

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJ EMANUEL COTMAN

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2014

Univerza v *Ljubljani*
Fakulteta *za farmacijo*



ANDREJ EMANUEL COTMAN

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA ANALOGOEV 4,5-DIBROMO-1*H*-PIROLA S
TIROZINSKIM FRAGMENTOM KOT ZAVIRALCEV GIRAZE B S
PROTIBAKTERIJSKIM DELOVANJEM**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF 4,5-DIBROMO-1*H*-PYRROLE ANALOGUES WITH
TYROSINE FRAGMENT AS GYRASE B INHIBITORS WITH
ANTIBACTERIAL ACTIVITY**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2014

Magistrsko nalogo sem opravljal na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Danijela Kiklja, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Roka Frlana, mag. farm. Meritve masne spektrometrije so opravili na Inštitutu Jožef Stefan, meritve površinske plazmonske resonance na Biotehnični fakulteti, Infrastrukturnem centru za površinsko plazmonsko resonanco, encimske teste zaviranja giraze B na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani ter protibakterijska testiranja na Fidelta – Galapagos Research Centre Ltd. v Zagrebu in Fakulteti za farmacijo Univerze v Helsinkih.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Danijelu Kiklju, mag. farm. za ustvarjanje raziskovalnega okolja in somentorju asist. dr. Roku Frlanu, mag. farm. za vse posredovano znanje in izkušnje.

Izjava

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

Andrej Emanuel Cotman

Predsednik komisije: prof. dr. Albin Kristl, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Vid Mlakar, mag. farm.

Vsebina

Vsebina	2
Povzetek	4
Abstract.....	4
Seznam okrajšav	5
1 Uvod	7
1.1 Bakterijska rezistenca	7
1.2 Topoizomeraze.....	8
1.3 Bakterijska giraza	9
1.3.1 ATP vezavno mesto giraze B	10
1.4 Znani inhibitorji giraze B.....	11
1.5 Alkaloidi alg iz rodu <i>Agelas</i>	12
2 Načrt dela.....	14
2.1 Računalniško sidranje	15
3 Materiali in metode.....	18
4 Eksperimentalni del	19
4.1 Sinteza prve serije spojin	19
4.1.1 Tipični postopek za sintezo spojin 4a,c,d iz 2-trikloroacetilpirolov	22
4.1.2 Tipični postopek za sintezo spojin 4b,e,f iz pirol-2-karboksilnih kislin	23
4.1.3 Tipični postopek za hidrolizo estrov (4a-f , 12b-f , 12et in 12ft) do končnih spojin (5a-f , 12b'-f' , 12e't in 12f't).....	27
4.2 Sinteza pirolnih gradnikov	31
4.3 Sinteza gradnikov za drugo serijo spojin.....	34
4.3.1 Tipičen postopek za sintezo metilnih estrov (9 in 13a-e).....	34
4.4 Sinteza druge serije spojin	37
4.4.1 Tipični postopek za sintezo derivatov alifatskih aminov 12a-e	39
4.4.2 Tipični postopek za sintezo derivatov aromatskih aminov 12f-h	43

4.4.3	Sinteza derivatov tribromopirola.....	49
4.4.4	Sinteza intermediatov, ki niso vodili do končnih spojin	53
5	Rezultati bioloških testiranj	57
6	Razprava.....	62
6.1	Kemijski del.....	62
6.1.1	Prva serija spojin	62
6.1.2	Druga serija spojin.....	63
6.2	Biološka testiranja.....	66
7	Sklep.....	68
8	Priloga: šifrant spojin	69
9	Literatura	70

