, $^3J = 10,4$ Hz, H_A iz CH_2), 3,21 (dd, 1H, $^2J = 13,6$ Hz, $^3J = 5,2$ Hz, H_B iz CH_2), 3,66 (s, 3H, COOCH_3), 4,67-4,73 (m, 1H, NHCH), 4,87 (spt, 1H, $^3J = 6,0$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 7,18-7,32 (m, 5H, $5 \times \text{Ar-H}$), 7,46 (dd, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 1,6$ Hz, Ar-H-6'), 7,59 (d, 1H, $^4J = 1,2$ Hz, Ar-H-2'), 7,91 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, Ar-H-5'), 9,13 (d, 1H, $J = 8,0$ Hz, NHCH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 21,44 (CH_3), 21,57 (CH_3), 36,23 (CH_2), 52,07 (CH_3), 54,33 (CH), 72,39 (CH), 114,91, 119,36, 124,80, 126,57, 128,24, 129,09, 137,41, 138,17, 142,17, 149,63, 164,67, 171,84; IR (ATR) $\nu = 3372, 3054, 2975, 2874, 1701, 1607, 1518, 1441, 1360, 1240, 1174, 1105, 1089, 988, 879, 841, 746, 694$ cm^{-1} ; MS (ESI) $m/z = 385,29$ ($[\text{M-H}]^-$).

Splošni postopek F. Sinteza spojin 21a-d in 30 (spojino 21c podajamo kot primer). Spojino 20c (70 mg, 0,131 mmol) raztopimo v mešanici metanola in THF (2:1, 15 mL), dodamo 1 M NaOH (0,530 mL, 0,530 mmol) in mešamo čez noč pri sobni T. Topilo uparimo pod znižanim tlakom, preostanek nakisamo do pH 1 z 1 M HCl (5 mL) in vodno fazo ekstrahiramo z etil acetatom (3×10 mL). Organsko fazo spiramo z vodo (3×10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (10 mL), sušimo z Na_2SO_4 , prefiltriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt čistimo s prelivanjem z dietil etrom (15 mL). Suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo in speremo z dietil etrom (2×5 mL).

(4-(3,4-Dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-3-izopropoksibenzoil)-L-fenilalanin (21c). Delamo po splošnem postopku F. Izkoristek reakcije: 89 %; bela trdna snov (61 mg); tališče: 235-238 °C, Rf (diklorometan/metanol/ocetna kislina = 20/1/0,01): 0,19; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ -46,2 (c 0,233, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1,35-1,39 (m, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 2,24 (s, 3H, Pyrr- CH_3), 3,07 (dd, 1H, $^2J = 13,6$ Hz, $^3J = 10,8$ Hz, H_A iz CH_2), 3,21 (dd, 1H, $^2J = 13,6$ Hz, $^3J = 4,4$ Hz H_B iz CH_2), 4,58-4,64 (m, 1H, CONHCH), 4,84 (spt, 1H, $^3J = 6,0$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 7,17-7,35 (m, 5H, $5 \times \text{Ar-H}$), 7,45-7,50 (m, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 8,44 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, Ar-H-5'), 8,66 (d, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, CONHCH), 9,23 (s, 1H, CONHAr), 12,46 (s, 1H, Pyrr-NH), 12,81 (s, 1H, COOH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 10,75

(Pyrr-CH₃), 21,65 (CH(C₂H₅)₂), 21,85 (CH(C₂H₅)₂), 36,37 (CH₂), 54,22 (CH), 71,23 (CH(CH₃)₂), 108,58, 109,71, 111,55, 117,96, 118,64, 120,32, 126,35, 128,15, 128,72, 129,09, 129,77, 130,99, 138,13, 145,08, 156,19, 165,57, 173,25; IR (ATR) ν = 3365, 3257, 2979, 1717, 1645, 1525, 1415, 1319, 1261, 1126, 985, 830, 698 cm⁻¹; MS (ESI) m/z = 516,1 ([M-H]⁻). HRMS za C₂₅H₂₄Cl₂N₃O₅: izračunan 516,1093, izmerjen 516,1097; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μ m, 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μ L; retencijski čas: 14,434 min (98,5 % pri 280 nm).

Splošni postopek G. Sinteza spojin 22 in 37 (spojino 22 smo podali kot primer). Spojino 20d (180 mg, 0,395 mmol) raztopimo v mešanici brezvodnega metanola in brezvodnega THF (3:1, 16 mL). Dodamo hidrazin monohidrat (240 μ L, 3,95 mmol) in mešamo čez noč pri 65 °C. Nastalo suspenzijo ohladimo na ledu, oborino odnučamo in posušimo.

(S)-3,4-Dikloro-N-(4-((1-hidrazinil-1-oksopropan-2-il)karbamoil)-2-izopropoksifenil)-5-metil-1H-pirol-2-karboksamid (22). Izkoristek reakcije: 58 %; bela trdna snov (104 mg); tališče: 235-237 °C; R_f (diklorometan/metanol = 10/1): 0,48; $[\alpha]_D^{25}$ 87,9 (c 0,220, DMF); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,32-1,38 (m, 9H, CH₃, CH(CH₃)₂), 2,24 (s, 3H, Pyrr-CH₃), 4,23 (s, 2H, NH₂), 4,47 (quint, 1H, ³J = 7,2 Hz, CONHCH), 4,88 (spt, 1H, ³J = 6,0 Hz, CH(CH₃)₂), 7,56 (dd, 1H, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, Ar-H-6), 7,64 (d, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, Ar-H-2), 8,44-8,48 (m, 2H, Ar-H-5, CONHCH), 9,18 (s, 1H, NHNH₂), 9,25 (s, 1H, CONHAr), 12,45 (s, 1H, Pyrr-NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,75 (Pyrr-CH₃), 18,16 (CH₃), 21,78 (CH(C₂H₅)₂), 21,84 (CH(C₂H₅)₂), 47,67 (CH), 71,28 (CH(CH₃)₂), 108,58, 109,67, 111,89, 117,87, 118,66, 120,65, 128,92, 129,75, 131,01, 145,05, 156,19, 165,22, 171,77; IR (ATR) ν = 3397, 3365, 3310, 3252, 3134, 2984, 2940, 1733, 1648, 1518, 1441, 1324, 1261, 1173, 1042, 990, 831, 747, 702 cm⁻¹; MS (ESI) m/z = 454,1 ([M-H]⁻). HRMS za C₁₉H₂₂Cl₂N₅O₄: izračunan 454,1049, izmerjen 454,1041; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μ m, 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μ L; retencijski čas: 9,111 min (95,8 % pri 254 nm).

Splošni postopek H. Sinteza spojin 23 in 38 (spojino 23 smo podali kot primer). Spojino 22 (83 mg, 0,172 mmol) raztopimo v mešanici 1,4-dioksana in brezvodnega DMF (2:1, 7,5 mL), dodamo 1,1'-karbonildiimidazol (CDI, 55,8 mg, 0,344 mmol) ter mešamo čez noč pri

101 °C. Naslednji dan dodamo še 0,5 ekvivalenta 1,1'-karbonildiimidazola (14 mg, 0,0863 mmol), mešamo 1 uro pri 101 °C, nato pa uparimo topilo pod znižanim tlakom.

(S)-3,4-Dikloro-N-(2-izopropoksi-4-((1-(5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-il)etil)karbamoil)fenil)-5-metil-1H-pirol-2-karboksamid (23). Surov produkt čistimo s prelivanjem z acetonitrilom (10 mL), stresamo na ultrazvoku ter oborino odnučamo. Nato čistimo še s prelivanjem z vodo (10 mL), stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, prelijemo z vodo (2 × 5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije: 58 %; bež trdna snov (48 mg); tališče: 244-246 °C; R_f (diklorometan/metanol = 10/1): 0,35; [α]_D²⁵ 37,9 (c 0,463, DMF); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,36-1,37 (m, 6H, CH(CH₃)₂), 1,49 (d, 3H, ³J = 6,8 Hz, CH₃), 2,24 (s, 3H, Pyrr-CH₃), 4,86 (spt, 1H, ³J = 6,0 Hz, CH(CH₃)₂), 5,11 (quint, 1H, ³J = 7,2 Hz, Hz, CONHCH), 7,55-7,61 (m, 2H, 2 × Ar-H), 8,47 (d, 1H, ³J = 8,4 Hz, Ar-H-5), 8,88 (d, 1H, ³J = 7,6 Hz, CONHCH), 9,26 (s, 1H, CONHAr), 12,27 (br s, 1H, oksadiazol-NH/Pyrr-NH), 12,45 (s, 1H, oksadiazol-NH/Pyrr-NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,76 (CH₃), 16,87 (CH₃), 21,77 (CH(CH₃)₂), 21,80 (CH(CH₃)₂), 41,73 (CH), 71,36 (CH(CH₃)₂), 108,60, 109,74, 111,65, 117,99, 118,63, 120,55, 128,28, 129,82, 131,35, 145,20, 154,89, 156,22, 157,23, 165,10; IR (ATR) ν = 3397, 3361, 3232, 3136, 2981, 2923, 2852, 1775, 1649, 1514, 1415, 1322, 1260, 1175, 1110, 917, 831, 759, 702 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* = 480,1 ([M-H]⁻). HRMS za C₂₀H₂₀Cl₂N₅O₅: izračunan 480,0841, izmerjen 480,0848; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm, 4,6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL; retencijski čas: 12,275 min (95,2 % pri 220 nm).

terc-Butil(2-kloroetil)karbamat (26). Sol kloroetilamina s klorovodikovo kislino (**24**, 5,00 g, 43,1 mmol) in di-*terc*-butil dikarbonat (**25**, 11,3 g, 51,7 mmol) suspendiramo v acetonitrilu (200 mL) in dodamo trietilamin (13,4 mL, 96,4 mmol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni T. Odfiltriramo oborino v reakcijski zmesi in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Preostanek raztopimo v diklorometanu (200 mL) in organsko fazo spiramo z vodo (3 × 30 mL) in nasičeno raztopino NaCl (3 × 30 mL), sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije: 91 %; rožnat oljnat produkt (7,06 g); R_F (diklorometan/metanol = 10/1): 0,75; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,39 (s, 9H, 3 × CH₃), 3,23 (q, 2H, ³J = 6,0 Hz, OCH₂CH₂NH), 3,56 (t, 2H, ³J = 6,0 Hz, OCH₂CH₂NH), 7,09 (t, 1H, ³J = 4,8 Hz, NH); IR (ATR) ν = 3361, 2978, 2932, 1686, 1509, 1452, 1366, 1247, 1162, 1063, 958, 864, 781, 656 cm⁻¹.

Metil 3-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)etoksi)-4-nitrobenzoat (29). (27) Spojino **28** (4,41 g, 22,3 mmol) raztopimo v brezvodnem DMF (100 mL) in dodamo K₂CO₃ (12,3 g, 89,0 mmol). Nato dodamo še *tert*-butil(2-kloroetil)karbamat (**26**, 5,93 g, 33,0 mmol) in KI (7,47 g, 45,0 mmol). Reakcijsko zmes mešamo dva dni pri 60 °C. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanku dodamo etil acetat (100 mL) in vodo (30 mL). Organsko fazo spiramo z 1 M HCl (3 × 30 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 × 30 mL) in nasičeno raztopino NaCl (3 × 30 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Del produkta, ki pri odparevanju topila izkristalizira, odnučamo in speremo z etanolom in acetonom (725 mg). Preostali del očistimo s kolonsko kromatografijo (MF: etil acetat/petroleter = 1/2) (835 mg). Izkoristek reakcije: 21 %; rumeni kristali (1,56 g); tališče: 77-81 °C; R_f (etil acetat/petroleter = 1/2): 0,36; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,37 (s, 9H, 3 × CH₃), 3,29-3,32 (m, 2H, OCH₂CH₂NH, signal se prekriva s signalom za vodo), 3,91 (s, 3H, CH₃), 4,24 (t, 2H, ³J = 5,6 Hz, OCH₂CH₂NH), 6,97 (t, 1H, ³J = 5,2 Hz, OCH₂CH₂NH), 7,67 (dd, 1H, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, Ar-H-6), 7,78 (d, 1H, ⁴J = 1,2 Hz, Ar-H-2), 7,99 (d, 1H, ³J = 8,4 Hz, Ar-H-5); IR (ATR) ν = 3370, 3055, 2975, 2875, 1701, 1607, 1515, 1442, 1363, 1305, 1241, 1164, 1088, 988, 880, 840, 746, 693 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* = 362,89 ([M+Na]⁺).

Splošni postopek I. Sinteza spojin 34a-b, 36a-b in 39 (spojino 34a smo podali kot primer). Izhodno spojino (**33a**, 40,0 mg, 0,0565 mmol) raztopimo v 4 M HCl v 1,4-dioksanu (4 mL) in THF (1 mL). Reakcijsko zmes mešamo 2 uri pri sobni T. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in surov produkt čistimo s prelivanjem z dietil etrom (10 mL). Suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo in prelijemo z dietil etrom (2 × 2 mL).

(S)-2-(2-(4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-5-((1-metoksi-1-okso-3-fenilpropan-2-il)karbamoil)fenoksi)etan-1-aminijev klorid (34a). Izkoristek reakcije: 99 %; beli kristali (36 mg); tališče: 146-148 °C; R_f (diklorometan/metanol = 10/1): 0,0; [α]_D²⁵ -48,7 (c 0,252, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3,09-3,21 (m, 2H, CH₂Ph), 3,38-3,43 (m, 2H, OCH₂CH₂NH, signal se prekriva s signalom za vodo), 3,65 (s, 3H, CH₃), 4,30 (t, 2H, ³J = 4,4 Hz, OCH₂CH₂NH), 4,64-4,70 (m, 1H, CH), 7,18-7,36 (m, 6H, 5 × Ar-H, Pyrr-CH), 7,48 (d, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, Ar-H), 7,51 (dd, 1H, ³J = 8,4 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, Ar-H), 8,03 (d, 1H, ³J = 8,4 Hz, Ar-H), 8,25 (s, 3H, NH₃⁺), 8,89 (d, 1H, ³J = 8,0 Hz, CONHCH), 9,44 (s, 1H, CONHAr), 13,10 (d, 1H, ⁴J = 2,4 Hz, Pyrr-NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 36,25 (CH₂), 38,35 (CH₂), 51,95 (CH₃), 54,33 (CH), 64,84 (CH₂), 98,41, 106,29, 110,57, 115,03,

120,24, 122,13, 126,49, 127,47, 128,24, 129,07, 129,51, 129,53, 137,66, 147,98, 157,29, 165,54, 172,21; IR (ATR) ν = 3394, 3326, 3222, 3029, 2951, 2859, 1723, 1649, 1509, 1414, 1277, 1179, 1021, 972, 816, 746, 700 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z = 605,0 ($[\text{M-H}]^-$). HRMS za $\text{C}_{24}\text{H}_{23}\text{Br}_2\text{N}_4\text{O}_5$: izračunan 605,0035, izmerjen 605,0018; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL ; retencijski čas: 8,015 min (95,3 % pri 280 nm).

Splošni postopek J. Sinteza spojin 35a-b (spojino 35b podajamo kot primer). Izhodno spojino (33b, 100 mg, 0,179 mmol) raztopimo v mešanici metanola in THF (1:1, 10 mL), dodamo 1 M NaOH (0,718 mL, 0,718 mmol) in mešamo čez noč pri sobni T. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanku dodamo etil acetat (20 mL) in vodo (10 mL). Vodno fazo nakisamo z 1M HCl (2 mL) do pH 2, fazi ločimo in organsko fazo spiramo z nasičeno raztopino NaCl (10 mL). Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , filtriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt očistimo s prelivanjem z dietil etrom (20 mL), stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo in speremo z dietil etrom (2 $\times$ 10 mL).

(3-(2-((*tert*-Butoksikarbonil)amino)etoksi)-4-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzoil)-L-alanin (35b). Izkoristek reakcije: 81 %; bela trdna snov (79 mg); tališče: 203-206 $^{\circ}\text{C}$; R_f (diklorometan/metanol/ocetna kislina = 10/1/0,01): 0,20; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 68,6 (c 0,282, DMF); ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 1,38 (s, 9H, 3 $\times$ CH_3), 1,41 (d, 3H, 3J = 7,6 Hz, CH_3), 2,42 (s, 3H, Pyrr- CH_3), 3,40-3,44 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ – signal se prekriva s signalom za vodo), 4,21 (t, 2H, 3J = 5,2 Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4,44 (quint, 1H, 3J = 7,2 Hz, CONHCH), 7,14 (t, 1H, 3J = 5,2 Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 7,57-7,59 (m, 2H, Ar-H-2,6), 8,46 (d, 1H, 3J = 8,8 Hz, Ar-H-5), 8,63 (d, 1H, 3J = 7,2 Hz, CONHCH), 9,25 (s, 1H, CONHAr), 12,40 (s, 1H, Pyrr-NH), 12,57 (s, 1H, COOH); ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) δ 10,73 (CH_3), 16,92 (CH_3), 28,13 (3 $\times$ CH_3), 48,18 (CH), 67,23 (CH_2), 77,88 (C), 108,63, 110,11, 110,46, 117,91, 118,73, 120,70, 128,55, 129,60, 130,28, 146,30, 155,68, 156,46, 165,32, 174,30 (signal za eno CH_2 skupino se prekriva s signalom za $\text{DMSO-}d_6$); IR (ATR) ν = 3341, 3174, 3121, 2981, 2919, 1720, 1597, 1521, 1455, 1351, 1255, 1212, 1117, 1049, 955, 859, 762, 669 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z = 541,1 ($[\text{M-H}]^-$). HRMS za $\text{C}_{23}\text{H}_{28}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_7$: izračunan 541,1257, izmerjen 541,1255; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20

min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μ L; retencijski čas: 11,367 min (96,5 % pri 280 nm).

2-(2-(3,4-Dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-5-((1-(5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-il)etil)karbamoil)fenoksi)etan-1-aminijev klorid (39). Delamo po splošnem postopku I, le da kot topilo uporabimo 2 mL THF, reakcijsko zmes pa mešamo 5 ur. Po spiranju z etrom spojino dodatno čistimo z reverzno-fazno »flash« kromatografijo na aparatu Isolera Biotage z mobilno fazo 15-60% acetonitrila v 0,1% TFA. Izkoristek reakcije: 16 %; sivo bela trdna snov (5 mg); tališče: 234-236 °C; R_f (diklorometan/metanol = 10/1): 0,0; $[\alpha]_D^{25}$ 29,6 (c 0,180, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,50 (d, 3H, $^3J = 7,6$ Hz, CH₃), 2,25 (s, 3H, Pyrr-CH₃), 3,34 (signal se prekriva s signalom za vodo, 2H, OCH₂CH₂NH₃⁺), 4,39 (t, 2H, $^3J = 4,4$ Hz, OCH₂CH₂NH₃⁺), 5,11 (quint, 1H, $^3J = 7,2$ Hz, CONHCH), 7,61-7,62 (m, 2H, Ar-H-4,6), 8,24 (s, 3H, NH₃⁺), 8,41 (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, Ar-H-3), 8,98 (d, 1H, $^3J = 7,6$ Hz, CONHCH), 9,26 (s, 1H, CONHAr), 12,31 (s, 1H, oksadiazol-NH/Pyrr-NH), 12,51 (s, 1H, oksadiazol-NH/Pyrr-NH); MS (ESI) $m/z = 484,1$ ([M-H]⁺). HRMS za C₁₉H₂₀Cl₂N₅O₆: izračunan 484,0791, izmerjen 484,0798. HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μ m, 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μ L; retencijski čas: 3,697 min (97,8 % pri 254 nm).

(*Z*)-4-Etoksi-4-oksobut-2-enojska kislina (41). (28) Na₂CO₃ (11,0 g, 104 mmol) suspendiramo v etanolu (100 mL) in suspenziji med mešanjem po delih dodajamo furan-2,5-dion (40, 20,0 g, 204 mmol). Reakcijsko zmes mešamo 50 minut pri sobni T, pri čemer nastane brezbarvna raztopina. Reakcijski zmesi uparimo topilo pod znižanim tlakom, preostanek raztopimo v vodi (40 mL) in nakisamo z 1 M HCl do pH 1 (18 mL). Vodno fazo ekstrahiramo z etil acetatom (3 $\times$ 50 mL), organske faze združimo in speremo z nasičeno raztopino NaCl (1 $\times$ 25 mL). Sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije: 100 %; brezbarvno olje (29,3 g); R_f (etil acetat/petroleter/očetna kislina = 2/1/0,01): 0,53; ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1,38 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CH₃), 4,37 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, CH₂), 6,39 (d, 1H, $^3J = 12,8$ Hz, CH), 6,47 (d, 1H, $^3J = 12,8$ Hz, CH), 8,74 (br s, 1H, COOH); IR (ATR) $\nu = 3061, 2986, 2942, 1706, 1629, 1415, 1211, 1161, 1096, 1021, 966, 856, 818, 668$ cm⁻¹.

(*E*)-4-Etoksi-4-oksobut-2-enojska kislina (42). Spojini 41 (28,8 g, 200 mmol) med mešanjem dodamo AlCl₃ (3,58 g, 26,9 mmol) in mešamo 2 uri pri 65 °C. Reakcijsko zmes

ohladimo in nakisamo z 1 M HCl do pH 1 (212 mL). Vodno fazo ekstrahiramo z etil acetatom (3×170 mL), združene organske faze sušimo z Na_2SO_4 , filtriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt čistimo s kristalizacijo iz mešanice dietiletra in petroletra. Izkoristek reakcije: 62 %; beli kristali (17,8 g); tališče: 55-56 °C; R_f (etil acetat/petroleter/ocetna kislina = 2/1/0.01): 0,52; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1,34 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CH_3), 4,29 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, CH_2), 6,86 (d, 1H, $^3J = 15,6$ Hz, CH), 6,95 (d, 1H, $^3J = 15,6$ Hz, CH), 8,76 (br s, 1H, COOH); IR (ATR) $\nu = 3082, 2988, 2869, 2680, 2536, 1659, 1426, 1314, 1272, 1229, 1175, 997, 896, 854, 778$ cm^{-1} .