Povzetek

Bakterijska DNA giraza je dobro uveljavljena tarča nekaterih znanih protibakterijskih učinkovin, kot so fluorokinoloni, na katere pa se že pojavlja odpornost. Ker omenjene učinkovine ciljajo predvsem A podenoto encima, je alternativni pristop v načrtovanju novih učinkovin, ki ciljajo ATP vezavno mesto, ki se nahaja na B podenoti bakterijske giraze (GyrB). Pirol-2-karboksamidni fragment, ki se nahaja tudi v alkaloidu alg iz rodu *Agelas*, oroidinu, je znan strukturni element inhibitorjev GyrB. Načrtovali in sintetizirali smo 29 novih analogov oroidina in ovrednotili njihovo zaviralno delovanje na GyrB in protibakterijsko aktivnost. 15 sintetiziranih spojin je zaviralcev GyrB (najboljša spojina izkazuje srednjo inhibitorno koncentracijo $IC_{50} = 619$ nM), od teh jih 7 izkazuje protibakterijsko delovanje proti grampozitivnim bakterijam (najboljša spojina ima minimalno inhibitorno koncentracijo proti *Staphylococcus aureus* in *Enterococcus faecalis* $MIC_{90} = 14$ µg/mL) oziroma sevu gramnegativnih bakterij z izbitim genom za efluks črpalko (najboljša spojina izkazuje $MIC_{90} = 2$ µg/mL proti *Escherichia coli tolC*).

Ključne besede: protibakterijsko delovanje, giraza, pirol-2-karboksamid, oroidin, tirozin

Abstract

Bacterial DNA gyrase is a well-established target of antibacterial agents, such as fluoroquinolones, but there are many bacterial strains that have already developed resistance to known gyrase A subunit inhibitors. An alternative approach is to target ATP binding pocket of gyrase B (GyrB). The pyrrole-2-carboxamide fragment that is also present in oroidin, an alkaloid from genus *Agelas* sponges, is a known structural element of GyrB inhibitors. 29 oroidin analogues were designed, prepared and tested for GyrB inhibition and their antibacterial activity. Among them 15 GyrB inhibitors were identified (the most potent derivative exhibited IC_{50} (half maximal inhibitory concentration) value of 619 nM). 7 GyrB inhibitors also showed antibacterial activity against gram-positive bacteria (the most active derivative exhibited MIC_{90} (minimum inhibitory concentration) value of 14 µg/mL against *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus faecalis*) or against efflux deficient strain derived from gram-negative bacteria (the most potent derivative exhibited MIC_{90} value of 2 µg/mL against *Escherichia coli tolC*).

Key words: antibacterial, gyrase, pyrrole-2-carboxamide, oroidin, tyrosine

Seznam okrajšav

ATP	adenozin-5'-trifosfat
Bn	benzil
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butil dikarbonat
BOP	(benzotriazol-1-iloksi)tris(dimetilamino)fosfonijev heksafluorofosfat
bs	širok singlet
DCC	N,N'-dicikloheksilkarbodiimid
dd	dublet dubleta
ddd	dublet dubleta dubleta
DKM	diklorometan
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DMSO- <i>d</i> ₆	devteriran DMSO
DNA	deoksiribonukleinska kislina
dt	dublet tripleta
dtd	dublet tripleta dubleta
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
eq	ekvivalent
ESI	ionizacija z razprševanjem (<i>electrospray ionisation</i>)
EtOAc	etilacetat
GHKL	naddružina proteinov, ki jo sestavljajo giraza, Hsp90, histidin kinaza in MutL
GyrA	giraza A
GyrB	giraza B
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (<i>high performance/pressure liquid chromatography</i>)
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti (<i>high resolution mass spectrometry</i>)
Hsp90	protein toplotnega šoka 90
IC ₅₀	koncentracija zaviralca, pri kateri je inhibicija encima 50%
impA	lokus povečane membranske prepustnosti pri <i>E. coli</i>
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
K _d	konstanta disociacije
m	multiplet

M	molarna koncentracija
MeOH- <i>d</i> ₄	devteriran metanol
MIC ₉₀	minimalna inhibitorna koncentracija, potrebna za zaviranje rasti 90% organizmov
MS	masna spektrometrija
MutL	mutatorski protein L
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca (<i>nuclear magnetic resonance</i>)
RNA	ribonukleinska kislina
s	singlet
SAR	povezava med strukturo in delovanjem (<i>structure-activity relationship</i>)
SPR	površinska plazmonska resonanca (<i>surface plasmon resonance</i>)
t	triplet
TBTU	O-(benzotriazol-1-il)N,N,N',N'-tetrametiluronijev tetrafluoroborat
TFA	trifluorocetna kislina
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija (<i>thin layer chromatography</i>)