Etil (E)-4-((2-hidroksi-5-nitrofenil)amino)-4-oksobut-2-enoat (44). Spojino **42** (18,5 g, 129 mmol) suspendiramo v brezvodnem diklorometanu (160 ml), prepihamo z argonom in dokapavamo oksalil klorid (33,1 mL, 386 mmol). Dodamo 1 mL brezvodnega DMF in mešamo pod argonovo atmosfero pri sobni T 3 ure. Topilo uparimo pod znižanim tlakom, preostanek raztopimo v 1,4-dioksanu (200 mL) in raztopino med mešanjem dokapavamo k suspenziji 2-amino-4-nitrofenola (**43**, 17,2 g, 112 mmol) ter NaHCO_3 (11,6 g, 138 mmol) v 1,4-dioksanu (300 mL). Reakcijsko zmes mešamo pri sobni T čez noč. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanku dodamo etil acetat (300 mL) in vodo (150 mL). Neraztopljeni del spojine odfiltriramo, organsko fazo pa spiramo z 1 M HCl (3×100 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2×100 mL), sušimo z Na_2SO_4 , filtriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Odfiltriran del spojine in del dobljen po uparevanju organske faze združimo in čistimo s prelivanjem z etanolom (400 mL), suspenzijo stresamo na ultrazvoku, segrevamo, oborino odnučamo, speremo z etanolom (2×50 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije: 88 %; svetlo rjava trdna snov (27,5 g); tališče: 174-178 °C; R_f (etil acetat/petroleter = 2/1): 0,38; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 1,27 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CH_3), 4,22 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, CH_2), 6,73 (d, 1H, $^3J = 15,6$ Hz, CH), 7,06 (d, 1H, $^3J = 9,2$ Hz, Ar-H-3), 7,62 (d, 1H, $^3J = 15,6$ Hz, CH), 7,96 (dd, 1H, $^3J = 9,2$ Hz, $^4J = 2,8$ Hz, Ar-H-4), 9,09 (d, 1H, $^4J = 2,8$ Hz, Ar-H-6), 10,20 (s, 1H, NH/OH), 11,81 (br s, 1H, NH/OH); IR (ATR) $\nu = 3331, 3079, 2983, 2861, 2717, 2584, 1716, 1594, 1544, 1431, 1341, 1282, 1224, 1184, 1079, 985, 895, 818, 743$ cm^{-1} ; MS (ESI) $m/z = 302,82$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Etil 2-(6-nitro-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)acetat (45a). Spojino **44** (13,5 g, 48,3 mmol) suspendiramo v etanolu (220 mL), dodamo trietilamin (8,70 mL, 62,4 mmol) in mešamo pri 65 °C čez noč. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in surov produkt čistimo s kristalizacijo iz etanola (500 mL). Izkoristek reakcije: 69 %; blede rumeni kristali

(9,40 g); tališče: 163-165 °C; Rf (diklorometan/metanol = 10/1): 0,65; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,16 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CH₃), 3,04 (d, 2H, $^3J = 5,2$ Hz, CHCH₂COOEt), 4,08 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, CH₂CH₃), 5,19 (t, 1H, $^3J = 5,2$ Hz, CH), 7,11 (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, Ar-H-8), 7,74 (d, 1H, $^4J = 2,8$ Hz, Ar-H-5), 7,84 (dd, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, $^4J = 2,8$ Hz, Ar-H-7), 11,14 (s, 1H, NH); IR (ATR) $\nu = 3397, 3219, 3122, 3058, 2986, 2970, 2889, 1698, 1620, 1517, 1464, 1376, 1324, 1229, 1177, 1088, 1044, 960, 886, 744, 702\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 302,78$ ([M+Na]⁺).

Etil 2-(4-benzil-6-nitro-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)acetat (45b).

Kalijev fluorid (1,56 g, 26,8 mmol) suspendiramo v DMF (120 mL), dodamo benzil bromid (1,27 mL, 10,7 mmol) in mešamo pri sobni T 15 minut. Nato dodamo spojino **45a** (3,00 g, 10,7 mmol) in mešamo pri 60 °C čez noč. Reakcijski zmesi uparimo topilo pod znižanim tlakom, preostanku dodamo diklorometan (120 mL) in 10% citronsko kislino (50 mL). Oborino (nezreagirana izhodna spojina) odnučamo, organsko in vodno fazo ločimo, ter organsko fazo spiramo z 10% citronsko kislino (1 × 50 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (1 × 30 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 30 mL), sušimo z Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: etil acetat/petroleter = 1/4). Izkoristek reakcije: 18 %; blede rumena pena (713 mg); tališče: 64-67 °C; Rf (etil acetat/petroleter = 1/2): 0,57; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,17 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CH₃), 3,12-3,22 (m, 2H, CHCH₂COOEt), 4,11 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, CH₂CH₃), 5,23-5,32 (m, 2H, CH₂Ph), 5,44 (t, 1H, $^3J = 5,2$ Hz, CH), 7,19 (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, Ar-H-8), 7,25-7,38 (m, 5H, 5 × Ar-H), 7,78 (d, 1H, $^4J = 2,0$ Hz, Ar-H-5), 7,89 (dd, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, $^4J = 2,4$ Hz, Ar-H-7); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 13,96, 35,83, 44,03, 60,51, 73,36, 100,98, 116,92, 119,80, 126,61, 127,43, 128,40, 128,76, 135,42, 141,97, 149,55, 164,40, 169,29; IR (ATR) $\nu = 3090, 2991, 2944, 1720, 1686, 1524, 1497, 1377, 1338, 1270, 1179, 1098, 1026, 914, 878, 736, 696\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 393,34$ ([M+Na]⁺).

2-(6-Nitro-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)ocetna kislina (49).

Spojino **45a** (2,27 g, 8,09 mmol) suspendiramo v etanolu (200 mL), dodamo 2 M NaOH (100 mL, 200 mmol) in mešamo 5 minut pri sobni T. Reakcijsko zmes nevtraliziramo z 1 M HCl, topilo uparimo pod znižanim tlakom, preostanek nakisamo z 1 M HCl do pH = 1 in vodno fazo ekstrahiramo z etil acetatom (4 × 200 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, odfiltriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: etil acetat/petroleter/ocetna kislina = 2/1/0,01). Izkoristek reakcije: 24

%; blede rumena trdna snov (494 mg); tališče: 174-176 °C; Rf (etil acetat/petroleter/ocetna kislina = 4/1/0,01): 0,45; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 2,95 (d, 2H, $^3J = 5,2$ Hz, CH₂), 5,15 (t, 1H, $^3J = 5,2$ Hz, CH), 7,12 (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, Ar-H-8), 7,73 (d, 1H, $^4J = 2,8$ Hz, Ar-H-5), 7,83 (dd, 1H, $^3J = 9,2$ Hz, $^4J = 2,8$ Hz, Ar-H-7), 11,09 (s, 1H, NH), 12,59 (s, 1H, COOH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 35,65, 73,35, 110,54, 116,40, 119,35, 127,25, 141,65, 148,22, 164,92, 171,02; IR (ATR) $\nu = 3121, 3053, 2970, 2889, 2677, 2615, 1709, 1684, 1529, 1497, 1394, 1341, 1279, 1198, 1089, 947, 881, 828, 734\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 250,81$ ([M-H]).

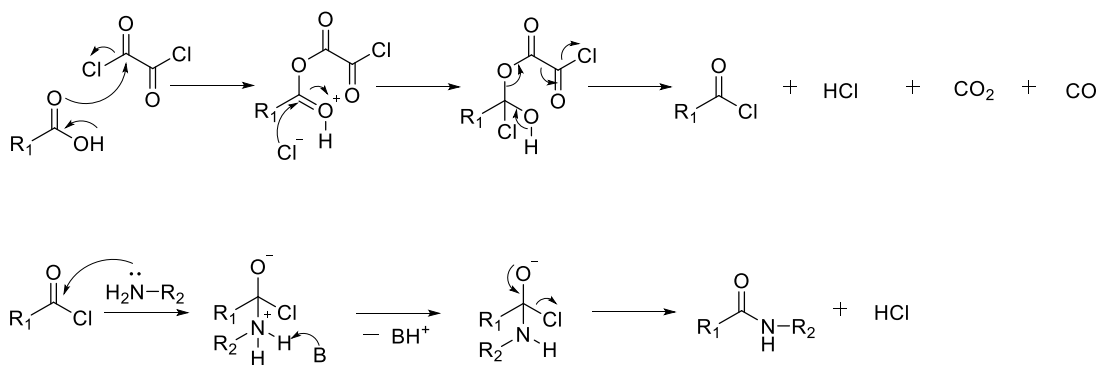
5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. KOMENTAR NEKATERIH SINTEZNIH POSTOPKOV

5.1.1. Tvorba amidov in estrov z aktivirano kislino (N- in O-aciliranje)

Pri tvorbi amidne vezi med amini **12**, **19a-b**, **32a-b**, **46a-b** ali **50** in 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino (**5**) ali 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino smo uporabili metodo s pripravo kislinskega klorida. Na ta način smo pripravili spojine **8a-b**, **13**, **20a-d**, **33a-b**, **47a-b** in **48a 2**.

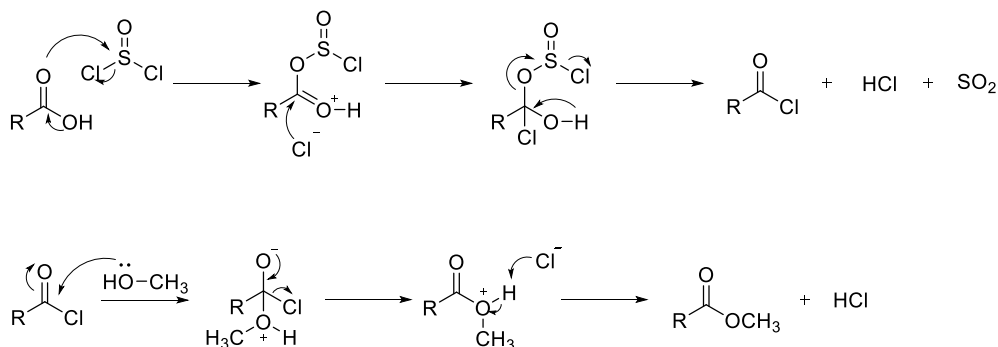
Priprava kislinskega klorida je potrebna zato, ker je –OH skupina slaba izstopajoča skupina, zaradi česar karboksilna kislina pod običajnimi pogoji ne reagira po mehanizmu nukleofilne substitucije. Z oksalil kloridom ali sorodnim reagentom –OH skupino karboksilne kisline najprej substituira s klorom, ki je dobra izstopajoča skupina, poleg tega pa je klor elektronprivlačen element in poveča elektrofilitnost karbonilnega ogljika. V naslednji stopnji nastalemu kislinskemu kloridu dodamo amin, ki kot nukleofil napade aktivirano karbonilno skupino kislinskega klorida in po mehanizmu nukleofilne substitucije (S_N2), preko nastanka nestabilnega tetraedričnega intermedija, se tvori amidna vez. Pri reakciji se sprošča HCl, zato v reakcijsko zmes dodamo bazo, ki nevtralizira sproščeno kislino. Z dodatkom baze preprečimo protoniranje amina, saj amonijeva sol ne bi več delovala kot nukleofil. Pri naših reakcijah smo kot bazo uporabili piridin, ki je poleg tega deloval tudi kot sotopilo. Mehanizem reakcije je prikazan na sliki 15 (29, 30, 31).



Slika 15: Tvorba amidne vezi s pomočjo oksalil klorida (prirejeno po 29, 31).

Reakcije O-aciliranja pri sintezi spojin **7a-b**, **16a** in **28** smo izvedli z uporabo tionil klorida. Pri tem smo na karboksilno kislino, podobno kot pri uporabi oksalil klorida, uvedli –Cl kot dobro izstopajočo skupino in v naslednjem koraku z nukleofilno adicijo molekule metanola na karbonilno skupino kislinskega klorida ter sledečo eliminacijo halogenidnega iona tvorili

metilni ester. Metanol je imel v reakciji tako vlogo reagenta kot topila. Mehanizem O-aciliranja je predstavljen na sliki 16 (29, 30, 32, 33).



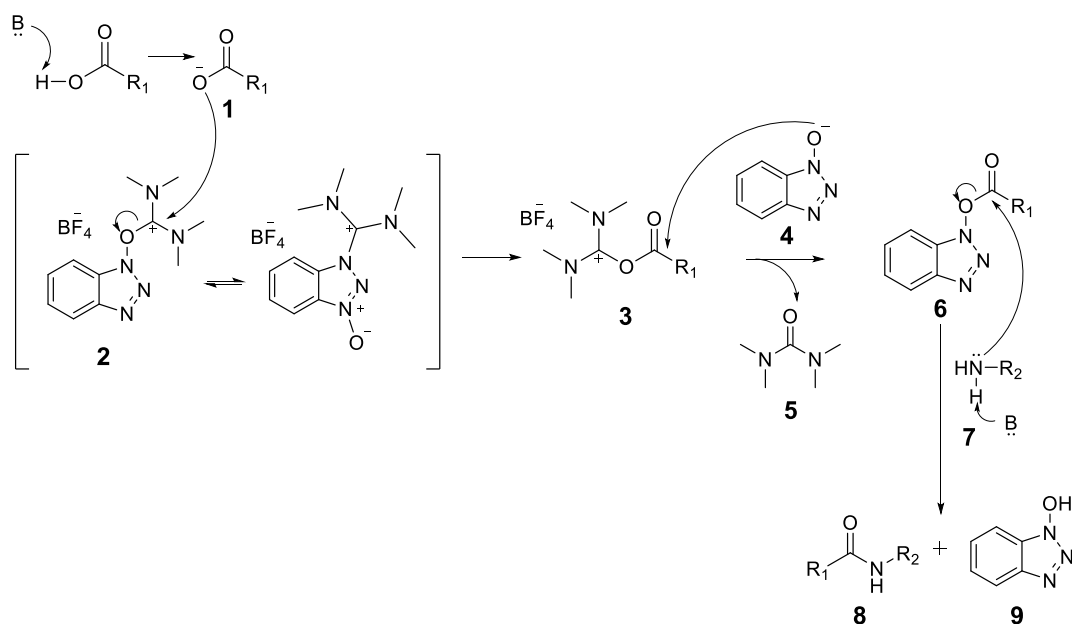
Slika 16: Tvorba estra s pomočjo tionil klorida (prirejeno po 32, 33).

5.1.2. Tvorba amidne vezi s sklopitvenim reagentom TBTU

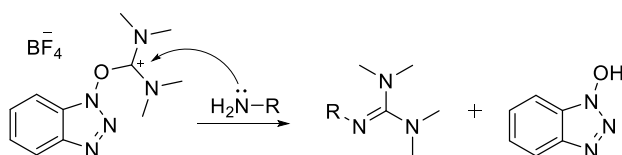
Pri sintezi spojin **18a-b** in **31a-b** smo amidno vez tvorili z uporabo sklopitvenega reagenta TBTU (O-(benzotriazol-1-il)-*N,N,N',N'*-tetrametiluronijev tetrafluoroborat). Tako kot pri sintezi amidne vezi preko tvorbe kislinskega klorida, tudi v tem primeru v prvi stopnji tvorimo aktivirano obliko kisline, kar je potrebno, ker je -OH skupina slaba izstopajoča skupina. V prvem koraku deprotonirana kislina (**1**) reagira z molekulo TBTU (**2**), pri čemer pride do aktivacije kisline. Reakcija poteče v prisotnosti baze, v našem primeru *N*-metilmorfolina (NMM), ki kislini odtegne proton. Nastali benzotriazol-1-olatni ion (**4**) nato nukleofilno napade aktivirani ester (**3**), kot stranski produkt reakcije pa izstopi tetrametilsečnina (**5**). V zadnjem koraku pride do tvorbe amidne vezi med aminom (**7**) in karbonilnim ogljikom O-benzotriazolnega aktiviranega estra (**6**) po mehanizmu nukleofilne substitucije (S_N2) in izstopa 1-hidroksibenzotriazola (**9**). Mehanizem reakcije je predstavljen na sliki 17 (31, 34, 35).

Pri izvedbi sinteze smo najprej zmešali kislino, bazo (NMM) in TBTU, amin pa smo v reakcijsko zmes dodali šele čez 30 minut, ko je že prišlo do aktivacije kisline. Na ta način smo se izognili nastanku gvanidinijevega stranskega produkta. Mehanizem nastanka tega stranskega produkta je prikazan na sliki 18 (31).

Prednost uporabe sklopitvenih reagentov so visoki izkoristki reakcij in hiter nastanek aktiviranega estra *in situ*, kar omogoča, da dodamo amin direktno v reakcijsko zmes karboksilne kisline, TBTU in baze. Prednost je tudi to, da reakcija poteka pod milimi reakcijskimi pogoji (sobna temperatura) (31).



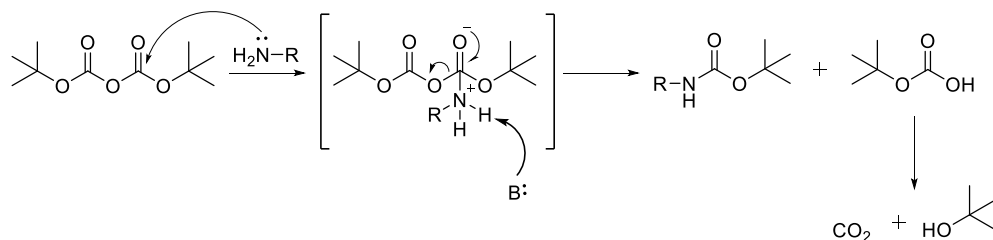
Slika 17: Tvorba amidne vezi z uporabo sklopitvenega reagenta TBTU (prirejeno po 34, 35).



Slika 18: Mehanizem nastanka gvanidinijevega stranskega produkta (prirejeno po 31).

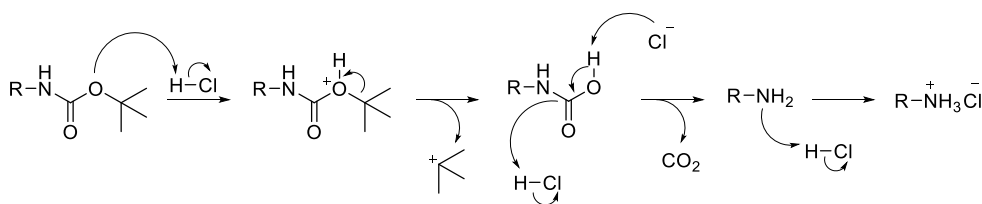
5.1.3. Zaščita amino skupine z di-*tert*-butil dikarbonatom

V izogib nastanku neželenih stranskih produktov smo pred izvedbo nadaljnje sinteze aminske skupino spojine **24** zaščitili v obliki *tert*-butil karbamata (zaščitna skupina Boc) z uporabo di-*tert*-butil dikarbonata (Boc_2O). Aminski so namreč dobri nukleofili in srednje močne baze, zato lahko pod ustreznimi reakcijskimi pogoji vstopajo v številne reakcije. Reakcija uvedbe zaščitne skupine Boc poteka v prisotnosti baze, npr. trietilamina, po mehanizmu pa gre za nukleofilni napad amina na elektrofilni karbonylni C-atom, ki poteka preko tetraedričnega intermedija. Produkt reakcije je ester karbaminske kisline, poleg tega pa nastaneta še 2-metilpropan-2-ol in ogljikov dioksid (36, 37).



Slika 19: Zaščita amino skupine z zaščitno skupino Boc (prirejeno po 37).

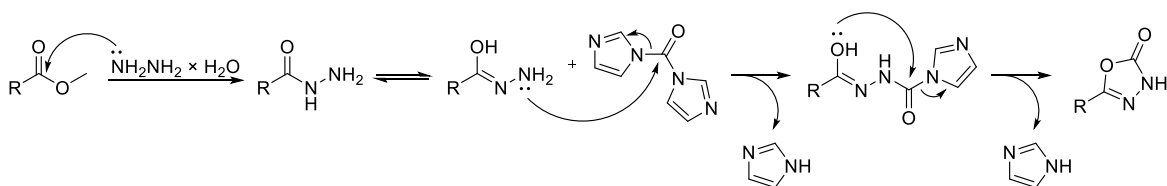
Karbamati so pogoste zaščitne skupine za amine, saj so manj stabilni od amidov in imidov in se zato odstranijo pod milejšimi reakcijskimi pogoji. *tert*-Butilkarbammat odstranimo z acidolizo z močno kislino, npr. s klorovodikovo ali s trifluoroocetno kislino. V primeru spojin **34a-b**, **36a-b** in **39** smo za odščito uporabili 4 M raztopino HCl v 1,4-dioksanu. V prisotnosti kisline pride najprej do protoniranja kisikovega atoma *tert*-butilkarbamata, nato pa do izstopa *tert*-butilkationa in nastanka karbaminske kisline. Ta je zelo nestabilna, zato razpade na amin in ogljikov dioksid. HCl nato protonira prosti amin in kot produkt reakcije dobimo sol s klorovodikovo kislino. Mehanizem acidolize je predstavljen na sliki 20 (36, 38).



Slika 20: Odstranitev zaščitne skupine Boc z acidolizo (prirejeno po 38).