1 Uvod

1.1 Bakterijska rezistenca

V začetku dvajsetega stoletja je na področju boja proti bakterijam zavladalo precej optimizma; najprej z odkritjem salvarsana leta 1909 in nato z razvojem sulfonamidnih kemoterapevtikov ter odkritjem antibiotičnega delovanja penicilina okrog leta 1930. Nove možnosti zdravljenja so bile revolucionarne, a že kmalu so se pojavili rezistentni sevi. Na sulfonamide odporni *Streptococcus pyogenes* so v vojaških bolnicah opazili v tridesetih letih, v štiridesetih pa se je v Londonu pojavil na penicilin odporni *Staphylococcus aureus* (1). V naslednjih desetletjih so se z vedno novimi protimikrobnimi učinkovinami pojavljali tudi vedno novi rezistentni sevi in tako je danes prevalenca na meticilin odpornega *S. aureus* od 1% v Skandinaviji do 80% v azijskih državah in je močno povezana z napačno uporabo antibiotikov. Pojavljajo se tudi sevi, odporni na več različnih razredov protimikrobnih učinkovin in taki, ki so odporni na prav vse poznane protimikrobne učinkovine (2). Do pojava rezistentnih sevov pride, ker v populaciji bakterij preživijo le tiste, ki vsebujejo gen, ki jim preživetje omogoča. Le-ta se lahko prenaša med sevi iste vrste ali med različnimi vrstami z bakteriofagi, plazmidi, golo DNA ali transpozoni (1). Rezistenca na inhibitorje topoizomeraz II se pojavlja predvsem zaradi spremembe vezavnega mesta učinkovine ali povečanja izražanja endogenih efluks črpalk (3).

Pojav rezistence ne bi bil prevelik problem, če bi imeli stalen dotok novih protimikrobnih učinkovin v klinično prakso, kot je veljalo prvih 40 let po odkritju sulfonamidov in β -laktamov; zgodilo pa se je, da od odkritja fluorokinolonov v šestdesetih letih pa do leta 2000 na tržišče ni prišel noben nov razred protimikrobnih učinkovin. Uspešno so razvijali le analoge znanih učinkovin, predvsem fluorokinolonov in β -laktamskih antibiotikov. Po letu 2000 se je stanje izboljšalo, saj je na tržišče prišlo 5 novih razredov protimikrobnih učinkovin (preglednica I).

Preglednica I: Novi strukturni tipi antibiotikov po letu 2000

Leto registracije	Generično ime	Strukturni tip	Mehanizem delovanja
2000	linezolid	oksazolidinon	vezava na 50S podenoto ribosoma (4)
2003	daptomicin	lipopeptid	perforacija bakterijske membrane (5)
2007	plevromutilin	propanociklopenta[8]anulen	vezava na 50S podenoto ribosoma (6)
2011	fidaksimicin	tiakumicin	inhibicija RNA polimeraze (7)
2012	bedakvilin	diarilkinolin	inhibitor ATP sintaze (8)

Prav tako je po letu 2000 na tržišče prišlo tudi osem (fluoro)kinolonskih derivatov in še devet drugih protibakterijskih učinkovin. Kljub temu je stanje zaskrbljujoče, saj zaradi ekonomskih razlogov velika farmacevtska podjetja opuščajo razvoj protimikrobnih učinkovin: leta 1990 je bilo v tovrstne raziskave vključenih 18 velikih podjetij, danes le še 4, pa še ta krčijo svoje protibakterijske raziskovalne programe (9).

Iskati moramo torej nove protibakterijske učinkovine s širokim spektrom delovanja tako na grampozitivne kot gramnegativne bakterije (slednje predstavljajo večjo težavo zaradi težjega prehajanja celične stene), pri katerih se ne bo pojavljala navzkrižna rezistenca s poznanimi antibiotiki. To lahko dosežemo z iskanjem novih tarč, ki omogočajo selektivno toksičnost ali pa z iskanjem novih prijemališč na že znanih tarčah. Primer dobro validirane tarče so bakterijske topoizomeraze tipa II, na katere delujejo fluorokinoloni in aminokumarini, na katere pa se že pojavlja rezistenca (2).