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

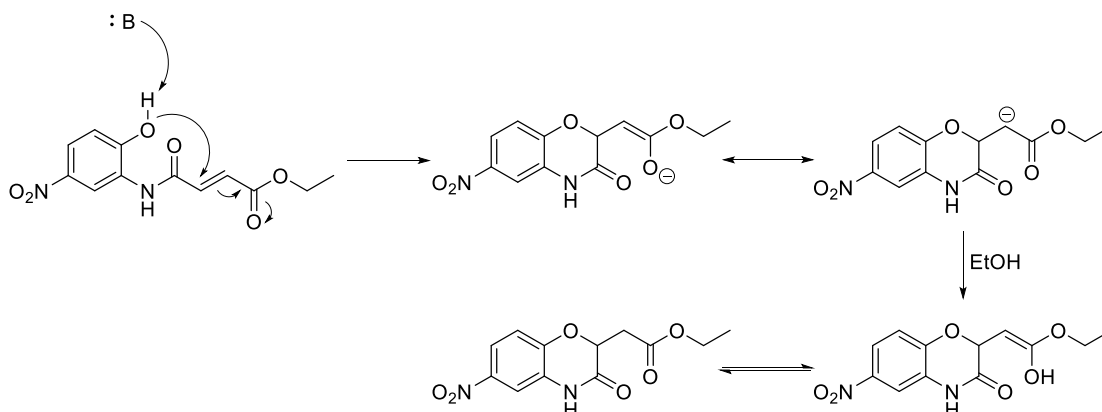
5-Okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolni obroč, ki je prisoten v spojinah **23** in **39** smo pripravili iz metilnih estrov **20d** in **33b** v dveh stopnjah z uporabo reagentov hidrazin monohidrata in 1,1'-karbonildiimidazola (CDI). Najprej smo z nukleofilno substitucijo z uporabo hidrazin monohidrata metilno estrsko skupino spojin **20d** in **33b** pretvorili v hidrazidno skupino. V naslednji reakcijski stopnji, po dodatku reagenta CDI, pride do nukleofilnega napada hidrazidne -NH_2 skupine na karbonilno skupino 1,1'-karbonilimidazola in nastanka imidazola kot stranskega produkta. Zaradi laktam-laktim tautomerije pride do prehajanja vodikovega atoma med dušikom in kisikom, nastala laktimska -OH skupina pa nato nukleofilno napade karbonilno skupino preostalega dela molekule CDI. Pri tem kot stranski produkt izstopi še drugi imidazol, kot produkt ciklizacije pa dobimo 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolni obroč. Imidazola smo se pri čiščenju spojin znebili s prelivanjem z vodo, saj je le-ta v vodi topen, naše spojine pa smo v obliki neraztopljene oborine odnučali. Potek ciklizacije je prikazan na sliki 21 (30, 31).



Slika 21: Mehanizem priprave 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolnega obroča.

5.1.5. Intramolekularna Michaelova adicija

Spojino **45a** smo sintetizirali po mehanizmu 1,4-adicije oz. intramolekularne Michaelove adicije. V našem primeru –OH skupina reagira kot nukleofil in v prisotnosti baze, npr. trietilamina, napade C₄-atom aktivirane ogljik-ogljik dvojne vezi α,β -nenasičene estrske skupine. Pri tem nastane resonančno stabiliziran anion, ki se protonira in pretvori v enol. V zadnjem koraku pride do izomerizacije enola v karbonilno spojino. Mehanizem adicije je prikazan na sliki 22 (30, 39).



Slika 22: *Mehanizem intramolekularne Michaelove adicije (prirejeno po 39).*

5.1.6. Hidroliza spojine z 1,4-benzoksazin-3-onskim skeletom

Pri sintezi spojin razreda D z 1,4-benzoksazin-3-onskim centralnim delom smo se srečali s problemom nestabilnosti spojin pod bazičnimi pogoji. Najprej smo sintezo spojin **48a-b** načrtovali tako, da bi hidrolizo etilne estrske skupine izvedli v zadnji stopnji sinteze z uporabo vodnih raztopin baz (stran 25, shema 7, reakcijski pogoji h). Tekom sinteze smo ugotovili, da je proton na mestu 2 (proton označen z rdečo barvo na sliki 23) preveč kisel, zato pride ob uporabi baze do odcepa tega protona, kar povzroči odprtje 1,4-benzoksazin-3-onskega obroča (slika 23). Razpad začne potekati takoj ob stiku spojine z bazo, kar smo lahko opazili tudi v hitri spremembi barve reakcijske zmesi v intenzivno rdeče-oranžno raztopino, saj je razpadli produkt zaradi konjugacije močno obarvan.

Da bi se izognili uporabi baze smo poizkusili estrsko skupino v spojinu **47a** hidrolizirati s kislinsko hidrolizo. Kot reakcijske pogoje smo v prvem poskusu uporabili 15 ekvivalentov 1 M HCl ter segrevanje pri 70 °C, v drugem poskusu pa smo uporabili prebitek koncentrirane HCl, reakcijo pa izvajali v zatesnjeni cevki pri 100 °C. Reakcija pod omenjenimi pogoji ni potekla, izolirali pa smo le izhodno spojino, ki je očitno v kisljih pogojih zelo stabilna.

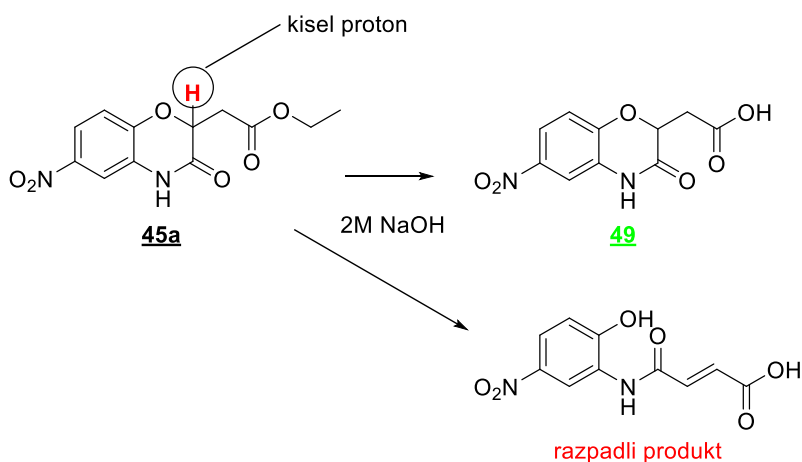
Naredili smo tudi poizkus hidrolize z uporabo litijevega jodida (LiI) a tudi v tem primeru nismo uspeli izolirati želenega produkta, spojina pa je pri reakciji začela razpadati.

Ker tako kislinska kot bazična hidroliza nista bili uspešni, smo v naslednjem poizkusu etilno estrsko skupino želeli odstraniti s pomočjo encimske hidrolize z uporabo encima esteraze. Reakcijo smo najprej izvedli s spojino **45a** v fosfatnem pufru (pH 7,36), za solubilizacijo smo uporabili 0,5 ekvivalentov Tween 20, dodali smo esterazo in raztopino pet dni mešali pri sobni temperaturi. Sodeč po analizi s tankoplastno kromatografijo je v tem primeru hidroliza potekla, vendar produkta zaradi prisotnosti kisle COOH skupine nismo uspeli izolirati. Reakcijo encimske hidrolize smo poskusili ponoviti tudi na končnih estrskih spojinah **47a-b**, vendar v teh primerih reakcija ni potekla. Sklepamo, da je razlog zelo slaba topnost spojin **47a-b** v vodnih pufernih raztopinah, ki kljub uporabi Tween 20 in trotedenskem mešanju nista bili dovolj raztopljeni, da bi reakcija lahko potekla.

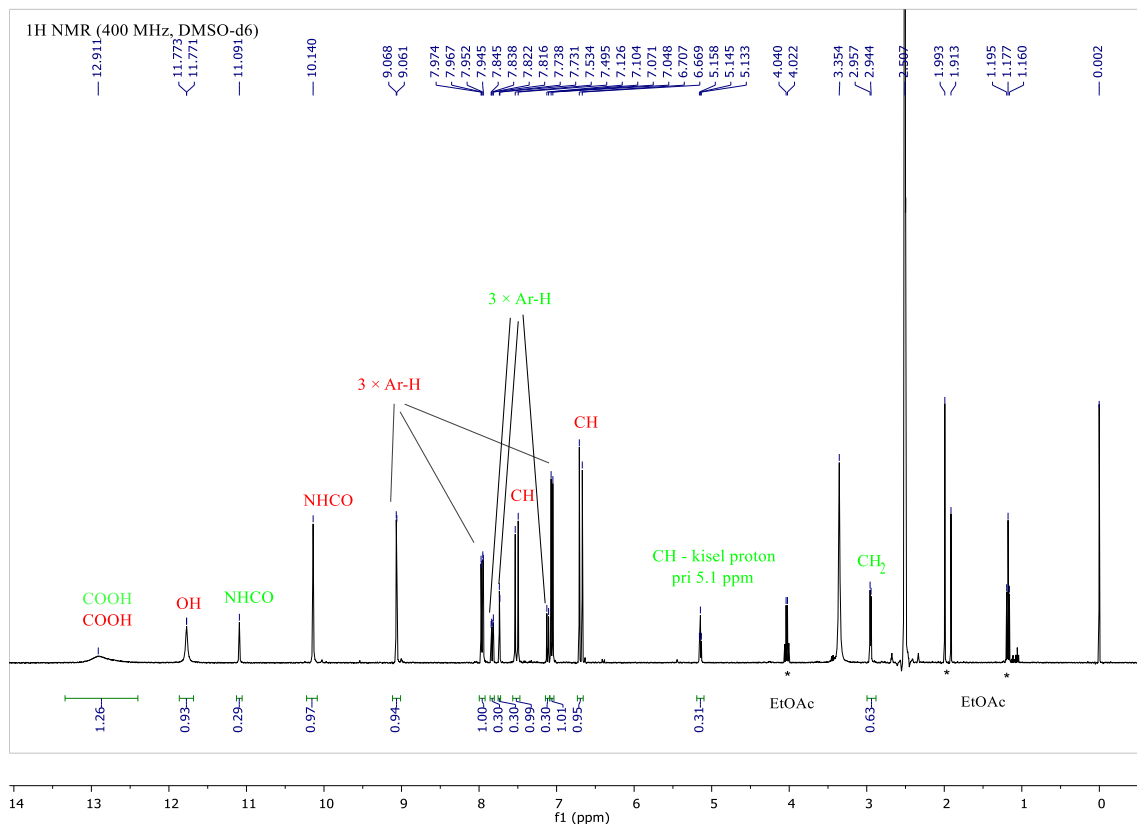
Poskusili smo tudi preestrenje spojine **45a** iz etilnega estra v benzilni ester, ki bi ga na koncu lahko odstranili s katalitskim hidrogeniranjem. Reakcijo smo izvajali v benzilnem alkoholu s titanovim izpopropoksidom kot katalizatorjem, a preestrenje ni uspelo.

S spojino **45a** smo nato izvedli več poizkusnih reakcij alkalne hidrolize, v katerih smo spreminjali vrsto baze (kalijev karbonat ali različne koncentracije NaOH) ter čas mešanja, da bi ugotovili kako hitro poteče hidroliza in kako hitro začne produkt razpadati. Zmes spojin po reakciji smo v različnih časovnih točkah analizirali s pomočjo NMR-spektroskopije in tako ugotavljali, kakšna je hitrost nastanka želenega produkta **49** ter kakšna je struktura razpadnega produkta. Strukturi in NMR-spekter produkta hidrolize ter razpadnega produkta so prikazani na slikah 23 in 24. Za najbolj optimalno se je izkazala uporaba 2 M NaOH in 5 min mešanja pri sobni temperaturi. V tem času v reakcijski zmesi ni bilo več izhodne spojine, prisotna pa sta bila tako zelen produkt hidrolizire **49** kot razpadni produkt. Pod temi pogoji je bilo v reakcijski zmesi 24% želenega produkta **49**, ki smo ga uspeli ločiti od razpadnega produkta s kolonsko kromatografijo. Če smo reakcijo ustavili po krajšem času, je bila prisotna še izhodna spojina, izkoristek pa je bil zato nižji. Z uporabo šibkejše baze so bili rezultati prav tako slabši, saj je razpad potekal takoj, hidroliza pa je potekala počasneje, zaradi česar je bilo potrebno reakcijsko zmes mešati dalj časa, pri čemer je večji del produkta razpadel. Iz spojine **49** smo nato končno spojino **48a** sintetizirali po postopkih, opisanih v poglavju 4.2.

V morebitnih prihodnjih poizkusih sinteze podobnih spojin bi lahko reakcijsko pot optimizirali tako, da bi že v začetku sinteze namesto etilne uporabili spojino z benzilno estrsko skupino, ki se lahko odstrani pod pogoji katalitskega hidrogeniranja. Druga možnost bi bila priprava spojin, v katerih bi bila na mestu 2 1,4-benzoksazin-3-onskega obroča, namesto kislega protona vezana alkilna skupina (npr. metilna skupina), s čimer bi se izognili možnosti za odcep kislega protona in s tem za razpad spojine.



Slika 23: Bazična hidroliza in razpad spojine **45a**.

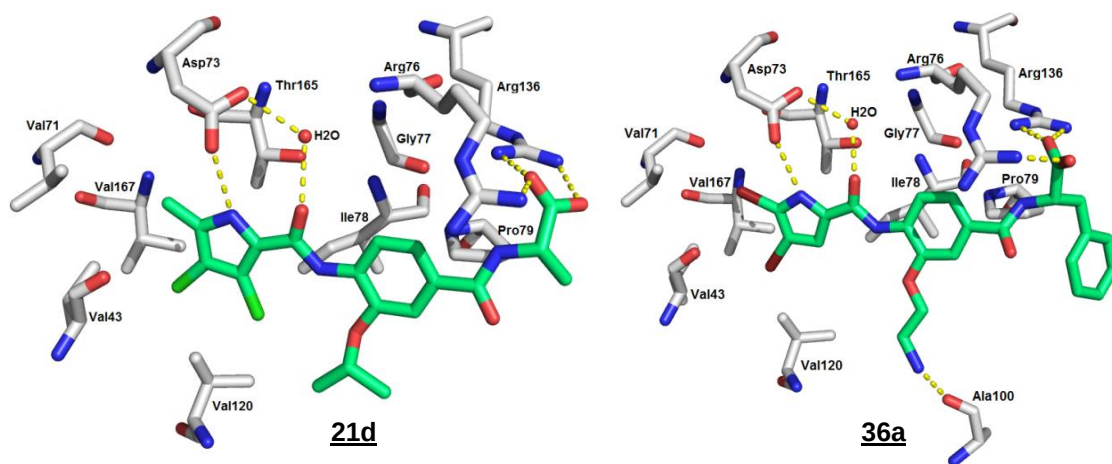


5.2. REZULTATI IN KOMENTAR BIOLOŠKIH TESTIRANJ

5.2.1. Encimski testi

Vseh trideset končnih spojin je bilo testiranih na encimu DNA-giraza iz bakterije *E. coli*. Določili smo jim rezidualno aktivnost (RA), t.j. razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti zaviralca in aktivnostjo v njegovi odsotnosti, pri čemer 0% rezidualna aktivnost pomeni popolno inhibicijo, 100% rezidualna aktivnost pa pomeni, da inhibicije ni. Testirali smo pri dveh različnih koncentracijah zaviralca (10 μ M in 1 μ M), najbolj aktivne spojine pa še pri nižjih koncentracijah. Nekaterim spojinam, ki so najmočnejše zavirale encim, smo določili tudi srednjo zaviralno koncentracijo (IC_{50}). IC_{50} je koncentracija zaviralca, ki povzroči 50% zmanjšanje aktivnosti encima. Štirim spojinam (**21d**, **23**, **36b** in **39**) smo določili tudi zaviralno aktivnost na encim DNA-giraza iz bakterije *Staphylococcus aureus* in na encim topoizomeraza IV (topo IV) iz bakterij *E. coli* in *S. aureus*. Rezultati encimskih testov so prikazani v preglednicah I-V. Za primerjavo smo v tabele dodali tudi IC_{50} vrednosti za novobiocin (18).

Vezavo končnih spojin v ATP-vezavno mesto smo ocenili z molekulskim sidranjem spojin s programom GOLD. Vezava spojin **21d** in **36a** v aktivnem mestu GyrB iz *E. coli* je prikazana na sliki 25. Interakcije, za katere predvidevamo, da so bistvene za zaviralno aktivnost, so prikazane z rumeno prekinjeno črto.



Slika 25: S programom GOLD napovedani, najboljše ocenjeni konformaciji spojin **21d** in **36a** (v pastelno zeleni) v aktivnem mestu DNA-giraze B iz bakterije *E. coli* (PDB koda: 4DUH) (40). Različni tipi atomov obeh ligandov in pomembnejših aminokislinskih ostankov so prikazani v različnih barvah: C_{21d} in C_{36a} v pastelno zeleni, C_{GyrB} v sivi, O v rdeči, N v modri, Cl v zeleni in Br v rjavi. Kristalno vezana molekula vode je predstavljena kot rdeča kroglica. Predvidene vodikove vezi med spojinama **21d** oz. **36a**, aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu in kristalno vodo so prikazane z rumeno prekinjeno črto. Sliko smo pripravili s programom PyMOL.

Pri nekaterih spojinah iz razreda B se je izkazalo, da so malo bolj aktivne spojine s 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirolamidnim fragmentom v primerjavi s tistimi s 4,5-dibromo-1*H*-pirolamidnim fragmentom (primerjava spojin **20b** z RA = 100% in **20d** z RA = 66% ter spojini **21b** z RA = 19% in **21d** z RA = 2% pri 1 μ M koncentraciji zaviralca). Spojina **21d** ima trenutno najnižjo izmerjeno IC₅₀ vrednost med zaviralci sintetiziranimi v okviru tega magistrskega dela, in sicer 0,044 μ M, ter izkazuje skoraj 4-krat močnejše zaviranje DNA-giraze kot novobiocin (IC₅₀ = 0,17 μ M). Pri ostalih parih razlike med rezidualnimi aktivnostmi 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirolamidov in 4,5-dibromo-1*H*-pirolamidov niso tako očitne. Sklepamo, da oba pirola zasedeta vezavno mesto encima in tvorita hidrofobne interakcije z aminokislinami Val71, Val43, Val167 in Ala47, vendar manjši klorovi atomi ter metilna skupina najbrž bolj ustrezajo adeninskemu vezavnemu mestu DNA-giraze. Iz rezultatov prikazanih v preglednicah I-IV je razvidno, da so aktivnejše spojine s prosto karboksilno skupino od njihovih estrskih analogov. To lahko opazimo npr. ob primerjavi aktivnosti estrov **8a** (IC₅₀ = 5,8 μ M), **13** (RA = 80% pri 10 μ M zaviralca) in **33b** (RA = 80% pri 10 μ M zaviralca) z njihovimi kislinskimi analogi **9a** (IC₅₀ = 2,9 μ M), **14** (IC₅₀ = 0,60 μ M) in **35b** (RA = 5% pri 10 μ M zaviralca). Predvidevamo, da je razlog v tem, da lahko le prosta karboksilna kislina tvori ionske interakcije z Arg136, estrska skupina pa možnost te interakcije izgubi. Tudi v primerjavi derivatov karboksilnih kislin in njihovih hidrazidnih analogov lahko opazimo, da sta spojin **21d** in **35b** s prostima karboksilnima skupinama (IC₅₀ = 0,044 μ M oz. RA = 8% pri 1 μ M zaviralca) bolj aktivni od hidrazidov **22** in **37** (IC₅₀ = 0,279 μ M oz. RA = 68% pri 1 μ M zaviralca). Analog spojin **21d** in **22**, spojina **23** s 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolnim obročem, izkazuje nizko IC₅₀ vrednost (0,080 μ M). Predvidevamo, da lahko oksadiazolonski obroč tvori dodatne interakcije z encimom, npr. s solnim mostičkom Glu50-Arg76 ali z Arg136. Zaviralna aktivnost spojine **23** je malo manjša od aktivnosti spojine **21d** s prosto karboksilno kislino (IC₅₀ = 0,044 μ M). Prav tako je bil oksadiazolonski analog **38** (RA = 54% pri 1 μ M zaviralca) manj aktiven od spojine **35b** s karboksilno skupino (RA = 8% pri 1 μ M zaviralca). Vseeno mislimo, da je bioizosterna zamenjava karboksilne skupine z manj kislim oksadiazolonskim obročem ugodna, saj lahko olajša prehod spojin skozi celično steno bakterij in tako prispeva k boljšemu protibakterijskemu delovanju spojin.

V preglednici II lahko opazimo, da je aktivnost derivatov, ki smo jim na desni strani pripeli L-alanin (spojini **21b** in **21d** z RA = 19% oz. 2% pri 1 μ M konc. zaviralca) boljša od tistih z L-fenilalaninom (spojini **21a** in **21c** z RA = 100% oz. 21% pri 1 μ M konc. zaviralca).

Sterično večja fenilna skupina L-fenilalanina se najbrž slabše prilega vezavnemu mestu encima. Ob primerjanju spojin iz razreda B z izopropoksi skupino na mestu 3 benzenovega obroča (preglednica II) in spojin iz razreda C z aminoetoksi skupino (preglednica III) smo ugotovili, da so v splošnem aktivnejše spojine z aminoetoksi skupino (primerjava spojin **20d** z RA = 66% in **34b** z RA = 2% ali spojin **21a** z RA = 100% in **36a** z RA = 24% pri 1 μ M). Očitno nastala aminska skupina po odstranitvi zaščitne skupine Boc omogoča dodatne interakcije z aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu encima. Rezultati molekulskega sidranja predvidevajo vodikovo vez med amino skupino in Ala100 (spojina **36a**, slika 25). Tudi nekatere spojine z izopropoksi substituentom izkazujejo zelo dobro zaviralno delovanje na DNA-girazo, npr. **21b** (RA = 19% pri 1 μ M), **21d** (RA = 2% pri 1 μ M), **22** (RA = 15% pri 1 μ M) in **23** (RA = 0% pri 1 μ M). Rezultati kažejo, da alkilni substituenti na mestu 3 benzenovega obroča v splošnem izboljšajo aktivnost spojin, najverjetneje zaradi hidrofobnih interakcij z Ile78, Ile90 ali Pro79 v hidrofobnem dnu encima. Zaščitna skupina Boc pri spojinah z Boc-aminoetoksi skupino pa je predvidoma sterično prevelika in vezavo otežuje.

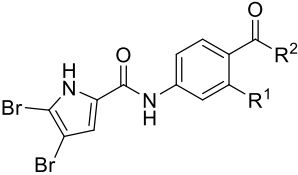
Spojine **8a-b** in **9a-b** iz razreda A (preglednica I) izkazujejo šibkejšo zaviralno aktivnost DNA-giraze kot nekateri zaviralci iz razredov B ali C, vendar so aktivnosti glede na to, da so molekule krajše in da na desnem delu ne vsebujejo dodatnih substituentov s katerimi bi lahko tvorile interakcije z Arg136, kljub temu relativno dobre (npr. **9a**, IC_{50} = 2,9 μ M). Uvedba –OH skupine na mesto 2 na benzenovem obroču pri spojinah iz razreda A ni izboljšala delovanja. V paru spojin **8a** (IC_{50} = 5,8 μ M) in **8b** (RA = 94% pri 10 μ M) je aktivnost spojine **8b**, ki vsebuje –OH skupino precej slabša, medtem ko med spojinama **9a** (IC_{50} = 2,9 μ M) in **9b** (IC_{50} = 2,7 μ M) ni opaznih razlik v aktivnosti. Glede na to, da sta molekuli **13** in **14** daljši od ostalih spojin iz razreda A in od spojin iz razredov B in C, smo pričakovali, da bo karboksilna kislina spojine **14** predaleč za tvorbo interakcij z Arg136 in da bo zato njena aktivnost slabša. Presenetljivo, se je spojina **14** izkazala kot najbolj aktivna spojina v razredu A (IC_{50} = 0,60 μ M). Spojina **14** ima več kot 4-krat boljše delovanje kot spojina **9b**, ki ne vsebuje dodatnega benzenovega obroča iz česar sklepamo, da morda tudi dodaten aromatski obroč tvori ugodne interakcije z encimom.

S spojinami iz razreda D (preglednica IV) nismo dosegli zelo močne aktivnosti. Najbolj aktivna je bila spojina s prosto karboksilno skupino (**48a**, RA = 42 % pri 10 μ M zaviralca), uvedba benzilnega fragmenta na 1,4-benzoksazin-3-onski dušik pa na aktivnost ni vplivala

(primerjava spojine **47a** z RA = 71% in spojine **47b** z RA = 79% pri 1 μ M koncentraciji zaviralca).

Zaviralne aktivnosti spojin **21d**, **23**, **36b** in **39** na encim DNA-giraza iz bakterije *S. aureus* in na encim topo IV iz bakterij *E. coli* in *S. aureus* (preglednica V) so bile v splošnem malo nižje v primerjavi z aktivnostmi na DNA-girazo iz *E. coli* (npr. spojina **23** ima IC_{50} = 0,080 μ M na DNA-girazo iz *E. coli* ter RA = 36% oz. 29% pri topo IV iz *E. coli* oz. *S. aureus*). Menimo, da je zaradi manjših razlik v adeninskem vezavnem mestu obeh encimov iz *S. aureus* in *E. coli* vezava naših spojin v aktivno mesto manj optimalna. GyrB iz *S. aureus* vsebuje v aktivnem mestu aminokislino levcin in dva izolevcina, ki so pri DNA-girazi iz *E. coli* zamenjane z manjšimi metioninom in dvema valinoma, zaradi česar je vezavno mesto pri bakteriji *E. coli* večje. Predvidevamo, da bi bile zaviralne aktivnosti pri spojinah, ki imajo pripet 4,5-dibromo-1*H*-pirolni obroč zaradi velikosti bromovih atomov še nižje. Trenutno je najboljša spojina **36b**, ki izkazuje dobro zaviralno aktivnost na vse tri testirane encime (RA < 10%). Spojino bomo testirali še pri nižjih koncentracijah in ji določili vrednost IC_{50} . Rezultati se relativno dobro ujemajo z rezultati testiranja na DNA-girazi iz *E. coli*, saj sta bili spojini s prosto karboksilno kislino (**21d** in **36b** z RA = 9% oz. 6% pri encimu topo IV iz *E. coli*) malo boljši od spojin z oksadiazolonskim obročem (**23** in **39** z RA = 36% oz. 16% pri topo IV iz *E. coli*). Prav tako sta bili spojini z aminoetoksi skupino (**36b** in **39**) bolj aktivni od spojin z izopropoksi substituentom na centralnem delu molekule (**21d** in **23**) (npr. primerjava med spojinama **23** in **39** z RA = 29% oz. 6% pri encimu topo IV iz *S. aureus*).

Preglednica I. Zaviralne aktivnosti na encim DNA-giraza iz *E. coli* za spojine iz razreda A.

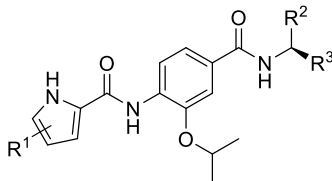
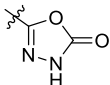
					
Spojina	R ¹	R ²	RA (%) ^a <i>E. coli</i> giraza		IC ₅₀ (μM) ^b
			10 μM	1 μM	
8a	H	OMe	31%	59%	5,80 ± 1,7 μM
8b	OH	OMe	94%	95%	n.d. ^c
9a	H	H	2%	84%	2,9 ± 0,4 μM
9b	OH	H	21%	113%	2,7 ± 0,1 μM
13	H	4-NH-2-OH- (C ₆ H ₃)-COOMe	80%	100%	n.d.
14	H	4-NH-2-OH- (C ₆ H ₃)-COOH	35%	67%	0,60 ± 0,37 μM
novobiocin					0,17 μM

^a Rezidualna aktivnost encima pri 10 μM in 1 μM koncentraciji spojine.

^b Koncentracija spojine, ki za 50% zmanjša aktivnost encima.

^c n.d. = Ni določeno.

Preglednica II. Zaviralne aktivnosti na encim DNA-giraza iz *E. coli* za spojine iz razreda B.

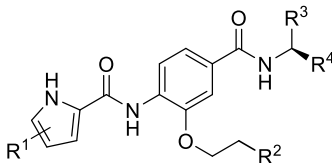
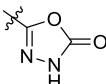
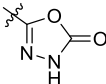
						
Spojina	R ¹	R ²	R ³	RA (%) ^a		IC ₅₀ (μM) ^b
				<i>E. coli</i> giraza		
				10 μM	1 μM	
<u>20a</u>	4,5-diBr	Bzl	COOMe	100%	100%	n.d. ^c
<u>20b</u>	4,5-diBr	CH ₃	COOMe	83%	100%	n.d.
<u>20c</u>	3,4-diCl-5-Me	Bzl	COOMe	100%	100%	n.d.
<u>20d</u>	3,4-diCl-5-Me	CH ₃	COOMe	58%	66%	n.d.
<u>21a</u>	4,5-diBr	Bzl	COOH	1%	100%	n.d.
<u>21b</u>	4,5-diBr	CH ₃	COOH	2%	19%	n.d.
<u>21c</u>	3,4-diCl-5-Me	Bzl	COOH	8%	91%	n.d.
<u>21d</u>	3,4-diCl-5-Me	CH ₃	COOH	1%	2%	0,044 μM
<u>22</u>	3,4-diCl-5-Me	CH ₃	CONHNH ₂	2%	12%	0,279 μM
<u>23</u>	3,4-diCl-5-Me	CH ₃		0%	0%	0,080 μM
novobiocin						0,17 μM

^a Rezidualna aktivnost encima pri 10 μM in 1 μM koncentraciji spojine.

^b Koncentracija spojine, ki za 50% zmanjša aktivnost encima.

^c n.d. = Ni določeno.

Preglednica III. Zaviralne aktivnosti na encim DNA-giraza iz *E. coli* za spojine iz razreda C.

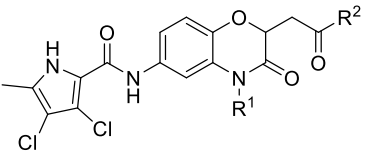
					RA (%) ^a		IC ₅₀ (μM) ^b
Spojina	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	<i>E. coli</i> giraza		
					10 μM	1 μM	
<u>33a</u>	4,5-diBr	NHBoc	Bzl	COOMe	87%	100%	n.d. ^c
<u>33b</u>	3,4-diCl-5-Me	NHBoc	CH ₃	COOMe	80%	100%	n.d.
<u>34a</u>	4,5-diBr	NH ₃ ⁺ Cl ⁻	Bzl	COOMe	10%	85%	n.d.
<u>34b</u>	3,4-diCl-5-Me	NH ₃ ⁺ Cl ⁻	CH ₃	COOMe	5%	2%	n.d.
<u>35a</u>	4,5-diBr	NHBoc	Bzl	COOH	60%	100%	n.d.
<u>35b</u>	3,4-diCl-5-Me	NHBoc	CH ₃	COOH	5%	8%	n.d.
<u>36a</u>	4,5-diBr	NH ₃ ⁺ Cl ⁻	Bzl	COOH	3%	24%	n.d.
<u>36b</u>	3,4-diCl-5-Me	NH ₃ ⁺ Cl ⁻	CH ₃	COOH	5%	6%	n.d.
<u>37</u>	3,4-diCl-5-Me	NHBoc	CH ₃	CONHNH ₂	38%	68%	n.d.
<u>38</u>	3,4-diCl-5-Me	NHBoc	CH ₃		3%	54%	1,64 μM
<u>39</u>	3,4-diCl-5-Me	NH ₃ ⁺ Cl ⁻	CH ₃		<10%	5%	n.d.
novobiocin							0,17 μM

^a Rezidualna aktivnost encima pri 10 μM in 1 μM koncentraciji spojine.

^b Koncentracija spojine, ki za 50% zmanjša aktivnost encima.

^c n.d. = Ni določeno.

Preglednica IV. Zaviralne aktivnosti na encim DNA-giraza iz *E. coli* za spojine iz razreda D.

					
Spojina	R ¹	R ²	RA (%) ^a <i>E. coli</i> giraza		IC ₅₀ (μM) ^b
			10 μM	1 μM	
47a	H	OEt	73%	71%	n.d. ^c
47b	Bzl	OEt	71%	79%	n.d.
48a	H	OH	42%	n.d.	n.d.
novobiocin					0,17 μM

^a Rezidualna aktivnost encima pri 10 μM in 1 μM koncentraciji spojine.
^b Koncentracija spojine, ki za 50% zmanjša aktivnost encima.
^c n.d. = Ni določeno.

Preglednica V: Zaviralne aktivnosti na encime DNA-giraza iz *E. coli* in *S. aureus* in topo IV iz *E. coli* in *S. aureus*.

Spojina	IC ₅₀ (μM) ^a oz. RA (%) ^b			
	<i>E. coli</i> giraza	<i>S. aureus</i> giraza	<i>E. coli</i> topo IV	<i>S. aureus</i> topo IV
21d	0,044 μM	n.d. ^c	9%	14%
23	0,080 μM	n.d.	36%	29%
36b	5%	7%	6%	0%
39	<10%	1,04 μM	16%	6%
novobiocin	0,17 μM	0,041 μM	11 μM	27 μM

^a Koncentracija spojine, ki za 50% zmanjša aktivnost encima.
^b Rezidualna aktivnost encima pri 10 μM koncentraciji spojine.
^c n.d. = Ni določeno.

5.2.2. Protibakterijska aktivnost

Triindvajsetim zaviralcem DNA-giraze smo določili protibakterijsko delovanje na dveh po Gramu pozitivnih (*S. aureus* ATCC 25923 in *E. faecalis* ATCC 29212) in dveh po Gramu negativnih bakterijskih sevih (*E. coli* ATCC 25922 in *P. aeruginosa* ATCC 27853). Določili

smo tudi delovanje spojin na dva mutirana seva bakterije *E. coli*. En sev je imel mutiran gen *tolC*, ki nosi zapis za protein, ki je sestavni del izlivne črpalke, zato so bakterije s to mutacijo bolj občutljive za antibiotike, barvila in detergente. Drugi sev z mutiranim genom *lpxC* pa ima povečano prepustnost zunanje membrane, saj ta gen nosi zapis za encim udeležen v biosintezi lipida A, komponente lipopolisaharidov. Na ta način smo želeli ugotoviti, ali na delovanje naših spojin vplivajo spremembe v bakterijski zunanji membrani (7, 41).

Spojinam, ki so izkazovale več kot 80% zaviranja rasti posameznih sevov bakterij pri 50 μ M koncentraciji, smo na teh sevih določili še minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK₉₀), t.j. najnižjo koncentracijo spojine, ki zavira rast bakterij za več kot 90%, in minimalno baktericidno koncentracijo (MBK₉₉), t.j. najnižjo koncentracijo spojine, pri kateri pride do smrti več kot 99,9% bakterij. Rezultati so prikazani v preglednicah VI in VII.

V splošnem so spojine izkazovale boljšo aktivnost proti po Gramu pozitivnim kot proti po Gramu negativnim bakterijam. Kar sedem spojin (**21c**, **21d**, **22**, **23**, **34a**, **34b** in **38**) je pri 50 μ M koncentraciji zaviralo rast *E. faecalis* za več kot 80%, od tega so vse razen spojine **38** zavirale rast za več kot 95%. Spojine **23**, **34a** in **34b** so poleg tega pri 50 μ M koncentraciji zavirale tudi rast bakterije *S. aureus* za več kot 80%. Aktivnosti na G- bakterije so bile precej nižje, saj je le spojina **34b** izkazovala 67% zaviranje rasti *E. coli*, rezultati pri ostalih spojinah pa so bili pod 13%. Tudi na bakterijo *P. aeruginosa* je najbolj zaviralno delovala spojina **34b** (35% zaviranje rasti pri 50 μ M koncentraciji), sledili pa sta ji spojini **34a** in **38** z 28% oz. 31% zaviranjem rasti. Razlog za boljše delovanje spojin proti G+ bakterijam je najbrž težje prehajanje spojin skozi celično steno po Gramu negativnih bakterij ali črpanje spojin iz celic preko izlivnih črpalk. Slednje smo poskusili potrditi s testiranjem spojin na sev *E. coli* $\Delta tolC$ z mutiranim genom, ki nosi zapis za izlivno črpalco. Spojine **20b**, **21d**, **34a** in **34b** so ta sev za razliko od divjega seva pri 50 μ M koncentraciji popolnoma zavrle, spojina **8a** je mutirani sev zavrila za 87%, opazna razlika pa je bila tudi pri spojinah **8b** in **23** s približno 50% zaviranjem rasti mutirane bakterije. S tem smo potrdili, da so vsaj v določenih primerih razlog za neaktivnost spojin proti po Gramu negativni *E. coli* najverjetneje izlivne črpalke. Zanimivo pa je, da spojina **20b**, ki pri 50 μ M koncentraciji popolnoma zavre mutiran sev $\Delta tolC$, na izoliranem encimu, kjer ni težav, povezanih s celično steno oz. črpalkami, praktično ni kazala inhibicije. V tem primeru se lahko vprašamo, če je protibakterijska aktivnost spojine **20b** posledica delovanja po kakšnem drugem mehanizmu in ne posledica

zaviranja DNA-giraze. Testiranje na *E. coli* $\Delta lpxC$ s povečano prepustnostjo zunanje membrane ni pokazalo izrazitejših sprememb v aktivnosti glede na divji tip bakterije.

Rezultati protibakterijskega testiranja se dobro ujemajo z rezultati testiranja na encimu. V skladu s pričakovanji, so se v primerjavi s spojinami s 4,5-dibromo-1*H*-pirolamidnim fragmentom za bolj aktivne izkazale spojine s 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirolnim fragmentom. V splošnem so bile bolj aktivne spojine s pripetim L-alaninom, čeprav je imela zelo dobro aktivnost tudi spojina **21c** z L-fenilalaninom. Kljub temu, da spojin **21c** in **21d** vsebujeta kisli in polarni COOH skupini, zaradi česar bi bil lahko njun prehod bakterijske membrane otežen, spojin **21c** kaže zelo dobro protibakterijsko aktivnost proti *E. faecalis*, saj znaša njuna MIK_{90} -vrednost 3,13 μM . Spojina **23** s 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolnim obročem kot manj kislo in manj polarno bioizosterno zamenjavo za karboksilno kislino je izkazovala odlično delovanje proti bakteriji *E. faecalis* ($MIK_{90} = 1,56 \mu M$) z dvakrat višjo aktivnostjo od njenega kislinskega analoga **21d** ($MIK_{90} = 3,13 \mu M$). Spojina **23** je bila najbolj aktivna tudi proti bakteriji *S. aureus* z $MIK_{90} = 3,13 \mu M$, ni pa bila aktivna proti po Gramu negativnim bakterijam. S primerjavo aktivnosti spojin **21d** in **23** vidimo, da se je zamenjava karboksilne kisline z oksadiazolonskim obročem izkazala za uspešno, zaradi česar bi bila smiselna priprava spojin, ki bi na tem mestu vsebovale tudi druge hetereocikle, npr. tetrazol ali tiadiazol.

Spojina **38**, ki vsebuje 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolni obroč in Boc-aminoetoksi substituent na mestu 3 benzenovega obroča, je izkazovala precej visoko MIK_{90} -vrednost na bakterijo *E. faecalis* (100 μM), saj je Boc skupina verjetno sterično prevelika in otežuje vezavo na tarčno mesto. Spojin **34a** in **34b** z odstranjenjo zaščitne skupine Boc, še vedno še vsebujeta metilni estrski skupini, sta se izkazali kot bolj obetavni s 50 μM oz. 25 μM MIK_{90} -vrednostjo proti bakteriji *E. faecalis* in s 50 μM MIK_{90} -vrednostjo proti bakteriji *S. aureus*. Spojin **34a** sta očitno substrata za izlivne črpalke, saj na divji sev bakterije *E. coli* nista bili aktivni njuna MIK_{90} -vrednost na sev *E. coli* $\Delta tolC$ pa je bila 25 μM . Analoga spojin **34a** in **34b** s prosto karboksilno skupino, **36a** in **36b**, kljub dobremu zaviranju DNA-giraze, na protibakterijskem testiranju nista bila aktivna. Razlog je lahko otežen prehod bakterijske membrane zaradi dveh polarnih skupin – aminske in karboksilne skupine. Zanimivo bo videti, kakšna bo aktivnost spojine **39**, ki prav tako ne vsebuje zaščitne skupine Boc, namesto COOH skupine pa vsebuje manj kisel oksadiazolonski obroč.

V nadaljnjem načrtovanju zaviralcev DNA-giraze B bi bilo smiselno večji poudarek nameniti izlivnim črpalkam, njihovi strukturi in mehanizmu črpanja učinkovin, ter ugotoviti kakšne so strukturne značilnosti substratov za izlivne črpalke. Problemu aktivnega izčrpavanja spojin iz bakterijskih celic bi se lahko izognili tudi s sočasnim jemanjem zaviralca izlivnih črpalk, kot je npr. fenilalanin-arginin beta-naftilamid (PAbN).

Preglednica VI. Odstotek zaviranja rasti bakterijskih sevih *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *E. coli ΔtolC* in *E. coli ΔlpxC* po 24-urni inkubaciji s 50 μM koncentracijo zaviralca DNA-giraze.

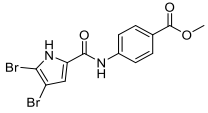
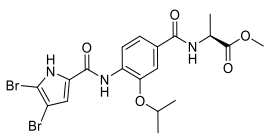
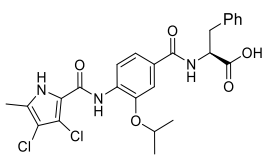
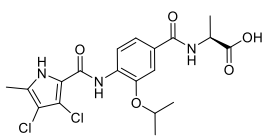
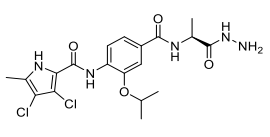
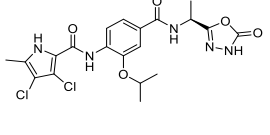
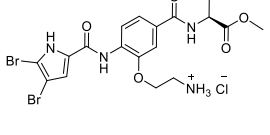
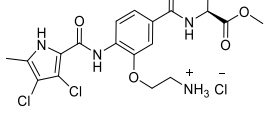
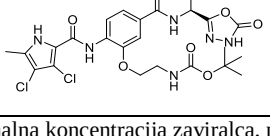
Spojina	Zaviranje rasti ^a (%)					
	<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	<i>E. coli ΔtolC</i> ^b (JW5503)	<i>E. coli ΔlpxC</i> ^c (JD17464)
8a	63 ± 5	11 ± 13	-3 ± 3	18 ± 14	87 ± 3	23 ± 10
8b	11 ± 27	23 ± 4	4 ± 2	7 ± 7	48 ± 9	-2 ± 3
9a	-2 ± 6	28 ± 13	8 ± 13	19 ± 1	13 ± 4	8 ± 9
9b	-12 ± 61	9 ± 9	3 ± 2	12 ± 6	8 ± 7	0 ± 4
13	-1 ± 8	46 ± 33	1 ± 2	11 ± 7	-11 ± 4	6 ± 4
14	16 ± 5	50 ± 10	3 ± 2	16 ± 8	-3 ± 2	11 ± 5
20b	-11 ± 36	66 ± 0	5 ± 0	3 ± 7	100 ± 1	3 ± 3
20c	-3 ± 52	74 ± 2	13 ± 2	6 ± 2	-5 ± 2	25 ± 5
20d	-45 ± 66	57 ± 1	0 ± 1	8 ± 2	-12 ± 1	6 ± 2
21b	-18 ± 56	70 ± 1	0 ± 2	10 ± 7	6 ± 3	-15 ± 7
21c	-57 ± 47	99 ± 2	-2 ± 3	4 ± 5	8 ± 2	1 ± 8
21d	-21 ± 79	100 ± 0	0 ± 1	8 ± 2	100 ± 3	-10 ± 2
22	5 ± 4	99 ± 1	7 ± 9	9 ± 0	7 ± 14	3 ± 14
23	100 ± 1	97 ± 5	5 ± 6	-1 ± 3	51 ± 6	0 ± 8
34a	103 ± 3	102 ± 0	8 ± 1	28 ± 4	103 ± 1	23 ± 12
34b	82 ± 16	100 ± 0	67 ± 5	35 ± 2	100 ± 1	47 ± 11
36a	20 ± 3	34 ± 7	5 ± 1	21 ± 8	-6 ± 4	9 ± 7
36b	17 ± 7	36 ± 5	4 ± 1	10 ± 4	-4 ± 1	5 ± 4
37	7 ± 9	64 ± 1	5 ± 3	12 ± 3	13 ± 14	19 ± 4
38	3 ± 2	86 ± 1	-1 ± 4	31 ± 5	-5 ± 6	2 ± 13
48a 2	2 ± 4	-5 ± 20	1 ± 6	10 ± 14	2 ± 10	5 ± 10

^a Zaviranje rasti bakterij po 24 urni inkubaciji pri 50 μM koncentraciji zaviralca.