1.2 Topoizomeraze

Topoizomeraze so encimi, ki katalizirajo topološke spremembe DNA. V njihovi prisotnosti lahko verige DNA prehajajo ena prek druge, s čimer se v terciarno strukturo vnašajo in sproščajo vozli in supernavitja, kar je pomembno pri podvajanju DNA, transkripciji, rekombinaciji ter kondenzaciji kromosomov in bakterijske DNA (10). Verigi DNA se prekineta in ponovno združita s pomočjo transesterifikacije. Ta proces poteka tako, da hidroksilna skupina tirozina v aktivnem mestu encima napade fosfor in tako prekine fosfodiestrsko vez v verigi DNA. Konformacijske spremembe encima nato premaknejo eno verigo prek druge, ponovna ligacija prekinjene verige pa se izvrši z reakcijo, ki je obratna prvi: fosfatni kisik iz proste verige DNA napade fosfor, ki je kovalentno vezan na tirozinski kisik in fosfodiestrsko vez se ponovno vzpostavi (10).

DNA topoizomeraze delimo na dva tipa. Tip I katalizira reakcijo cepitve ene verige DNA, tip II pa obeh (11). Poleg tega se topoizomeraze razlikujejo med posameznimi organizmi, sploh pa so opazne razlike med evkariontskimi in prokariontskimi encimi (preglednica II).

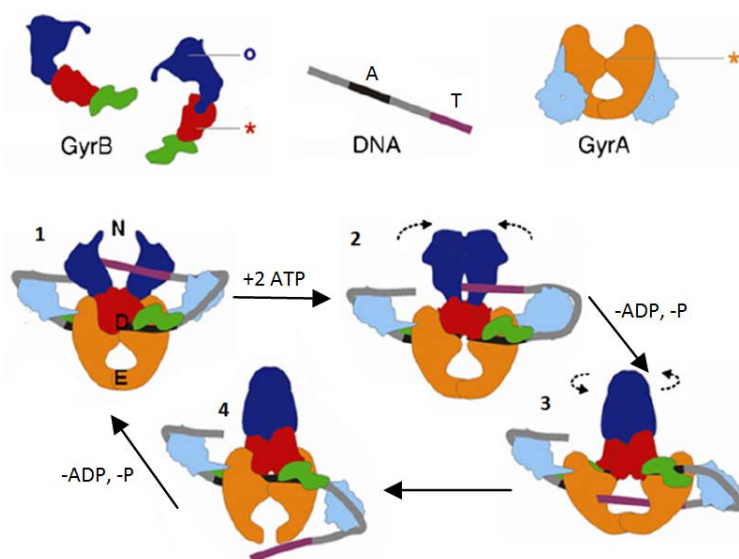
Evkariontske topoizomeraze tipa IIA so veliki encimi, sestavljeni iz dveh enakih podenot, bakterijska giraza in njej sorodna bakterijska topoizomeraza IV pa sta tetramerne strukture; giraza je sestavljena iz dveh GyrA (homologna C-terminalnemu delu evkariontske topoizomeraze II) in dveh GyrB (homologna N-terminalnemu delu evkariontske topoizomeraze II) podenot, topoizomeraza IV pa iz dveh ParC in dveh ParE podenot (12).

Preglednica II: Poddružine DNA topoizomeraz (10).

Poddružina	Predstavniki
IA	Bakterijski DNA topoizomerazi I in III Glivna DNA topoizomeraza III Sesalski DNA topoizomerazi III α in III β
IB	Evkariontska DNA topoizomera I Sesalska mitohondrijska DNA topoizomeraza I
IIA	Giraza in bakterijska DNA topoizomeraza IV Sesalski DNA topoizomerazi II α in II β Glivna DNA topoizomeraza II
IIB	DNA topoizomeraza VI <i>S. shibatae</i>

1.3 Bakterijska giraza

Bakterijska giraza je edina sposobna vnašati supernavitja v DNA in je nujna za preživetje bakterij. Kot taka je dobra tarča za protibakterijske učinkovine. Iz znanih strukturnih in biokemijskih podatkov je bil postavljen model delovnja giraze, po katerem ta v enem ciklu uvede dve negativni supernavitji in za to porabi dve molekuli ATP. Giraza ima tri stične