^b Sev z mutiranim genom *tolC* z neaktivno izlivno črpalko.

^c Sev z mutiranim genom *lpxC* s povečano prepustnostjo zunanje membrane.

Preglednica VII. Vrednosti MIK_{90} in MBK_{99} na bakterijske seve *S. aureus*, *E. faecalis* in *E. coli* $\Delta tolC$ za spojine, ki so izkazovale $\geq 80\%$ inhibicijo pri 50 μM koncentraciji.

Spojina	Strukturna formula	MIK_{90}^a (μM) ali MBK_{99}^b (μM)		
		<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	<i>E. faecalis</i> (ATCC 29212)	<i>E. coli</i> $\Delta tolC^c$ (JW5503)
<u>8a</u>		n.d. ^d	n.d.	$MIK_{90} = 75$
<u>20b</u>		n.d.	n.d.	$MIK_{90} = 50$ $MBK_{99} = 50$
<u>21c</u>		n.d.	$MIK_{90} = 3,13$ $MBK_{99} = >75$	n.d.
<u>21d</u>		n.d.	$MIK_{90} = 3,13$ $MBK_{99} = >75$	$MIK_{90} = 50$ $MBK_{99} = >75$
<u>22</u>		n.d.	$MIK_{90} = 6,25$	n.d.
<u>23</u>		$MIK_{90} = 3,13$	$MIK_{90} = 1,56$	n.d.
<u>34a</u>		$MIK_{90} = 50$ $MBK_{99} = 50$	$MIK_{90} = 50$ $MBK_{99} = 75$	$MIK_{90} = 25$ $MBK_{99} = >75$
<u>34b</u>		$MIK_{90} = 50$ $MBK_{99} = >75$	$MIK_{90} = 25$ $MBK_{99} = >75$	$MIK_{90} = 25$ $MBK_{99} = 50$
<u>38</u>		n.d.	$MIK_{90} = 100$	n.d.

^a MIK_{90} = minimalna koncentracija zaviralca, pri kateri pride do $\geq 90\%$ zaviranja rasti. Kot pozitivna kontrola je bil uporabljen ciprofloksacin (MIK_{90} vrednosti proti *S. aureus*, *E. faecalis* in *E. coli* $\Delta tolC$ so 1,51, 3,02 in 0,015 μM)

^b MBK_{99} = minimalna koncentracija zaviralca, pri kateri pride do $\geq 99,9\%$ smrti bakterij. Ciprofloksacin je bil uporabljen kot pozitivna kontrola z MBK_{99} vrednostjo 1,5 $\mu g/mL$.

^c Sev z mutiranim genom *tolC*.

^d Ni določeno.

6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo s strukturno podprtim načrtovanjem načrtovali in sintetizirali 30 novih *N*-fenilpirolamidnih derivatov kot potencialnih ATP-kompetitivnih zaviralcev DNA-giraze B. Spojine smo fizikalno-kemijsko okarakterizirali in jih biološko ovrednotili s testiranjem na encimih DNA-giraza iz bakterij *E. coli* in *S. aureus* in topoizomeraza IV iz *E. coli* in *S. aureus* ter z določanjem protibakterijske aktivnosti na po Gramu pozitivnih bakterijah *S. aureus* in *E. faecalis* ter po Gramu negativnih bakterijah *E. coli* in *P. aeruginosa*. Spojine smo dodatno ovrednotili na dveh mutiranih sevih bakterije *E. coli*: sevu z neaktivno izlivno črpalko ter sevu s povečajo prepustnostjo zunanje membrane.

Rezultati encimskih testov so pokazali, da je najbolj aktivna spojina **21d** s 44 nM IC₅₀ vrednostjo na DNA-girazo iz *E. coli*, ki vsebuje 3,4-dikloro-5-metilpirolni obroč, prosto karboksilno skupino in izopropoksi skupino na benzenovem obroču. Boljšo encimsko inhibicijo od analogov z metilnimi ali etilnimi estrskimi skupinami so izkazovale spojine s prosto COOH skupino. Prav tako lahko zaključimo, da so spojine s 3,4-dikloro-5-metilpirolom bolj aktivne od spojin s 4,5-dibromopirolnim obročem. Lipofilna izopropoksi skupina na mestu 3 benzenovega obroča predvidoma tvori dodatne hidrofobne interakcije z vezavnim mestom in tako izboljša delovanje spojin. Tudi aminoetoksi skupina na tem mestu ugodno vpliva na delovanje. Pri trinajstih spojinah (**9a**, **21a**, **21b**, **21c**, **21d**, **22**, **23**, **34a**, **36a**, **34b**, **35b**, **36b** in **39**) je bila rezidualna aktivnost (RA) encima pri 10 µM koncentraciji zaviralca manjša kot 10%, pri spojinah **23**, **34b**, **35b**, **36b** in **39** pa je bila RA manjša od 10% tudi pri 1 µM koncentraciji zaviralca. Na DNA-girazi iz *S. aureus* in topo IV iz *E. coli* in *S. aureus* so bile zaviralne aktivnosti malo nižje, najbrž zaradi strukturnih razlik v aktivnem mestu. Najboljša je bila spojina **36b** z rezidualno aktivnostjo nižjo od 10% za vse tri encime pri 10 µM koncentraciji zaviralca.

Za uspešno protibakterijsko delovanje ni dovolj le zaviranje encima, temveč mora imeti spojina tudi ustrezne fizikalno-kemijske lastnosti, da lahko pride do svojega tarčnega mesta v bakteriji in da ni podvržena mehanizmu rezistence. Kar nekaj pripravljenih spojin je delovalo zaviralno na po Gramu pozitivne bakterije, od katerih je bila najbolj aktivna spojina **23**, ki vsebuje izopropoksi skupino in 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolni obroč kot mimetik karboksilne kisline. Njena MIK₉₀-vrednost je bila 1,56 µM proti bakteriji *E. faecalis* in 3,13 µM proti bakteriji *S. aureus*. Obetavna je bila tudi spojina **21d** z MIK₉₀ = 3,13 µM proti *E. faecalis*. Rezultati protibakterijskih testov se dobro ujemajo z rezultati encimskega

testiranja, kjer je bila zaenkrat najbolj aktivna spojina **21d**, sledi pa ji spojina **23**. Kljub temu, da so nekatere spojine dobro zavirale DNA-girazo iz *E. coli*, pa na to bakterijo niso izkazovale protibakterijske aktivnosti. Razlog za to je najbrž prisotnost izlivnih črpalk v po Gramu negativnih bakterijah, kar smo pri določenih spojinah (**8a**, **20b**, **21d**, **34a** in **34b**) s testiranjem na sev bakterije *E. coli* z mutiranim genom, ki nosi zapis za izlivno črpalko tudi potrdili, saj so spojine na ta sev kazale precej boljšo protibakterijsko aktivnost kot na divji sev *E. coli*.

Med magistrskim delom smo uspeli pripraviti spojine z dobrim protibakterijskim delovanjem, pridobili pa smo tudi številne informacije, ki bodo v pomoč pri prihodnjemu načrtovanju zaviralcev DNA-giraze. V nadaljevanju bo ključna optimizacija fizikalno-kemijskih lastnosti, kot so topnost, lipo/hidrofilnost in kislost/bazičnost, za doseganje boljšega prehajanja spojin skozi bakterijsko celično steno, zlasti pri po Gramu negativnih bakterijah. Pri načrtovanju bo potrebno upoštevati tudi dejstvo, da so spojine lahko substrati za izlivne črpalke, zaradi česar bodo tudi na tem področju potrebne dodatne raziskave in strukturne modifikacije, s katerimi bi lahko zaobšli ta mehanizem bakterijske odpornosti.

7. LITERATURA

1. Patrick GL: An Introduction to Medicinal Chemistry 3rd ed, Oxford University Press inc., New York, 2005: 379-382, 428-430.
2. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/en/> (dostopano 19.4.2017).
3. <http://apps.who.int/gho/data/node.wrapper.MGHEMORTCAUSE?lang=en> (dostopano 19.4.2017).
4. Gubina M, Ihan A, Števanec M: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, 2002: 4-5, 33-44, 427-446, 509-513, 543.
5. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry 7th ed, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2013: 1078, 1084.
6. <https://s-media-cache-ak0.pinimg.com/originals/ed/8f/93/ed8f9379456509b095045fafa47f2b29.jpg> (dostopano 31.8.2016).
7. Anes J, McCusker MP, Fanning S, Martins M: The ins and outs of RND efflux pumps in Escherichia coli. Frontiers in microbiology 2015; 6, 587.
8. Santajit S, Indrawattana N: Mechanisms of Antimicrobial Resistance in ESKAPE Pathogens. BioMed Research International 2016; 2475067.
9. Dale MM, Haylett D: Pharmacology Condensed 2nd ed, Curchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 2009: 106-107.
10. Sun J, Deng Z, Yan A: Bacterial multidrug efflux pumps: mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. Biochemical and Biophysiscal Research Communications 2014; 453 (2), 254-267.
11. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana 2005: 13-21, 244-257, 277-282.
12. http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/large_fig/c_fig06_04.html (dostopano 31.8.2016).
13. <https://www.quia.com/jg/1275308list.html> (dostopano 31.8.2016).
14. Champoux JJ: DNA TOPOISOMERASES: Structure, Function, and Mechanism. Annual Review of Biochemistry 2001; 70, 369-413.
15. Tomašić T, Peterlin Mašič L: Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases. Current Topics in Medicinal Chemistry 2014; 14 (1), 130-151.

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. Bisacchi GS, Manchester JI: A New-Class Antibacterial—Almost. Lessons in Drug Discovery and Development: A Critical Analysis of More than 50 Years of Effort toward ATPase Inhibitors of DNA Gyrase and Topoisomerase IV. *ACS Infectious Diseases* 2015; 1 (1), 4-41.
18. Zidar N, Macut H, Tomašić T, Brvar M, Montalvao S, Tammela P, Solmajer T, Peterlin Mašič L, Ilaš J, Kikelj D: *N*-Phenyl-4,5-dibromopyrrolamides and *N*-Phenylindolamides as ATP Competitive DNA Gyrase B Inhibitors: Design, Synthesis, and Evaluation. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58 (15), 6179-6194.
19. Tomašić T, Katsamakas S, Hodnik Ž, Ilaš J, Brvar M, Solmajer T, Montalvao S, Tammela P, Banjanac M, Ergovic G, Anderluh M, Peterlin Mašič L, Kikelj D: Discovery of 4,5,6,7-Tetrahydrobenzo[1,2-d]thiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors Targeting the ATP-Binding Site. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58 (14), 5501-5521.
20. Mayer C, Janin, YL: Non-quinolone inhibitors of bacterial type IIA topoisomerases: a feat of bioisosterism. *Chemical reviews* 2014; 114 (4), 2313-2342.
21. Zhang J, Yang Q, Cross JB, Romero JA, Poutsiaka KM, Epie F, Bevan D, Wang B, Zhang Y, Chavan A, Zhang X, Moy T, Daniel A, Nguyen K, Chamberlain B, Carter N, Shotwell J, Silverman J, Metcalf CA, Ryan D, Lippa B, Dolle RE: Discovery of Azaindole Ureas as a Novel Class of Bacterial Gyrase B Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58 (21), 8503-8512.
22. Basarab GS, Hill PJ, Garner CE, Hull K, Green O, Sherer BA, Dangel PB, Manchester JI, Bist S, Hauck S, Zhou F, Uria-Nickelsen M, Illingworth R, Alm R, Rooney M, Eakin AE: Optimization of pyrrolamide topoisomerase II inhibitors toward identification of an antibacterial clinical candidate (AZD5099). *Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 57 (14), 6060-6082.
23. Richards JJ, Ballard TE, Huigens RW, Melander C: Synthesis and screening of an oroidin library against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *ChemBioChem* 2008; 9 (8), 1267-1279.
24. Rao H, Fu H, Jiang Y, Zhao Y: Easy copper-catalyzed synthesis of primary aromatic amines by couplings aromatic boronic acids with aqueous ammonia at room temperature. *Angewandte Chemie International Edition in English* 2009; 48 (6), 1114-1116.

25. Charrier C, Clarhaut J, Gesson JP, Estiu G, Wiest O, Roche J, Bertrand P: Synthesis and modeling of new benzofuranone histone deacetylase inhibitors that stimulate tumor suppressor gene expression. *Journal of Medicinal Chemistry* 2009; 52 (9), 3112-3115.
26. Vanderhaeghe H: The preparation of sparingly soluble penicillin salts. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1954; 6 (1), 55-59.
27. Murphy NS, Prabhakaran P, Azzarito V, Plante JP, Hardie MJ, Kilner CA, Warriner SL, Wilson AJ: Solid-phase methodology for synthesis of O-alkylated aromatic oligoamide inhibitors of alpha-helix-mediated protein-protein interactions. *Chemistry* 2013; 19 (18), 5546-5550.
28. Ekici OD, Li ZZ, Campbell AJ, James KE, Asgian JL, Mikolajczyk J, Salvesen GS, Ganesan R, Jelakovic S, Grutter MG, Powers JC: Design, synthesis, and evaluation of azapeptide Michael acceptors as selective and potent inhibitors of caspases-2, -3, -6, -7, -8, -9, and -10. *Journal of Medicinal Chemistry* 2006; 49 (19), 5728-5749.
29. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmacevtska kemija III. Vaje in seminarji: Dodatne vsebine za razumevanje, Metode N- in O- aciliranja, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
30. Tišler M: Organska kemija 3. izdaja, DZS, Ljubljana, 1988: 128-129, 159-172.
31. Montalbetti CAGN, Falque V: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* 2005; 61 (46), 10827-10852.
32. <http://www.masterorganicchemistry.com/2011/12/03/reagent-friday-thionyl-chloride-socl2/> (dostopano 24.6.2016).
33. <http://www.chemguide.co.uk/mechanisms/addelim/alcohol.html> (dostopano 24.6.2016).
34. Movassagh B, Balalaie S, Pershang S: 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-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU) *ARKIVOC* 2007; 13, 47-52.
35. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Amine_to_Amide_Coupling/Amine_to_Amide_Coupling_HATU_Mech.htm (dostopano 24.6.2016).
36. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmacevtska kemija III. Vaje in seminarji: Dodatne vsebine za razumevanje, Zaščitne skupine, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
37. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Mech.htm (dostopano 6.9.2016).

38. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_HCl_Mech.htm (dostopano 3.9.2016).
39. <http://instruct.uwo.ca/chemistry/373f/Nifty%20Stuff/Michael%20Reaction.htm> (dostopano 24.1.2017).
40. 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.
41. Mdluli KE, Witte PR, Kline T, Barb AW, Erwin AL, Mansfield BE, McClerren AL, Pirrung MC, Tumey LN, Warrenner P, Raetz CR, Stover CK: Molecular Validation of LpxC as an Antibacterial Drug Target in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50 (6), 2178-2184.
42. Walker DP, Wishka DG, Piotrowski DW, Jia S, Reitz SC, Yates KM, Myers JK, Vetman TN, Margolis BJ, Jacobsen EJ, Acker BA; Groppi VE, Wolfe ML; Thornburgh BA, Tinholt PM, Cortes-Burgos LA, Walters RR, Hester MR, Seest EP, Dolak LA, Han F, Olson BA, Fitzgerald L, Staton BA, Raub TJ, Hajos M, Hoffmann WE, Li KS, Higdon NR, Wall TM, Hurst RS, Wong EH, Rogers BN: Design, synthesis, structure-activity relationship, and in vivo activity of azabicyclic aryl amides as $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2006; 14 (24), 8219-8248.
43. Cheung WS, Calvo RR, Tounge BA, Zhang SP, Stone DR, Brandt MR, Hutchinson T, Flores CM, Player MR: Discovery of piperidine carboxamide TRPV1 antagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2008; 18 (16), 4569-4572.

8. PRILOGE

Priloga 1: Ostali sintezni postopki in analizni podatki

Metil 4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-2-hidroksibenzoat (8b). Delamo po splošnem postopku A, le da za aktivacijo kisline uporabimo 2 M raztopino oksalil klorida v diklorometanu (2,40 mL, 4,74 mmol). Del spojine dobljen z odparevanjem organske faze po ekstrakciji in odnučani del spojine združimo ter čistimo s prelivanjem z dietil etrom (10 mL), nastalo suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietil etrom (2 × 5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije: 61 %; svetlo rjavi kristali (200 mg); tališče: 258-261 °C, Rf (etil acetat/petroleter = 2/1): 0,72; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3,88 (s, 3H, CH₃), 7,26 (dd, 1H, ³*J* = 8,8 Hz, ⁴*J* = 2,0 Hz, Ar-H-5), 7,29 (d, 1H, ⁴*J* = 2,8 Hz, Pyrr-CH), 7,54 (d, 1H, ⁴*J* = 2,0 Hz, Ar-H-3), 7,77 (d, 1H, ³*J* = 8,8 Hz, Ar-H-6), 10,05 (s, 1H, CONH), 10,65 (s, 1H, OH), 13,02 (d, 1H, ⁴*J* = 2,4 Hz, Pyrr-NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 52,23 (CH₃), 98,33, 106,64, 106,88, 107,47, 110,97, 114,55, 127,62, 130,67, 145,41, 157,55, 161,05, 169,01; IR (ATR) ν = 3385, 3228, 3120, 2953, 1670, 1524, 1433, 1343, 1208, 1094, 975, 875, 808, 753, 617 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* = 414,9 ([M-H]⁻). HRMS za C₁₃H₉Br₂N₂O₄: izračunan 414,8929, izmerjen 414,8921; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm, 4,6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL; retencijski čas: 12,120 min (95,5 % pri 280 nm).

4-(4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-2-hidroksibenzojska kislina (9b). Delamo po splošnem postopku B, le da po ponovnem dodatku 1 M NaOH (0,576 mL, 0,576 mmol) mešamo čez noč pri 60 °C. Izkoristek reakcije: 53 %; svetlo rjava trdna snov (31 mg); tališče: >300 °C; Rf (diklorometan/metanol/ocetna kislina = 20/1/0,01): 0,15; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,23 (dd, 1H, ³*J* = 8,8 Hz, ⁴*J* = 2,0 Hz, Ar-H-5), 7,29 (d, 1H, ⁴*J* = 2,8 Hz, Pyrr-CH), 7,50 (d, 1H, ⁴*J* = 2,0 Hz, Ar-H-3), 7,75 (d, 1H, ³*J* = 8,8 Hz, Ar-H-6), 10,03 (s, 1H, CONH), 11,39 (s, 1H, OH), 13,02 (d, 1H, ⁴*J* = 2,4 Hz, Pyrr-NH), 13,73 (br s, 1H, COOH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 98,31, 106,44, 106,81, 107,68, 110,72, 114,50, 127,46, 130,91, 145,32, 157,54, 161,95, 171,60; IR (ATR) ν = 3388, 3233, 3111, 2652, 2558, 1653, 1509, 1390, 1249, 1155, 982, 834, 746, 646 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* = 400,9 ([M-H]⁻). HRMS za C₁₂H₇Br₂N₂O₄: izračunan 400,8773, izmerjen 400,8777; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm, 4,6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16

min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 µL; retencijski čas: 9,466 min (95,7 % pri 280 nm).

Metil 4-(4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzamido)-2-hidroksibenzoat (13). Delamo po splošnem postopku A, le da za aktivacijo kisline uporabimo 2 M raztopino oksalil klorida v diklorometanu (3,80 mL, 7,55 mmol). Del spojine po ekstrakciji in odnučani del spojine združimo ter čistimo s prelivanjem z acetonitrilom (20 mL), stresamo na ultrazvoku, segrevamo do vrenja, oborino odnučamo, speremo z acetonitrilom (2 × 5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije: 60 %; sivo bela trdna snov (326 mg); tališče: >300 °C, R_f (etil acetat/petroleter = 2/1): 0,58; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 3,89 (s, 3H, CH₃), 7,30 (d, 1H, ⁴*J* = 2,4 Hz, Pyr-CH), 7,37 (dd, 1H, ³*J* = 8,8 Hz, ⁴*J* = 2,0 Hz, Ar-H-5), 7,59 (d, 1H, ⁴*J* = 2,0 Hz, Ar-H-3), 7,78 (d, 1H, ³*J* = 8,8 Hz, Ar-H-6), 7,89 (d, 2H, ³*J* = 8,8 Hz, Ar-H-2',6'), 7,98 (d, 2H, ³*J* = 8,8 Hz, Ar-H-3',5'), 10,13 (s, 1H, CONH/OH), 10,40 (s, 1H, CONH/OH), 10,65 (s, 1H, CONH/OH), 13,01 (d, 1H, ⁴*J* = 2,0 Hz, Pyr-NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 52,23 (CH₃), 98,29, 106,56, 106,97, 107,54, 111,31, 114,30, 118,98, 127,58, 128,81, 130,56, 142,25, 145,85, 157,47, 161,06, 165,45, 169,05 (pri aromatskih signalih se dva signala prekrivata, zato se enega signala ne vidi); IR (ATR) ν = 3444, 3357, 3194, 2964, 1658, 1504, 1406, 1324, 1275, 1185, 1092, 972, 826, 779, 684 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* = 533,9 ([M-H]⁻). HRMS za C₂₀H₁₅Br₂N₃O₅: izračunan 533,9300, izmerjen 533,9299; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 µm, 4,6 mm × 150 mm); mobilna faza: 60-90% metanola v 0,1% TFA v 16 min, 90% metanola do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 µL; retencijski čas: 11,480 min (95,9 % pri 280 nm).

4-(4-(4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzamido)-2-hidroksibenzojska kislina (14). Delamo po splošnem postopku B, le da izhodno spojino (**13**, 80 mg, 0,149 mmol) raztopimo le v THF (15 mL), po ponovnem dodatku 1 M NaOH (0,60 mL, 0,60 mmol) pa mešamo čez noč pri 60 °C. Surov produkt (76 mg) očistimo s prelivanjem z metanolom (20 mL), stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo in speremo z metanolom (2 × 10 mL), nato pa prelijemo še z dietil etrom (20 mL), stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietil etrom (2 × 10 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije: 64 %; blede rumena trdna snov (50 mg); tališče: > 300 °C; R_f (etil acetat/petroleter/ocetna kislina = 2/1/0,01): 0,24; ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 7,30 (d, 1H, ⁴*J* = 2,8 Hz, Pyr-CH), 7,35 (dd, 1H, ³*J* = 8,8 Hz, ⁴*J* = 2,0 Hz, Ar-H-5), 7,55 (d, 1H, ⁴*J* = 2,4 Hz, Ar-H-3), 7,76 (d, 1H, ³*J* = 8,4 Hz, Ar-H-6), 7,88 (d, 2H, ³*J* = 9,2 Hz, Ar-H-2',6'), 7,98 (d, 2H, ³*J* = 8,8 Hz, Ar-H-3',5'), 10,13 (s, 1H,

CONH/OH), 10,37 (s, 1H, CONH/OH), 11,38 (s, 1H, CONH/OH), 13,01 (d, 1H, $^4J = 2,8$ Hz, Pyrr-NH), 13,73 (br s, 1H, COOH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 98,30, 106,55, 106,77, 107,77, 111,06, 114,29, 118,98, 127,58, 128,79, 128,87, 130,80, 142,21, 145,74, 157,46, 161,94, 165,43, 171,62; IR (ATR) $\nu = 3406, 3226, 3110, 2547, 1644, 1498, 1334, 1229, 1111, 973, 892, 740, 671\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 519,9$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$). HRMS za $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_5$: izračunan 519,9144, izmerjen 519,9133; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL ; retencijski čas: 10,212 min (96,5 % pri 280 nm).

Metil (3-izopropoksi-4-nitrobenzoil)-L-alaninat (18b). Delamo po splošnem postopku E, le da uporabimo metilni ester L-alanina (**16b**, 0,781 g, 5,60 mmol). Izkoristek reakcije: 78 %; rumeni kristali (1,13 g); tališče: 91-93 $^{\circ}\text{C}$; R_f (diklorometan/metanol = 10/1): 0,85; ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 1,43 (d, 6H, $^3J = 6,0$ Hz, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 1,57 (d, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CH_3), 3,84 (s, 3H, COOCH_3), 4,76-4,85 (m, 2H, $2 \times \text{CH}$), 6,82 (d, 1H, $^3J = 6,4$ Hz, NH), 7,31 (dd, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 1,6$ Hz, Ar-H-6), 7,62 (d, 1H, $^4J = 1,6$ Hz, Ar-H-2), 7,81 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, Ar-H-5); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 16,66 (CH_3), 21,54 ($2 \times \text{CH}_3$), 48,48 (CH_3), 51,98 (CH), 72,43 (CH), 115,09, 119,55, 124,74, 138,16, 142,33, 149,69, 164,47, 172,86; IR (ATR) $\nu = 3337, 3306, 2992, 1715, 1655, 1602, 1517, 1455, 1364, 1253, 1176, 1077, 980, 844, 744, 692\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 309,26$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$).

Metil (4-amino-3-izopropoksibenzoil)-L-fenilalaninat (19a). Delamo po splošnem postopku C, le da kot topilo uporabimo samo metanol (40 mL). Izkoristek reakcije: 82 %; rjav oljnat produkt (901 mg); R_f (etil acetat/petroleter = 1/1): 0,34; $[\alpha]_D^{25} -77,4$ (c 0,593, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,27-1,30 (m, 6H, $\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 3,04-3,15 (m, 2H, CH_2), 3,62 (s, 3H, COOCH_3), 4,49-4,61 (m, 2H, $2 \times \text{CH}$), 5,23 (s, 2H, NH_2), 6,61 (d, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, Ar-H-5'), 7,17-7,31 (m, 7H, $5 \times \text{Ar-H}$, Ar-H-2',6'), 8,39 (d, 1H, $^3J = 7,6$ Hz, NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 21,83 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 21,98 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 36,32 (CH_2), 51,78 (CH_3), 54,23 (CH), 70,26 ($\text{CH}(\text{CH}_3)_2$), 112,41, 113,04, 120,61, 121,54, 126,40, 128,16, 129,07, 137,87, 142,57, 142,92, 166,30, 172,65; IR (ATR) $\nu = 3484, 3337, 3029, 2977, 2951, 1733, 1613, 1538, 1496, 1359, 1296, 1210, 1113, 981, 823, 759, 700\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 379,28$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Metil (4-amino-3-izopropoksibenzoil)-L-alaninat (19b). Delamo po splošnem postopku C, le da kot topilo uporabimo samo metanol (40 mL). Produkt čistimo s kolonsko

kromatografijo (MF: etil acetat/petroleter = 1/1). Izkoristek reakcije: 95 %; rumen oljnat produkt (909 mg); R_f (etil acetat/petroleter = 2/1): 0,48; $[\alpha]_D^{25} +27,7$ (c 0,243, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,27-1,30 (m, 6H, CH(CH $_3$) $_2$), 1,38 (d, 3H, $^3J = 7,6$ Hz, CH $_3$), 3,63 (s, 3H, COOCH $_3$), 4,42 (quint, 1H, $^3J = 6,8$ Hz, CONHCH), 4,56 (spt, 1H, $^3J = 6,0$ Hz, CH(CH $_3$) $_2$), 5,24 (s, 2H, NH $_2$), 6,63 (d, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, Ar-H-5), 7,33 (dd, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz, Ar-H-6), 7,36 (d, 1H, $^4J = 1,6$ Hz, Ar-H-2), 8,33 (d, 1H, $^3J = 6,8$ Hz, NHCH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 16,86 (CH $_3$), 21,91 (CH(CH $_3$) $_2$), 21,95 (CH(CH $_3$) $_2$), 48,10 (CH $_3$), 51,72 (CH), 70,37 (CH(CH $_3$) $_2$), 112,44, 113,22, 120,64, 121,66, 142,63, 142,97, 166,09, 173,62; IR (ATR) $\nu = 3480, 3340, 2978, 2938, 1736, 1613, 1540, 1501, 1453, 1302, 1210, 1111, 1051, 979, 859, 764\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 303,19$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Metil (4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-izopropoksibenzoil)-L-fenilalaninat (20a). Delamo po splošnem postopku A, le da za aktivacijo kisline uporabimo 2 M raztopino oksalil klorida v diklorometanu (4,21 mL, 8,42 mmol), med ekstrakcijo pa ne nastane oborina. Surov produkt čistimo s prelivanjem z dietil etrom (10 mL), oborino odnučamo in speremo z dietil etrom (5 mL) in s prelivanjem z metanolom (10 mL), oborino odnučamo, speremo z metanolom (5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije: 60 %; beli kristali (458 mg); tališče: 178-180 °C; R_f (diklorometan/metanol = 10/1): 0,84; $[\alpha]_D^{25} -58,9$ (c 0,291, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,32-1,36 (m, 6H, CH(CH $_3$) $_2$), 3,09 (dd, 1H, $^2J = 13,6$ Hz, $^3J = 10,4$ Hz, H $_A$ iz CH $_2$), 3,18 (dd, 1H, $^2J = 13,6$ Hz, $^3J = 5,2$ Hz, H $_B$ iz CH $_2$), 3,65 (s, 3H, COOCH $_3$), 4,63-4,71 (m, 2H, 2 $\times$ CH), 7,17-7,33 (m, 6H, 5 $\times$ Ar-H, Pyrr-CH), 7,41-7,45 (m, 2H, 2 $\times$ Ar-H), 7,89 (d, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, Ar-H-5'), 8,82 (d, 1H, $^3J = 7,6$ Hz, CONHCH), 9,04 (s, 1H, CONHAr), 13,02 (d, 1H, $^4J = 2,4$ Hz, Pyrr-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 21,61 (CH(CH $_3$) $_2$), 21,77 (CH(CH $_3$) $_2$), 36,27 (CH $_2$), 51,95 (CH $_3$), 54,29 (CH), 71,26 (CH(CH $_3$) $_2$), 98,42, 106,31, 112,84, 113,85, 119,83, 122,60, 126,49, 127,57, 128,21, 129,10, 129,97, 130,49, 137,67, 148,21, 157,01, 165,76, 172,24; IR (ATR) $\nu = 3414, 3284, 3230, 2980, 1749, 1633, 1522, 1421, 1315, 1208, 1130, 974, 795, 702\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 604,0$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$). HRMS za C $_{25}\text{H}_{24}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_5$: izračunan 604,0083, izmerjen 604,0082; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL ; retencijski čas: 14,611 min (95,6 % pri 280 nm).

Metil (4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-izopropoksibenzoil)-L-alaninat (20b). Delamo po splošnem postopku A, le da za aktivacijo kisline uporabimo 2 M raztopino

oksalil klorida v diklorometanu (4,55 mL, 9,10 mmol), med ekstrakcijo pa ne nastane oborina. Surov produkt čistimo s prelivanjem z dietil etrom (10 mL), oborino odnučamo in speremo z dietil etrom (5 mL) in s prelivanjem z metanolom (10 mL), oborino odnučamo, speremo z metanolom (5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije: 58 %; beli kristali (479 mg); tališče: 167-170 °C, Rf (diklorometan/metanol = 10/1): 0,65; $[\alpha]_D^{25} +15,8$ (c 0,367, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,33-1,35 (m, 6H, CH(CH $_3$) $_2$), 1,42 (d, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CH $_3$), 3,66 (s, 3H, COOCH $_3$), 4,49 (quint, 1H, $^3J = 7,2$ Hz, CONHCH), 4,71 (spt, 1H, $^3J = 6,0$ Hz, CH(CH $_3$) $_2$), 7,18 (d, 1H, $^4J = 2,8$ Hz, Pyrr-CH), 7,53 (dd, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 2,0$ Hz, Ar-H-6), 7,57 (d, 1H, $^4J = 1,6$ Hz, Ar-H-2), 7,93 (d, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, Ar-H-5), 8,76 (d, 1H, $^3J = 6,8$ Hz, CONHCH), 9,05 (s, 1H, CONHAr), 13,02 (d, 1H, $^4J = 2,8$ Hz, Pyrr-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 16,76 (CH $_3$), 21,71 (CH(CH $_3$) $_2$), 21,74 (CH(CH $_3$) $_2$), 48,30 (CH $_3$), 51,87 (CH), 71,28 (CH(CH $_3$) $_2$), 98,43, 106,32, 113,01, 113,84, 120,01, 122,48, 127,58, 129,92, 130,62, 148,21, 157,01, 165,54, 173,24; IR (ATR) $\nu = 3422, 3278, 3224, 2992, 2954, 1731, 1633, 1517, 1479, 1389, 1275, 1108, 976, 821, 744\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 528,0$ ([M-H] $^-$). HRMS za C $_{19}$ H $_{20}$ Br $_2$ N $_3$ O $_5$: izračunan 527,9770, izmerjen 527,9770; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL ; retencijski čas: 12,264 min (96,1 % pri 280 nm).

Metil (4-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-3-izopropoksibenzoil)-L-fenilalaninat (20c). Delamo po splošnem postopku A, le da kot reagent uporabimo 3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksilno kislino (261 mg, 1,35 mmol), za aktivacijo kisline pa 2 M raztopino oksalil klorida v diklorometanu (3,37 mL, 6,73 mmol). 3,4-Dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksilna kislina je na začetku le suspendirana v diklorometanu, med reakcijo pa nastane raztopina. Del spojine dobljen z odparevanjem organske faze po ekstrakciji in odnučani del spojine združimo ter čistimo s prelivanjem z dietil etrom (10 mL), nastalo suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietil etrom (2 $\times$ 5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije: 81 %; bela trdna snov (481 mg); tališče: 202-204 °C, Rf (diklorometan/metanol = 20/1): 0,69; $[\alpha]_D^{25} -67,4$ (c 0,312, DMF); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,35-1,38 (m, 6H, CH(CH $_3$) $_2$), 2,24 (s, 3H, Pyrr-CH $_3$), 3,10 (dd, 1H, $^2J = 13,6$ Hz, $^3J = 10,4$ Hz, H $_A$ iz CH $_2$), 3,19 (dd, 1H, $^2J = 13,6$ Hz, $^3J = 5,2$ Hz, H $_B$ iz CH $_2$), 3,66 (s, 3H, COOCH $_3$), 4,63-4,69 (m, 1H, CONHCH), 4,83 (spt, 1H, $^3J = 6,0$ Hz, CH(CH $_3$) $_2$), 7,19-7,34 (m, 5H, 5 $\times$ Ar-H), 7,46-7,50 (m, 2H, 2 $\times$ Ar-H), 8,45 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, Ar-H-

5'), 8,80 (d, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, Ar-CONHCH), 9,24 (s, 1H, CONHAr), 12,46 (s, 1H, Pyrr-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 10,76 (Pyrr-CH $_3$), 21,66 (CH $_3$), 21,84 (CH $_3$), 36,31 (CH $_2$), 51,94 (CH $_3$), 54,31 (CH), 71,26 (CH), 108,59, 109,73, 111,56, 117,98, 118,63, 120,39, 126,49, 128,21, 128,42, 129,10, 129,79, 131,12, 137,65, 145,11, 156,20, 165,66, 172,27; IR (ATR) $\nu = 3360, 3258, 2982, 1740, 1647, 1526, 1495, 1318, 1263, 1171, 1030, 936, 830, 700\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 530,1$ ([M-H] $^-$). HRMS za C $_{26}$ H $_{26}$ Cl $_2$ N $_3$ O $_5$: izračunan 530,1250, izmerjen 530,1264; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL ; retencijski čas: 16,430 min (97,7 % pri 280 nm).

Metil (4-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-3-izopropoksibenzoil)-L-alaninat (20d). Delamo po splošnem postopku A, le da kot reagent uporabimo 3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksilno kislino (332 mg, 1,23 mmol), za aktivacijo kisline pa 2 M raztopino oksalil klorida v diklorometanu (4,28 mL, 6,17 mmol). 3,4-Dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksilna kislina je na začetku le suspendirana v diklorometanu, med reakcijo pa nastane raztopina. Del spojine dobljen z odparevanjem organske faze po ekstrakciji in odnučani del spojine združimo ter čistimo s kristalizacijo iz acetonitrila (15 mL). Izkoristek reakcije: 70 %; beli kristali (455 mg); tališče: 215-218 $^{\circ}\text{C}$; Rf (diklorometan/metanol = 20/1): 0,39; $[\alpha]_D^{25}$ 28,7 (c 0,267, DMF); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,35-1,38 (m, 6H, CH(CH $_3$) $_2$), 1,42 (d, 3H, $^3J = 7,6$ Hz, CH $_3$), 2,42 (s, 3H, Pyrr-CH $_3$), 3,66 (s, 3H, COOCH $_3$), 4,49 (quint, 1H, $^3J = 7,2$ Hz, CONHCH), 4,86 (spt, 1H, $^3J = 6,0$ Hz, CH(CH $_3$) $_2$), 7,56 (dd, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 1,6$ Hz, Ar-H-6), 7,61 (d, 1H, $^4J = 1,6$ Hz, Ar-H-2), 8,47 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, Ar-H-5), 8,74 (d, 1H, $^3J = 6,8$ Hz, CONHCH), 9,26 (s, 1H, CONHAr), 12,45 (s, 1H, Pyrr-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 10,75 (Pyrr-CH $_3$), 16,77 (CH $_3$), 21,77 (CH(CH $_3$) $_2$), 21,80 (CH(CH $_3$) $_2$), 48,31 (CH $_3$), 51,86 (CH), 71,31 (CH(CH $_3$) $_2$), 108,60, 109,72, 111,68, 117,96, 118,64, 120,54, 128,40, 129,78, 131,22, 145,16, 156,21, 165,45, 173,26; IR (ATR) $\nu = 3361, 3304, 3257, 2992, 2901, 1738, 1632, 1520, 1416, 1308, 1215, 1106, 975, 830, 750, 652\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 454,1$ ([M-H] $^-$). HRMS za C $_{20}$ H $_{22}$ Cl $_2$ N $_3$ O $_5$: izračunan 454,0937, izmerjen 454,0926; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL ; retencijski čas: 14,083 min (99,3 % pri 280 nm).

(4-(4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-izopropoksibenzoil)-L-fenilalanin (21a).

Delamo po splošnem postopku F, le da kot topilo uporabimo samo metanol (10 mL) ter da naslednji dan dodamo še 2 ekvivalenta 1 M NaOH (0,20 mL) in mešamo še 4 h pri sobni temperaturi. Izkoristek reakcije: 94 %; bela trdna snov (55 mg); tališče: 203-206 °C, Rf (diklorometan/metanol/ocetna kislina = 20/1/0,01): 0,31; $[\alpha]_D^{25}$ -39,0 (c 0,258, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,32-1,35 (m, 6H, CH(CH $_3$) $_2$), 3,06 (dd, 1H, 2J = 14,0 Hz, 3J = 10,8 Hz, H $_A$ iz CH $_2$), 3,20 (dd, 1H, 2J = 14,0 Hz, 3J = 4,4 Hz, H $_B$ iz CH $_2$), 4,58-4,71 (m, 2H, 2 $\times$ CH), 7,16-7,21 (m, 2H, Ar-H, Pyrr-CH), 7,24-7,35 (m, 4H, 4 $\times$ Ar-H), 7,41-7,45 (m, 2H, 2 $\times$ Ar-H), 7,88 (d, 1H, 3J = 8,0 Hz, Ar-H-5'), 8,69 (d, 1H, 3J = 8,0 Hz, NHCH), 9,03 (s, 1H, CONHAr), 12,79 (s, 1H, COOH), 13,01 (d, 1H, 4J = 2,8 Hz, Pyrr-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 21,60 (CH $_3$), 21,78 (CH $_3$), 36,33 (CH $_2$), 54,19 (CH), 71,24 (CH), 98,41, 106,28, 112,84, 113,83, 119,77, 122,61, 126,35, 127,58, 128,15, 129,09, 130,27, 130,35, 138,15, 148,21, 157,00, 165,67, 173,23; IR (ATR) ν = 3422, 3338, 3215, 2976, 1717, 1605, 1520, 1422, 1313, 1207, 1131, 972, 800, 745, 698 cm $^{-1}$; MS (ESI) m/z = 590,0 ([M-H] $^-$). HRMS za C $_{24}$ H $_{22}$ Br $_2$ N $_3$ O $_5$: izračunan 589,9926, izmerjen 589,9929; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μ m, 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μ L; retencijski čas: 12,830 min (95,5 % pri 280 nm).

(4-(4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-izopropoksibenzoil)-L-alanin (21b).

Delamo po splošnem postopku F, le da kot topilo uporabimo samo metanol (10 mL) ter da naslednji dan dodamo še 2 ekvivalenta 1 M NaOH (200 μ L) in mešamo še 4 h pri sobni T. Izkoristek reakcije: 74 %; sivo bela trdna snov (43 mg); tališče: 186-188 °C, Rf (diklorometan/metanol/ocetna kislina = 20/1/0,01): 0,11; $[\alpha]_D^{25}$ +15,4 (c 0,235, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,33-1,35 (m, 6H, CH(CH $_3$) $_2$), 1,41 (d, 3H, 3J = 7,6 Hz, CH $_3$), 4,43 (quint, 1H, 3J = 7,2 Hz, CONHCH), 4,71 (spt, 1H, 3J = 6,0 Hz, CH(CH $_3$) $_2$), 7,17 (d, 1H, 4J = 2,8 Hz, Pyrr-CH), 7,53 (dd, 1H, 3J = 8,0 Hz, 4J = 1,6 Hz, Ar-H-6), 7,58 (d, 1H, 4J = 1,6 Hz, Ar-H-2), 7,93 (d, 1H, 3J = 8,0 Hz, Ar-H-5), 8,64 (d, 1H, 3J = 7,2 Hz, CONHCH), 9,04 (s, 1H, CONHAr), 12,56 (s, 1H, COOH), 13,02 (d, 1H, 4J = 2,4 Hz, Pyrr-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 16,92 (CH $_3$), 21,72 (CH(CH $_3$) $_2$), 21,75 (CH(CH $_3$) $_2$), 48,15 (CH), 71,37 (CH(CH $_3$) $_2$), 98,43, 106,30, 113,02, 113,82, 119,99, 122,48, 127,60, 130,22, 130,50, 148,20, 157,01, 165,41, 174,27; IR (ATR) ν = 3416, 3204, 1974, 2935, 1728, 1667, 1512, 1484, 1351, 1265, 1162, 983, 798, 742 cm $^{-1}$; MS (ESI) m/z = 514,0 ([M-H] $^-$). HRMS za

C₁₈H₁₈Br₂N₃O₅: izračunan 513,9613, izmerjen 513,9598; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 µm, 4,6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 µL; retencijski čas: 10,552 min (96,0 % pri 280 nm).