**Slika 1 Model delovanja giraze. Povzeto po (11)**

Temno modra: N-terminalna domena GyrB; rdeča: Rossmannov zgib; zelena: rep; oranžna: N-terminalna domena GyrA; svetlo modra: C-terminalna domena GyrA

Zvezdica: aktivno mesto za cepitev DNA; krožec: ATP vezavno mesto

N, D in E označujejo N-vrata, D-vrata in izhodna vrata

površine z DNA, ki so lahko v odprtem ali zaprtem stanju: N-terminalno domeno GyrB (N-vrata), stični prostor med GyrA, GyrB in DNA (DNA-vrata) in C-terminalno domeno GyrA (izhodna vrata), kot je prikazano na sliki 1. Pri reakciji uvajanja negativnega supernavitja se A-segment

DNA veže v aktivno mesto encima (DNA vrata). DNA se ovije okrog C-terminalnega dela GyrA tako, da se približno 130 baznih parov oddaljeni T-

segment DNA veže v N-vrata in je pripravljen za transport prek spodnje verige. Po vezavi ATP se N-vrata zaprejo in ukleščijo T-segment. Encim cepi obe verigi A-segmenta tako, da tvori dve fosfo-tirozinski vezi v razdalji 4 baznih parov. T-segment nato potuje preko odprtih DNA vrat in preko razcepljenega A-segmenta ter nato izstopi skozi izhodna vrata (11). V odsotnosti DNA lahko giraza katalizira reakcijo sproščanja negativno supernavite DNA, po mehanizmu, ki je obraten opisanemu (slika 1) (10).

Ker je bakterijska giraza nujna za preživetje bakterij in je odsotna pri evkariontih, je privlačna tarča za načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin. Uspešni in klinično uporabni inhibitorji giraze in njej sorodne topoizomeraze IV so (fluoro)kinoloni, ki stabilizirajo kovalentni kompleks med GyrA in 5' koncem prekinjene DNA verige (11) ter tako preprečijo nadaljevanje katalitičnega cikla. Zaradi pojavljanja bakterijskih sevov, rezistentnih na fluorokinolone, zgolj sinteza novih analogov s podobnim osnovnim skeletom ni smiselna, saj se tako lahko za nove antibiotike hitro pojavi navzkrižna rezistenca z že poznanimi strukturno podobnimi učinkovinami, zmaga v bitki za življenje ali smrt pa se prevesi na stran bakterij.

1.3.1 ATP vezavno mesto giraze B

Alternativno prijemališče inhibitorjev bakterijske giraze je ATP vezavno mesto, ki se nahaja na GyrB podenoti encima (11). Na prvi pogled je ciljanje le-tega tvegano, saj ATP vezavno mesto vsebujejo tudi druge ATPaze in kinaze, zato je potrebno doseči visoko selektivnost inhibitorja za ATP vezavno mesto giraze v primerjavi z ostalimi encimi, ki so nujni za preživetje človeških celic. Da je možno doseči selektivnost učinkovin, ki ciljajo ATP vezavno mesto, dokazuje uspešna raba tirozin-kinaznih inhibitorjev (npr. imatinib) v klinični praksi (13).

Bakterijska giraza spada poleg histidin kinaz, Hsp90 in MutL v GHKL naddružino ATPaz, ki so vse udeležene v procesih, ključnih za preživetje in delitev celic. Histidin kinaze delujejo kot transkripcijski faktorji pri prokariontih, Hsp90 deluje kot šaperon in je pomemben za konformacijsko aktivnost več družin pro- in evkariontskih protein kinaz, od katerih so mnoge protoonkogene, MutL s homologi pa je udeležen pri popravljanju DNA in je ključen za rast celice in njeno viabilnost (14). Vsi člani te naddružine imajo skupen strukturni motiv, Bergeratov zgib, imajo pa tudi precej velik prazen prostor na mestu, kjer se veže adenzin (131 \AA^3 za Hsp90 in 140 \AA^3 za GyrB), kar je podlaga za doseganje selektivnosti proti drugim naddružinam ATPaz in kinaz (npr. kinezini $40 - 60 \text{ \AA}^3$) (13).

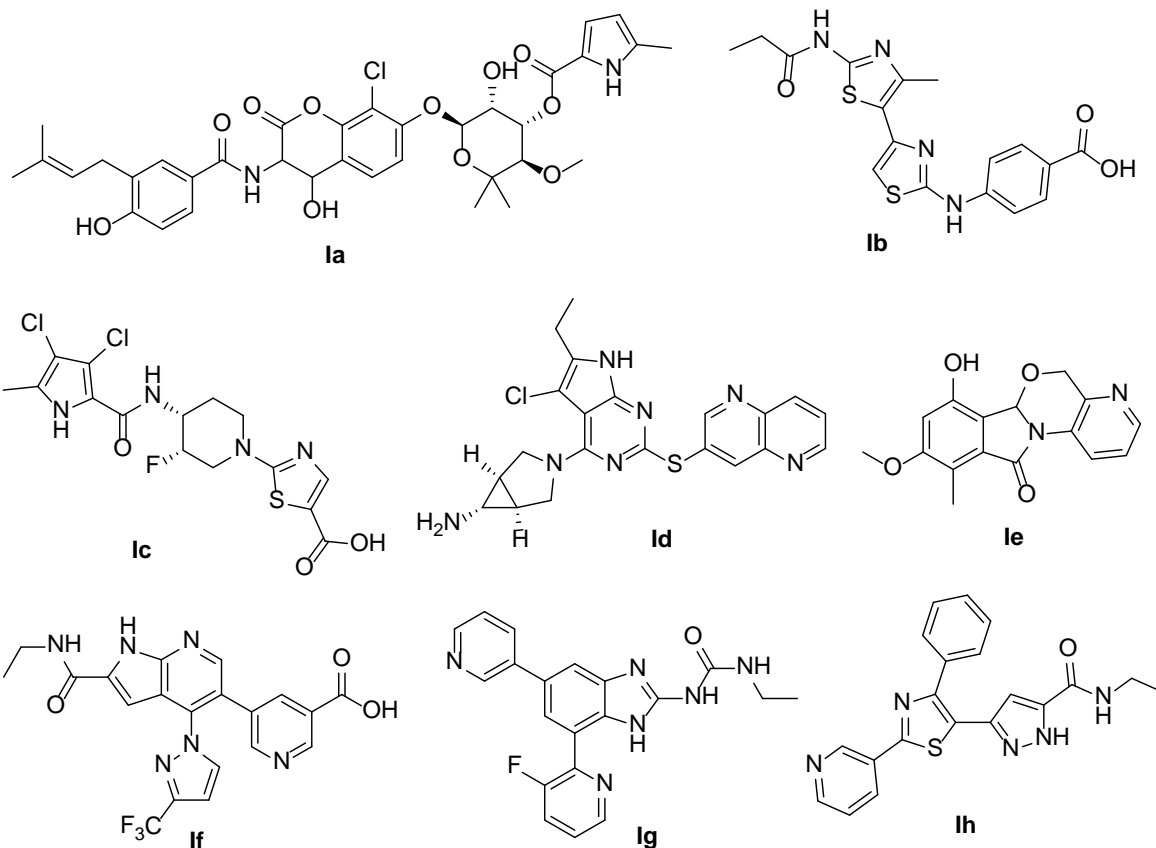
Bakterijska GyrB je strukturno podobna tudi človeški topoizomerazi II in kinazi piruvat dehidrogenazi, ki ju je poleg MutL in Hsp90 treba vzeti v obzir kot možne vzroke za neselektivno toksičnost inhibitorjev GyrB (12). GyrB je evolucijsko dobro ohranjena med različnimi bakterijskimi sevi, kar daje podlago za razvoj širokospektralnih protimikrobnih učinkovin, podobna pa je tudi ParE podenoti bakterijske topoizomeraze IV, kar odpira možnost razvoja dualnih inhibitorjev, na katere bi se rezistenca težje razvila, saj bi se v isti generaciji bakterij morala hkrati pojaviti mutacija na vsaj dveh genih, odgovornih za rezistenco (12).