(4-(3,4-Dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-izopropoksibenzoil)-L-alanin

(21d). Delamo po splošnem postopku F. Izkoristek reakcije: 85 %; bela trdna snov (58 mg); tališče: 219-221 °C; R_f (diklorometan/metanol/ocetna kislina = 20/1/0,01): 0,12; [α]_D²⁵ 37,1 (c 0,205, DMF); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,36-1,38 (m, 6H, CH(CH₃)₂), 1,41 (d, 3H, ³J = 7,6 Hz, CH₃), 2,24 (s, 1H, Pyrr-CH₃), 4,43 (quint, 1H, ³J = 7,2 Hz, CONHCH), 4,87 (spt, 1H, ³J = 6,0 Hz, CH(CH₃)₂), 7,56 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, Ar-H-6), 7,62 (d, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, Ar-H-2), 8,46 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, Ar-H-5), 8,62 (d, 1H, ³J = 7,2 Hz, CONHCH), 9,26 (s, 1H, CONHAr), 12,45 (s, 1H, Pyrr-NH), 12,62 (s, 1H, COOH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,75 (Pyrr-CH₃), 16,95 (CH₃), 21,78 (CH(CH₃)₂), 21,81 (CH(CH₃)₂), 48,16 (CH), 71,31 (CH(CH₃)₂), 108,59, 109,70, 111,69, 117,95, 118,65, 120,51, 128,69, 129,77, 131,11, 145,14, 156,20, 165,32, 174,29; IR (ATR) ν = 3360, 3248, 2980, 1739, 1647, 1529, 1416, 1318, 1256, 1109, 980, 833, 750, 651 cm⁻¹; MS (ESI) *m/z* = 440,1 ([M-H]⁻). HRMS za C₁₉H₂₀Cl₂N₃O₅: izračunan 440,0780, izmerjen 440,0787; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 µm, 4,6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 µL; retencijski čas: 12,107 min (99,1 % pri 280 nm).

Metil 3-hidroksi-4-nitrobenzoat (28). (42) Delamo po splošnem postopku D, le da uporabimo 3 ekvivalente SOCl₂ (5,90 mL, 81,3 mmol), za čiščenje pa uporabimo petroleter in postopek čiščenja ponovimo 2-krat. Izkoristek reakcije: 92 %; rumeni kristali (4,92 g); tališče: 87-88 °C (86-88 °C, lit. (28)), R_f (etil acetat/petroleter = 2/1): 0,63; ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3,99 (s, 3H, CH₃), 7,64 (dd, 1H, ³J = 8,8 Hz, ⁴J = 1,6 Hz, Ar-H-6), 7,86 (d, 1H, ⁴J = 1,6 Hz, Ar-H-2), 8,20 (d, 1H, ³J = 8,8 Hz, Ar-H-5), 10,53 (s, 1H, OH); IR (ATR) ν = 3309, 3053, 2961, 1720, 1623, 1586, 1434, 1321, 1220, 1146, 1097, 966, 842, 798, 743, 667 cm⁻¹.

3-(2-((*terc*-Butoksikarbonil)amino)etoksi)-4-nitrobenzojska kislina (30). Delamo po splošnem postopku F, le da kot topilo uporabimo samo metanol (40 mL), med ekstrakcijo pa organsko fazo 2-krat spiramo z nasičeno raztopino NaCl (2 × 10 mL). Izkoristek reakcije: 97 %; rumeni kristali (1,40 g); tališče: 156-159 °C; R_f (diklorometan/metanol/ocetna kislina

= 10/1/0,01): 0,48; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,37 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 3,29-3,34 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, signal se prekriva s signalom za vodo), 4,23 (t, 2H, $^3J = 5,6$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 6,96 (t, 1H, $^3J = 5,6$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 7,65 (dd, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 1,6$ Hz, Ar-H-6), 7,76 (d, 1H, $^3J = 1,6$ Hz, Ar-H-2), 7,96 (d, 1H, $^4J = 8,4$ Hz, Ar-H-5), 13,62 (br s, 1H, COOH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 28,14 ($3 \times \text{CH}_3$), 68,20 (CH_2), 77,80 (C), 115,45, 121,43, 125,05, 135,59, 142,23, 150,68, 155,57, 165,75 (signal za eno CH_2 skupino se prekriva s signalom za DMSO- d_6); IR (ATR) $\nu = 3275, 3080, 2977, 2935, 2821, 1721, 1686, 1608, 1558, 1534, 1440, 1363, 1276, 1252, 1161, 1117, 1001, 935, 838, 744, 675 \text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 325,27$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$).

Metil 3-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)etoksi)-4-nitrobenzoil)-L-fenilalaninat (31a).

Delamo po splošnem postopku E, le da kot izhodno spojino uporabimo spojino **30** (633 mg, 1,94 mmol). Surov produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (MF etil acetat/petroleter = 1/2 do 2/1). Izkoristek reakcije: 97 %; rumeno olje (921 mg); R_f (diklorometan/metanol = 10/1): 0,80; $[\alpha]_D^{25} -54,2$ (c 0,313, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,38 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 3,09 (dd, 1H, $^2J = 13,6$ Hz, $^3J = 10,0$ Hz, H_A iz CH_2Ph), 3,21 (dd, 1H, $^2J = 13,6$ Hz, $^3J = 5,2$ Hz, H_B iz CH_2Ph), 3,26-3,34 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, signal se prekriva s signalom za vodo), 3,66 (s, 3H, COOCH_3), 4,20 (t, 2H, $^3J = 5,6$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4,67-4,73 (m, 1H, CONHCH), 7,01 (t, 1H, $^3J = 5,2$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 7,18-7,32 (m, 5H, $5 \times \text{Ar-H}$), 7,49 (dd, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 1,2$ Hz, Ar-H-6'), 7,60 (d, 1H, $^4J = 1,2$ Hz, Ar-H-2'), 7,95 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, Ar-H-5'), 9,16 (d, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, CONHCH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 28,16 ($3 \times \text{CH}_3$), 36,26 (CH_2), 52,06 (CH_3), 54,35 (CH), 68,23 (CH_2), 77,84 (C), 113,82, 119,62, 125,02, 126,58, 128,26, 129,09, 137,38, 138,34, 141,13, 150,68, 155,62, 164,54, 171,81 (signal za eno CH_2 skupino se prekriva s signalom za DMSO- d_6); IR (ATR) $\nu = 3315, 3029, 2978, 1741, 1651, 1522, 1455, 1365, 1248, 1164, 1039, 872, 844, 744, 700 \text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 510,33$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Metil 3-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)etoksi)-4-nitrobenzoil)-L-alaninat (31b).

Delamo po splošnem postopku E, le da kot izhodni spojini uporabimo spojino **30** (626 mg, 1,92 mmol) in metilni ester L-alanina (**16b**, 321 mg, 2,30 mmol). Izkoristek reakcije: 94 %; rumeni kristali (741 mg); tališče: 138-140 °C; R_f (diklorometan/metanol = 10/1): 0,58; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,38 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 1,43 (d, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CHCH_3), 3,31 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, signal se prekriva s signalom za vodo), 3,67 (s, 3H, COOCH_3), 4,23 (t, 2H, $^3J = 5,6$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4,51 (quint, 1H, $^3J = 7,2$ Hz, CONHCH), 7,01 (t,

1H, $^3J = 5,6$ Hz, OCH₂CH₂NH), 7,60 (dd, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 1,6$ Hz, Ar-H-6), 7,74 (d, 1H, $^4J = 1,2$ Hz, Ar-H-2), 7,98 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, Ar-H-5), 9,09 (d, 1H, $^3J = 6,8$ Hz, CONHCH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 16,67 (CH₃), 28,16 (3 × CH₃), 48,48 (CH₃), 51,99 (CH), 68,28 (CH₂), 77,83 (C), 113,88, 119,78, 124,97, 138,32, 141,18, 150,76, 155,61, 164,36, 172,84 (signal za eno CH₂ skupino se prekriva s signalom za DMSO-*d*₆); IR (ATR) $\nu = 3340, 2982, 2873, 1709, 1650, 1522, 1449, 1359, 1234, 1166, 1043, 976, 844, 745, 620$ cm⁻¹; MS (ESI) $m/z = 434,25$ ([M+Na]⁺).

Metil (4-amino-3-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)etoksi)benzoil)-L-fenilalaninat (32a). Delamo po splošnem postopku C, le da kot topilo uporabimo samo metanol (30 mL). Izkoristek reakcije: 82 %; bela pena (706 mg); R_f (etil acetat/petroleter = 4/1): 0,53; $[\alpha]_D^{25} - 58,9$ (c 0,327, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,40 (s, 9H, 3 × CH₃), 3,04-3,15 (m, 2H, CH₂Ph), 3,36-3,41 (m, 2H, OCH₂CH₂NH, signal se prekriva s signalom za vodo), 3,62 (s, 3H, COOCH₃), 3,85-3,94 (m, 2H, OCH₂CH₂NH), 4,56-4,62 (m, 1H, CONHCH), 5,48 (s, 2H, NH₂), 6,57 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, Ar-H-5'), 7,16-7,31 (m, 8H, 7 × Ar-H, OCH₂CH₂NH), 8,39 (d, 1H, $^3J = 7,6$ Hz, CONHCH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 28,21 (3 × CH₃), 36,37 (CH₂), 51,77 (CH₃), 54,21 (CH), 67,38 (CH₂), 77,79 (C), 110,03, 111,72, 120,30, 121,63, 126,40, 128,18, 129,06, 137,84, 141,45, 144,20, 155,71, 166,25, 172,64 (signal za eno CH₂ skupino se prekriva s signalom za DMSO-*d*₆); IR (ATR) $\nu = 3344, 2977, 2935, 1732, 1695, 1616, 1508, 1455, 1364, 1225, 1165, 1097, 970, 869, 759, 701$ cm⁻¹; MS (ESI) $m/z = 480,34$ ([M+Na]⁺).

Metil (4-amino-3-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)etoksi)benzoil)-L-alaninat (32b). Delamo po splošnem postopku C, le da kot topilo uporabimo samo metanol (30 mL). Izkoristek reakcije: 96 %; rjavo olje (628 mg); R_f (etil acetat/petroleter = 4/1): 0,42; $[\alpha]_D^{25} + 14,8$ (c 0,329, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,38 (d, 3H, $^3J = 7,6$ Hz, CHCH₃), 1,40 (s, 9H, 3 × CH₃), 3,38-3,48 (m, 2H, OCH₂CH₂NH, signal se prekriva s signalom za vodo), 3,63 (s, 3H, COOCH₃), 3,92 (t, 2H, $^3J = 4,8$ Hz, OCH₂CH₂NH), 4,43 (q, 1H, $^3J = 7,2$ Hz, CONHCH), 5,52 (br s, 2H, NH₂), 6,61 (d, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, Ar-H-5), 7,20 (t, 1H, $^3J = 6,0$ Hz, OCH₂CH₂NH), 7,28 (d, 1H, $^4J = 1,6$ Hz, Ar-H-2), 7,33 (dd, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, $^4J = 1,6$ Hz, Ar-H-6), 8,33 (d, 1H, $^3J = 6,8$ Hz, CONHCH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 16,87 (CH₃), 28,21 (3 × CH₃), 48,11 (CH₃), 51,72 (CH), 67,46 (CH₂), 77,79 (CH), 110,06, 112,10, 120,73, 121,69, 140,90, 144,45, 155,70, 166,04, 173,60 (signal za eno CH₂ skupino se prekriva s signalom za DMSO-*d*₆); IR (ATR) $\nu = 3452, 3348, 2984, 2947, 2877, 1727, 1691,$

1543, 1507, 1437, 1366, 1299, 1230, 1158, 1048, 987, 882, 763 cm^{-1} ; MS (ESI) $m/z = 404,29$ ($[\text{M}+\text{Na}]^+$).

Metil (3-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)etoksi)-4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzoil)-L-fenilalaninat (33a). Delamo po splošnem postopku A, le da za aktivacijo kisline uporabimo 2 M raztopino oksalil klorida v diklorometanu (2,0 mL, 3.94 mmol), med ekstrakcijo pa ne nastane oborina. Surov produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: etil acetat/petroleter = 1/2 do 1/1) in s prelivanjem z mešanico dietil etra in heksana. Izkoristek reakcije: 36 %; sivo bela trdna snov (222 mg); tališče: 98-101 °C; Rf (etil acetat/petroleter = 1/1): 0,44; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} -57,5$ (c 0,337, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,36 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 3,09 (dd, 1H, $^2J = 13,6$ Hz, $^3J = 10,0$ Hz, H_A iz CH_2Ph), 3,18 (dd, 1H, $^2J = 13,6$ Hz, $^3J = 5,2$ Hz, H_B iz CH_2Ph), 3,44-3,46 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 3,64 (s, 3H, COOCH_3), 4,03-4,12 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4,64-4,69 (m, 1H, CONHCH), 7,18-7,33 (m, 6H, $5 \times \text{Ar-H}$, Pyr-CH), 7,40-7,47 (m, 3H, Ar-H-2',6', $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 8,21 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, Ar-H-5'), 8,81 (d, 1H, $^3J = 8,0$ Hz, CONHCH), 8,96 (s, 1H, CONHAr), 13,02 (d, 1H, $^4J = 2,8$ Hz, Pyr-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 28,11 ($3 \times \text{CH}_3$), 36,31 (CH_2), 51,94 (CH_3), 54,27 (CH), 68,87 (CH_2), 77,97 (C), 98,54, 106,72, 110,18, 114,18, 119,99, 120,16, 126,49, 127,27, 128,23, 128,93, 129,07, 129,92, 137,62, 147,67, 156,12, 157,11, 165,62, 172,23 (signal za eno CH_2 skupino se prekriva s signalom za DMSO- d_6); IR (ATR) $\nu = 2977, 1705, 1648, 1510, 1418, 1269, 1171, 1056, 974, 872, 755, 700$ cm^{-1} ; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL ; retencijski čas: 14,763 min (96,5 % pri 280 nm).

Metil (3-(2-((*tert*-butoksikarbonil)amino)etoksi)-4-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzoil)-L-alaninat (33b). Delamo po splošnem postopku A, le da kot reagent uporabimo 3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino (183 mg, 0,943 mmol), za aktivacijo kisline pa 2 M raztopino oksalil klorida v diklorometanu (2,40 mL, 4,72 mmol). 3,4-Dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksilna kislina je na začetku le suspendirana v diklorometanu, med reakcijo pa nastane raztopina. Del spojine, ki smo ga dobili po odparevanju organske faze po ekstrakciji združimo z odnučanim delom in surov produkt čistimo s prelivanjem z dietil etrom (15 mL). Suspenzijo stresamo na ultrazvoku, nastalo oborino odnučamo in speremo z dietil etrom (2×5 mL). Izkoristek reakcije: 49 %; sivo beli kristali (288 mg); tališče: 195-196 °C; Rf (diklorometan/metanol = 10/1): 0,67;

$[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 22,0 (*c* 0,213, DMF); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,38 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$), 1,43 (d, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CHCH_3), 2,24 (s, 3H, Pyrr- CH_3), 3,40-3,44 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$, signal se prekriva s signalom za vodo), 3,66 (s, 3H, COOCH_3), 4,21 (t, 2H, $^3J = 5,2$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4,49 (quint, 1H, $^3J = 7,2$ Hz, CONHCH), 7,13 (t, 1H, $^3J = 5,2$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 7,57-7,59 (m, 2H, Ar-H-2,6), 8,46 (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, Ar-H-5), 8,76 (d, 1H, $^3J = 6,8$ Hz, CONHCH), 9,25 (s, 1H, CONHAr), 12,41 (s, 1H, Pyrr-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 10,75 (Pyrr- CH_3), 16,79 (CH_3), 28,15 ($3 \times \text{CH}_3$), 48,30 (CH_3), 51,87 (CH), 67,26 (CH_2), 77,83 (C), 108,63, 110,13, 110,46, 117,92, 118,74, 120,75, 128,27, 129,60, 130,41, 146,32, 155,65, 156,46, 165,37, 173,27 (signal za eno CH_2 skupino se prekriva s signalom za DMSO- d_6); IR (ATR) $\nu = 3357, 3243, 2982, 1708, 1656, 1517, 1359, 1211, 1120, 1043, 978, 856, 759, 656 \text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 555,1$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$). HRMS za $\text{C}_{24}\text{H}_{30}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_7$: izračunan 555,1413, izmerjen 555,1414; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL ; retencijski čas: 13,055 min (99,6 % pri 280 nm).

(S)-2-(2-(3,4-Dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-5-((1-metoksi-1-oksopropan-2-il)karbamoil)fenoksi)etan-1-aminijev klorid (34b). Izkoristek reakcije: 89 %; svetlo rjavi kristali (34 mg); tališče: 210-213 $^{\circ}\text{C}$; Rf (diklorometan/metanol = 10/1): 0,0; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 14,3 (*c* 0,375, DMF); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,43 (d, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CH_3), 2,26 (s, 3H, Pyrr- CH_3), 3,32-3,43 (m, 2H, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$ – signal se prekriva s signalom za vodo), 3,66 (s, 3H, COOCH_3), 4,39 (t, 2H, $^3J = 4,8$ Hz, $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}$), 4,49 (quint, 1H, $^3J = 7,2$ Hz, CONHCH), 7,61-7,64 (m, 2H, $2 \times \text{Ar-H}$), 8,26 (s, 3H, NH_3^+), 8,41 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, Ar-H), 8,83 (d, 1H, $^3J = 6,8$ Hz, CONHCH), 9,26 (s, 1H, CONHAr), 12,52 (s, 1H, Pyrr-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 10,75 (CH_3), 16,74 (CH_3), 38,57 (CH_2), 48,36 (CH_3), 51,90 (CH), 65,10 (CH_2), 108,70, 110,27, 111,15, 118,63, 118,98, 120,97, 128,43, 129,30, 130,33, 146,13, 156,71, 165,38, 173,25; IR (ATR) $\nu = 3478, 3364, 3152, 3006, 2870, 1726, 1600, 1519, 1409, 1343, 1238, 1111, 1014, 927, 864, 763 \text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 455,1$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$). HRMS za $\text{C}_{19}\text{H}_{21}\text{Cl}_2\text{N}_4\text{O}_5$: izračunan 455,0889, izmerjen 455,0901; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL ; retencijski čas: 5,733 min (96,7 % pri 280 nm).

(3-(2-((*tert*-Butoksikarbonil)amino)etoksi)-4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-

karboksamido)benzoil)-L-fenilalanin (35a). Delamo po splošnem postopku J, le da kot topilo uporabimo samo metanol (7 mL), naslednji dan pa dodamo še 3 ekvivalente 1 M NaOH (0,394 mL, 0,394 mmol) in mešamo pri sobni T 4 ure. Izkoristek reakcije: 91 %; bela trdna snov (83 mg); tališče: 176-178 °C; Rf (etil acetat/petroleter/ocetna kislina = 2/1/0,01): 0,19; $[\alpha]_D^{25}$ -49,6 (*c* 0,308, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,36 (s, 9H, 3 $\times$ CH₃), 3,06 (dd, 1H, 2J = 13,6 Hz, 3J = 10,4 Hz, H_A iz CH₂Ph), 3,20 (dd, 1H, 2J = 13,6 Hz, 3J = 4,4 Hz, H_B iz CH₂Ph), 3,41-3,49 (m, 2H, OCH₂CH₂NH), 4,03-4,12 (m, 2H, OCH₂CH₂NH), 4,59-4,65 (m, 1H, CH), 7,16-7,36 (m, 6H, 5 $\times$ Ar-H, Pyrr-CH), 7,40-7,46 (m, 3H, Ar-H-2',6', OCH₂CH₂NH), 8,20 (d, 1H, 3J = 8,4 Hz, Ar-H-5'), 8,67 (d, 1H, 3J = 8,4 Hz, CONHCH), 8,95 (s, 1H, CONHAr), 12,79 (br s, 1H, COOH), 13,01 (d, 1H, 4J = 1,6 Hz, Pyrr-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 28,11 (3 $\times$ CH₃), 36,36 (CH₂), 54,16 (CH), 68,86 (CH₂), 77,97 (C), 98,52, 106,70, 110,15, 114,16, 119,99, 120,10, 126,35, 127,30, 128,17, 129,06, 129,25, 129,78, 138,10, 147,66, 156,12, 157,10, 165,54, 173,22 (signal za eno CH₂ skupino se prekriva s signalom za DMSO- d_6); IR (ATR) ν = 3283, 3104, 2970, 2934, 1719, 1646, 1520, 1408, 1350, 1251, 1162, 1047, 975, 859, 756, 700 cm⁻¹; MS (ESI) m/z = 691,0 ([M-H]⁻). HRMS za C₂₈H₂₉Br₂N₄O₇: izračunan 691,0403, izmerjen 691,0390; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μ m, 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μ L; retencijski čas: 13,148 min (97,3 % pri 280 nm).