1.4 Znani inhibitorji giraze B

Že od petdesetih let prejšnjega stoletja so znani aminokumarinski antibiotiki (npr. klorobiocin (**Ia**), novobiocin), ki jih proizvajajo streptomicete. Za ta tip antibiotikov se je v kasnejših desetletjih izkazalo, da se vežejo blizu ATP vezavnega mesta GyrB, ga tudi delno prekrijejo in tako preprečijo vezavo ATP. Aminokumarini so *in vitro* dobri inhibitorji GyrB, njihova slaba aktivnost proti gramnegativnim bakterijam, toksično delovanje na sesalske celice in slaba topnost pa so razlog, da niso tako uspešni v klinični rabi kot fluorokinoloni (11).

V zadnjih petih letih je bilo objavljenih več strukturnih tipov spojin, ki ciljajo ATPazno aktivnost DNA giraze (15, 12). Spojine vodnice za nove inhibitorje so v glavnem našli z načrtovanjem na podlagi fragmentov ter virtualnim ali visokozmogljivim rešetanjem (*high-throughput screening*). Z virtualnim rešetanjem so na Kemijskem inštitutu odkrili spojino **Ib**, tako da so knjižnico spojin računalniško sidrali v ATP vezavno mesto GyrB. Benzimidazolne inhibitorje (npr. **Ig**) so z visokozmogljivim rešetanjem 30.000 spojin na ATPazni test GyrB odkrili pri Vertexu. Tam so odkrili tudi pirazolotiazolni tip inhibitorjev (**Ih**). Spojino **Ie** so odkrili pri firmi Hoffman-La Roche z »*in silico* iskanjem igle« (nizkomolekulatnega inhibitorja, ki penetrira v ozke žepe aktivnega mesta). Pri AstraZeneci so z virtualnim rešetanjem fragmentov, ki so znani ATP-kompetitivni inhibitorji protein kinaz odkrili azaindolni tip inhibitorjev GyrB (**If**). Tam so z NMR rešetanjem fragmentov odkrili tudi pirolamidni tip inhibitorjev (**Ic**). Pri Triusu so s kristalografskim rešetanjem fragmentov odkrili spojino **Id** (12). Inhibitorji giraze B pogosto tvorijo vodikovo vez z Asp73, ki sicer, kot je razvidno iz kristalne strukture kompleksa ne-hidrolizabilnega analoga ATP z girazo *E. Coli*, interagira z aaminsko skupino adenina (slika 6) (16). Poleg tega je pogosta tudi vodikova vez ali kation- π interakcija z

Arg136, ki sicer ne tvori direktne povezave z ATP in pa različne interakcije v riboznem ali fosfatnem žepu. (12)



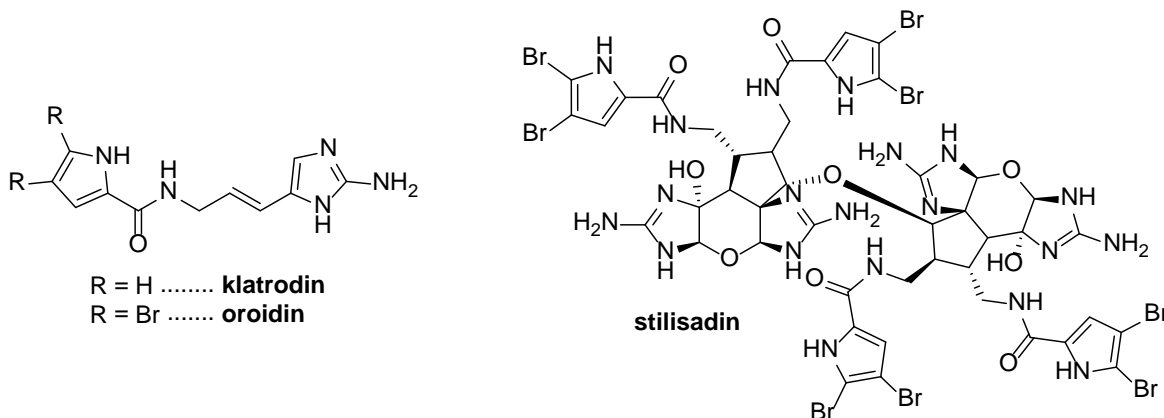
Slika 2: Znani inhibitorji giraze B

1.5 Alkaloidi alg iz rodu *Agelas*

Morski organizmi proizvajajo številne sekundarne metabolite, ki jim služijo kot obramba pred plenilci ali orožje za plenjenje in kot taki predstavljajo bogat nabor kemijsko in funkcionalno različnih molekul z biološko aktivnostjo (17). Na žalost imajo številne spojine, ki jih najdemo v naravi visoko molekulska masa, kompleksne 3D strukture in številne kiralne centre, kar zelo omeji možnosti za njihovo nadaljnjo optimizacijo do farmacevtsko uporabnih spojin.