(S)-2-(5-((1-Karboksi-2-feniletil)karbamoi)-2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-

karboksamido)fenoksi)etan-1-aminijev klorid (36a). Delamo po splošnem postopku I, le da ne uporabimo THF kot sotopila. Izkoristek reakcije: 93 %; bela trdna snov (37 mg); tališče: 188-191 °C; Rf (diklorometan/metanol = 10/1): 0; $[\alpha]_D^{25}$ -33,5 (*c* 0,237, MeOH); ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 3,08 (dd, 1H, 2J = 13,6 Hz, 3J = 10,8 Hz, H_A iz CH₂Ph), 3,21 (dd, 1H, 2J = 13,6 Hz, 3J = 4,4 Hz, H_B iz CH₂Ph), 3,40-3,52 (m, 2H, OCH₂CH₂NH), 4,29 (t, 2H, 3J = 4,4 Hz, OCH₂CH₂NH), 4,60-4,66 (m, 1H, CH), 7,17-7,43 (m, 6H, 5 $\times$ Ar-H, Pyrr-CH), 7,47 (d, 1H, 4J = 1,2 Hz, Ar-H), 7,51 (dd, 1H, 3J = 8,4 Hz, 4J = 1,6 Hz, Ar-H), 8,04 (d, 1H, 3J = 8,4 Hz, Ar-H), 8,20 (br s, 3H, NH₃⁺), 8,74 (d, 1H, 3J = 8,4 Hz, CONHCH), 9,40 (s, 1H, CONHAr), 12,84 (br s, 1H, COOH/Pyrr-NH), 13,09 (br s, 1H, COOH/Pyrr-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 36,30 (CH₂), 38,35 (CH₂), 54,23 (CH), 64,82 (CH₂), 98,40, 106,27, 110,54, 115,01, 120,18, 122,14, 126,35, 127,49, 128,18, 129,07, 129,39, 129,83,

138,13, 147,97, 157,29, 165,47, 173,18; IR (ATR) ν = 3398, 3330, 3222, 3028, 2935, 1715, 1635, 1508, 1412, 1276, 1181, 1096, 973, 820, 748, 700 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z = 591,0 ([M-H]⁻). HRMS za C₂₃H₂₁Br₂N₄O₅: izračunan 590,9879, izmerjen 590,9886; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL ; retencijski čas: 6,889 min (95,4 % pri 280 nm).

(S)-2-(5-((1-Karboksietil)karbamoi)-2-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-

karboksamido)fenoksi)etan-1-aminijev klorid (36b). Delamo po splošnem postopku I. Izkoristek reakcije: 90 %; beli kristali (32 mg); tališče: 218-221 °C; R_f (diklorometan/metanol = 10/1): 0,0; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 28,3 (*c* 0,195, DMF); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,42 (d, 3H, ³*J* = 7,6 Hz, CH₃), 2,25 (s, 3H, Pyrr-CH₃), 3,23-3,33 (m, 2H, OCH₂CH₂NH – signal se prekriva s signalom za vodo), 4,37-4,43 (m, 3H, OCH₂CH₂NH, CH), 7,60-7,64 (m, 2H, 2 $\times$ Ar-H), 8,21 (br s, 3H, NH₃⁺), 8,41 (d, 1H, ³*J* = 8,4 Hz, Ar-H), 8,69 (d, 1H, ³*J* = 7,2 Hz, CONHCH), 9,24 (s, 1H, CONHAr), 12,50 (s, 1H, Pyrr-NH), signal za COOH skupino ni viden; ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,74 (CH₃), 16,89 (CH₃), 38,58 (CH₂), 48,22 (CH), 65,08 (CH₂), 108,69, 110,24, 111,10, 118,60, 118,99, 120,92, 128,72, 129,31, 130,22, 146,08, 156,71, 165,29, 174,26; IR (ATR) ν = 3610, 3369, 3148, 2885, 1735, 1522, 1411, 1348, 1255, 1206, 1115, 1015, 932, 871, 761 cm^{-1} ; MS (ESI) m/z = 441,1 ([M-H]⁻). HRMS za C₁₈H₁₉Cl₂N₄O₅: izračunan 441,0733, izmerjen 441,0723; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL ; retencijski čas: 4,438 min (98,9 % pri 280 nm).

terc-Butil (2-(2-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-5-((1-hidrazinil-1-okso)propan-2-il)karbamoi)fenoksi)etil)karbamat (37). Delamo po splošnem postopku G, le da naslednji dan dodamo še 10 ekvivalentov hidrazin monohidrata (311 μL , 5,11 mmol), mešamo 5 h pri 65 °C, nato pa 72 h pri sobni T. Nastalo suspenzijo ohladimo na ledu, oborino odnučamo, speremo z metanolom (2 $\times$ 5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije: 70 %; bela trdna snov (200 mg); tališče: 192-196 °C; R_f (diklorometan/metanol = 10/1): 0,37; $[\alpha]_{\text{D}}^{25}$ 92,4 (*c* 0,304, DMF); ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1,33 (d, 3H, ³*J* = 7,2 Hz, CH₃), 1,38 (s, 9H, 3 $\times$ CH₃), 2,24 (s, 3H, Pyrr-CH₃), 3,41 (signal se prekriva s signalom za vodo, 2H, OCH₂CH₂NH), 4,19-4,22 (m, 4H, OCH₂CH₂NH, NH₂), 4,47 (quint, 1H, ³*J* = 7,2 Hz, CONHCH), 7,13 (t, 1H, ³*J* = 5,2 Hz, OCH₂CH₂NH), 7,56-7,60 (m, 2H, 2 $\times$ Ar-H),

8,43-8,48 (m, 2H, Ar-H, CONHCH), 9,18 (s, 1H, NHNH₂/CONHAr), 9,23 (s, 1H, NHNH₂/CONHAr), 12,39 (s, 1H, Pyrr-NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,74, 18,16, 28,15, 47,64, 67,27, 77,85, 108,61, 110,30, 110,43, 117,84, 118,75, 120,82, 128,80, 129,56, 130,17, 146,19, 155,67, 156,45, 165,16, 171,78 (signal za eno CH₂ skupino se prekriva s signalom za DMSO-*d*₆); IR (ATR) ν = 3364, 3332, 3263, 2978, 2932, 1650, 1522, 1497, 1417, 1329, 1263, 1169, 1044, 979, 873, 747 cm⁻¹; MS (ESI) m/z = 555,1 ([M-H]⁻). HRMS za C₂₃H₂₉Cl₂N₆O₆: izračunan 555,1526, izmerjen 555,1536. HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μ m, 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μ L; retencijski čas: 9,102 min (97,7 % pri 280 nm).

terc-Butil (2-(2-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-5-((1-(5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-il)etil)karbamoi)fenoksi)etil)karbamat (38). Delamo po splošnem postopku H, le da naslednji dan ne dodamo dodatnega CDI. Topilo uparimo pod znižanim tlakom ter viskozni preostanek čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol = 20/1). Surov produkt očistimo še s prelivanjem z diklorometanom/dietil etrom (2:1, 12 mL), stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, prelijemo z dietil etrom (2 $\times$ 5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije: 24 %; bela trdna snov (42 mg); tališče: 132-136 °C; R_f (diklorometan/metanol = 10/1): 0,43; [α]_D²⁵ 46,8 (c 0,170, MeOH); ¹H NMR (400 MHz, aceton-*d*₆) δ 1,43 (s, 9H, 3 $\times$ CH₃), 1,60 (d, 3H, ³J = 7,2 Hz, CH₃), 2,35 (s, 3H, Pyrr-CH₃), 3,62 (q, 2H, ³J = 5,6 Hz, OCH₂CH₂NH), 4,32 (t, 2H, ³J = 5,6 Hz, OCH₂CH₂NH), 5,28 (quint, 1H, ³J = 7,2 Hz, CONHCH), 6,36 (s, 1H, OCH₂CH₂NH), 7,60-7,66 (m, 2H, 2 $\times$ Ar-H), 8,16 (d, 1H, ³J = 7,6 Hz, CONHCH), 8,56 (d, 1H, ³J = 7,6 Hz, Ar-H), 9,30 (s, 1H, CONHAr), 11,04 (s, 1H, oksadiazol-NH/Pyrr-NH), 11,30 (s, 1H, oksadiazol-NH/Pyrr-NH); ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆) δ 10,76, 16,88 (dve liniji), 28,15, 41,70, 59,73, 67,28, 77,82, 108,64, 110,09, 110,49, 117,89, 118,69, 120,78, 128,16, 129,63, 130,43, 146,32, 154,88, 155,64, 156,38, 157,22, 165,01; IR (ATR) ν = 3360, 3282, 2975, 2928, 2851, 1778, 1647, 1514, 1414, 1343, 1266, 1152, 1061, 934, 832, 759, 637 cm⁻¹; MS (ESI) m/z = 581,1 ([M-H]⁻). HRMS za C₂₄H₂₇Cl₂N₆O₇: izračunan 581,1318, izmerjen 581,1321. HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μ m, 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μ L; retencijski čas: 11,579 min (97,5 % pri 280 nm).

Etil 2-(6-amino-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)acetat (46a). Delamo po splošnem postopku C, le da kot topilo uporabimo zmes etanola, THF in DMF (3:1:1, 50 mL), reakcijsko zmes pa mešamo čez noč. Surov produkt čistimo s kristalizacijo iz etanola (50 mL). Izkoristek reakcije: 75 %; blede rožnati kristali (599 mg); tališče: 141-143 °C; Rf (diklorometan/metanol = 10/1): 0,33; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,19 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CH₃), 2,78 (dd, 1H, $^2J = 16,4$ Hz, $^3J = 7,6$ Hz, H_A iz CHCH₂COOEt), 2,92 (dd, 1H, $^2J = 16,4$ Hz, $^3J = 4,4$ Hz, H_B iz CHCH₂COOEt), 4,09 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, CH₂CH₃), 4,68 (dd, 1H, $^3J = 7,2$ Hz, $^3J = 4,4$ Hz, CH), 4,86 (s, 2H, NH₂), 6,12 (dd, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 2,4$ Hz, Ar-H-7), 6,16 (d, 1H, $^4J = 2,4$ Hz, Ar-H-5), 6,59 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, Ar-H-8), 10,53 (s, 1H, NH); IR (ATR) $\nu = 3406, 3305, 3204, 3048, 2990, 2922, 2848, 1726, 1679, 1608, 1532, 1422, 1376, 1298, 1211, 1175, 1055, 1024, 988, 862, 799, 694\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 272,87$ ([M+Na]⁺).

Etil 2-(6-amino-4-benzil-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)acetat (46b). Delamo po splošnem postopku C, le da kot topilo uporabimo mešanico etanola in THF (1.5:1, 25 mL), reakcijsko zmes pa mešamo 4 ure. Surov produkt čistimo s kristalizacijo iz etanola (15 mL). Izkoristek reakcije: 85 %; beli kristali (518 mg); tališče: 96-98 °C; Rf (etil acetat/ petroleter = 1/1): 0,43; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,20 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CH₃), 2,91 (dd, 1H, $^2J = 16,4$ Hz, $^3J = 7,2$ Hz, H_A iz CHCH₂COOEt), 3,02 (dd, 1H, $^2J = 16,4$ Hz, $^3J = 4,8$ Hz, H_B iz CHCH₂COOEt), 4,12 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, CH₂CH₃), 4,86 (s, 2H, NH₂), 4,91 (dd, 1H, $^3J = 7,2$ Hz, $^3J = 4,8$ Hz, CH), 5,03 (s, 2H, Bzl-CH₂), 6,18 (dd, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 2,4$ Hz, Ar-H-7), 6,27 (d, 1H, $^4J = 2,4$ Hz, Ar-H-5), 6,68 (d, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, Ar-H-8), 7,24-7,28 (m, 3H, 3 $\times$ Ar-H), 7,32-7,37 (m, 2H, 2 $\times$ Ar-H); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 14,02, 35,35, 44,19, 60,26, 73,25, 101,31, 108,74, 116,91, 126,41, 127,04, 128,56, 128,92, 134,58, 136,43, 144,47, 165,43, 169,43; IR (ATR) $\nu = 3439, 3354, 3233, 2981, 2935, 2860, 1727, 1671, 1612, 1515, 1404, 1344, 1280, 1176, 1087, 1033, 950, 846, 816, 728, 695\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 363,33$ ([M+Na]⁺).

Etil 2-(6-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)acetat (47a). Delamo po splošnem postopku A, le da kot reagent uporabimo 3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksilno kislino (233 mg, 1,20 mmol), ki je na začetku le suspendirana v diklorometanu, med reakcijo pa nastane raztopina. Del spojine po ekstrakciji združimo z odnučanim delom in čistimo s prelivanjem z dietil etrom (20 mL). Suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietil etrom (2 $\times$ 5 mL)

in posušimo. Izkoristek reakcije: 90 %; bela trdna snov (383 mg); tališče: 261-263 °C; Rf (diklorometan/metanol = 10/1): 0,61; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,19 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CH_2CH_3), 2,23 (s, 3H, Pyr-CH $_3$), 2,88 (dd, 1H, $^2J = 16,4$ Hz, $^3J = 6,8$ Hz, H $_A$ iz $\text{CHCH}_2\text{COOEt}$), 2,98 (dd, 1H, $^2J = 16,4$ Hz, $^3J = 4,4$ Hz, H $_B$ iz $\text{CHCH}_2\text{COOEt}$), 4,10 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, CH_2CH_3), 4,89 (dd, 1H, $^3J = 6,8$ Hz, $^3J = 4,4$ Hz, CH), 6,89 (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, Ar-H-8), 7,12 (dd, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, $^4J = 2,4$ Hz, Ar-H-7), 7,41 (d, 1H, $^4J = 2,4$ Hz, Ar-H-5), 9,42 (s, 1H, CONH), 10,83 (s, 1H, CONH), 12,13 (s, 1H, Pyr-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 10,75, 13,99, 35,32, 60,30, 73,00, 107,79, 108,31, 111,07, 114,70, 116,13, 119,61, 127,22, 127,76, 133,28, 138,70, 156,99, 165,45, 169,46; IR (ATR) $\nu = 3379, 3257, 3163, 3084, 2983, 2852, 1720, 1692, 1559, 1517, 1418, 1376, 1218, 1174, 1066, 1030, 868, 810, 723, 686\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 424,0$ ($[\text{M}-\text{H}]^-$). HRMS za $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5$: izračunan 424,0467, izmerjen 424,0460; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL ; retencijski čas: 11,280 min (97,6 % pri 280 nm).

Etil 2-(4-benzil-6-(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[*b*][1,4]oksazin-2-il)acetat (47b). Delamo po splošnem postopku A, le da kot reagent uporabimo 3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksilno kislino (151 mg, 0,778 mmol), ki je na začetku le suspendirana v diklorometanu, med reakcijo pa nastane raztopina. Med ekstrakcijo ne dobimo oborine, ampak se vsa spojina raztopi. Surov produkt po ekstrakciji čistimo s prelivanjem z dietil etrom (20 mL). Suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietil etrom (2 $\times$ 5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije: 75 %; sivo bela trdna snov (250 mg); tališče: 160-162 °C; Rf (diklorometan/metanol = 10/1): 0,81; ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6) δ 1,20 (t, 3H, $^3J = 7,2$ Hz, CH_2CH_3), 2,20 (s, 3H, Pyr-CH $_3$), 3,00 (dd, 1H, $^2J = 16,8$ Hz, $^3J = 6,8$ Hz, H $_A$ iz $\text{CHCH}_2\text{COOEt}$), 3,08 (dd, 1H, $^2J = 16,4$ Hz, $^3J = 4,8$ Hz, H $_B$ iz $\text{CHCH}_2\text{COOEt}$), 4,12 (q, 2H, $^3J = 7,2$ Hz, CH_2CH_3), 5,05-5,15 (m, 3H, Bzl-CH $_2$, CH), 6,98 (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, Ar-H-8), 7,22 (dd, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, $^4J = 2,4$ Hz, Ar-H-7), 7,24-7,36 (m, 5H, 5 $\times$ Ar-H), 7,54 (d, 1H, $^4J = 2,4$ Hz, Ar-H-5), 9,38 (s, 1H, CONH), 12,14 (s, 1H, Pyr-NH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 10,72, 14,01, 35,47, 44,35, 60,35, 73,17, 107,66, 108,26, 110,86, 115,29, 116,56, 119,56, 126,66, 127,21, 127,95, 128,37, 128,59, 133,67, 136,04, 139,98, 157,06, 165,02, 169,34; IR (ATR) $\nu = 3397, 3231, 3121, 2984, 1732, 1680, 1650, 1553, 1514, 1439, 1370, 1258, 1176, 1088, 1031, 941, 831,$

740, 701 cm^{-1} ; MS (ESI) $m/z = 514,1$ ($[\text{M-H}]^-$). HRMS za $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5$: izračunan 514,0937, izmerjen 514,0938; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL ; retencijski čas: 15,101 min (99,1 % pri 280 nm).

2-(6-Amino-3-okso-3,4-dihidro-2H-benzo[b][1,4]oksazin-2-il)ocetna kislina (50). (43)

Delamo po splošnem postopku C, le da kot topilo uporabimo samo THF (40 mL), reakcijsko zmes pa mešamo čez noč. Surov produkt čistimo s prelivanjem z etrom (15 mL). Suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietil etrom (2 $\times$ 5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije: 60 %; sivo bela trdna snov (247 mg); tališče: 210-214 $^{\circ}\text{C}$; Rf (etil acetat/petroleter/ocetna kislina = 4/1/0,01): 0,09; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2,68 (dd, 1H, $^2J = 16,4$ Hz, $^3J = 7,6$ Hz, H_A iz CH_2), 2,85 (dd, 1H, $^2J = 16,4$ Hz, $^3J = 4,0$ Hz, H_B iz CH_2), 4,65 (dd, 1H, $^3J = 7,6$ Hz, $^3J = 4,0$ Hz, CH), 6,12 (dd, 1H, $^3J = 8,4$ Hz, $^4J = 2,4$ Hz, Ar-H-7), 6,16 (d, 1H, $^4J = 2,4$ Hz, Ar-H-5), 6,60 (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, Ar-H-8), 10,50 (s, 1H, CONH), signala za COOH in NH_2 skupini nista vidna; ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 35,27, 73,27, 101,17, 108,30, 116,47, 127,71, 133,45, 144,19, 166,15, 171,13; IR (ATR) $\nu = 3369, 3297, 2994, 2917, 2838, 1683, 1506, 1415, 1293, 1221, 1181, 1049, 908, 861, 784, 672$ cm^{-1} ; MS (ESI) $m/z = 220,87$ ($[\text{M-H}]^-$).

2-(6-(3,4-Dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksamido)-3-okso-3,4-dihidro-2H-

benzo[b][1,4]oksazin-2-il)ocetna kislina (48a). Delamo po splošnem postopku A, le da kot reagent uporabimo 3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-karboksilno kislino (126 mg, 0,648 mmol), ki je na začetku le suspendirana v diklorometanu, med reakcijo pa nastane raztopina. Ekstrakcijo matičnice po nučanju izvedemo tako, da fazi ločimo, organski fazi dodamo 1 M HCl (15 mL), ločimo in kislo vodno fazo še 2 $\times$ ekstrahiramo z etil acetatom (2 $\times$ 20 mL). Združene organske faze speremo z nasičeno raztopino NaCl (10 mL), sušimo z Na_2SO_4 , odfiltriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt čistimo s prelivanjem z metanolom (10 mL), stresamo na ultrazvoku, segrevamo do vrenja, oborino odnučamo, speremo z metanolom (2 $\times$ 5 mL) in etrom (5 mL) ter posušimo. Oborina, ki jo odfiltriramo pred ekstrakcijo je zmes dveh spojin, zato je ne združimo s produktom. Izkoristek reakcije: 7 %; rjava trdna snov (12 mg); tališče: 265-268 $^{\circ}\text{C}$; Rf (diklorometan/metanol/ocetna kislina = 10/1/0,01): 0,35; ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2,24 (s, 3H, Pyrr- CH_3), 2,78 (dd, 1H, $^2J = 16,8$ Hz, $^3J = 7,2$ Hz, H_A iz CH_2), 2,91 (dd, 1H, $^2J = 16,8$ Hz, $^3J = 4,0$ Hz, H_B iz CH_2),

4,84 (dd, 1H, $^3J = 7,2$ Hz, $^3J = 4,4$ Hz, CH), 6,90 (d, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, Ar-H-8), 7,12 (dd, 1H, $^3J = 8,8$ Hz, $^4J = 2,4$ Hz, Ar-H-7), 7,40 (d, 1H, $^4J = 2,4$ Hz, Ar-H-5), 9,42 (s, 1H, CONH), 10,80 (s, 1H, CONH), 12,13 (s, 1H, Pyrr-NH), 12,51 (s, 1H, COOH); ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6) δ 10,76, 35,40, 73,22, 107,76, 108,30, 111,06, 114,65, 116,15, 119,65, 127,29, 127,74, 133,25, 138,79, 157,00, 165,64, 170,98; IR (ATR) $\nu = 3391, 3225, 3090, 2981, 1692, 1567, 1482, 1395, 1282, 1223, 1110, 1047, 945, 867, 784, 701\text{ cm}^{-1}$; MS (ESI) $m/z = 396,0$ ($[\text{M-H}]^-$). HRMS za $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5$: izračunan 396,0154, izmerjen 396,0144; HPLC: Kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 μm , 4,6 mm $\times$ 150 mm); mobilna faza: 30-90% acetonitrila v 0,1% TFA v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1,0 mL/min; volumen injiciranja 10 μL ; retencijski čas: 8,353 min (96,5 % pri 254 nm).