Pirol-imidazolna družina alkaloidov je sestavljena iz več sto sekundarnih metabolitov, ki izhajajo izključno iz morskih spužev, v glavnem iz družin *Agelasidae*, *Axinellidae*, *Dyctionellidae* in *Hymeniacidonidae*. Vsebuje tako precej kompleksne predstavnike (npr. stilisadin), kot tudi dokaj enostavne (npr. klatrodin in oroidin) (18). Prav oroidin je med njimi zaradi svoje enostavne strukture (s pripadajočo dokaj enostavno totalno sintezo in

možnostjo dodatne derivatizacije v okviru razumnih molekulskih mas) deležen največje pozornosti znanstvene javnosti. Prvič je bil izoliran leta 1971 iz morske alge *Agelas oroides* in naj bi bil prekurzor v biosintezi ostalih pirol-imidazolnih alkaloidov (18).



Slika 3: Pirol-imidazolni alkaloidi

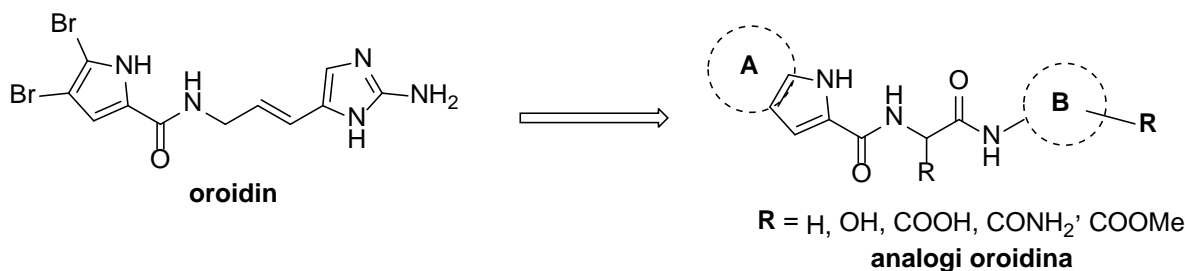
Funkcija oroidina (zanjo zadostuje že 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilna kislina) v naravnem ekosistemu naj bi bila odvrčanje rib, ki se hranijo z algami (19). Eden od možnih mehanizmov za to je vplivanje na nivo kalcija v celicah plenilcev preko inhibicije Ca^{2+} kanalov (20). Alkaloidi alg iz rodu *Agelas* so znani tudi kot modulatorji natrijevih kanalov, kar je potencialno uporabno v razvoju novih lokalnih anestetikov ter učinkovin za zdravljenje miotonij in epilepsije; klatrocin in njegovi analogi so tako znani modulatorji napetostno odvisnih natrijevih kanalov (21, 22). Oroidin in njegovi analogi z ohranjenim dibromopirolnim fragmentom ali z njegovim mimetikom – indolom imajo vlogo v razvoju protimikrobnih učinkovin, saj zavirajo tvorbo biofilmov (23, 24), imajo pa tudi obetavno protibakterijsko aktivnost (17, 25). Pri analogih oroidina so opazili tudi citostatično aktivnost, kar je uporabno pri razvoju novih učinkovin proti raku (26), hkrati pa je to tudi indikacija za pazljivo spremljanje selektivne toksičnosti protibakterijskih učinkovin z dibromopirolnim fragmentom.

2 Načrt dela

Namen magistrske naloge je sintetizirati nove analoge oroidina ter ovrednotiti njihovo zaviralno aktivnost na GyrB in delovanje proti bakterijam.

Inhibitorji GyrB, ki so jih razvili pri AstraZeneci (npr. **Ic**) vsebujejo pirol-2-karboksamidni fragment, podoben dibromopirol-2-karboksamidu pri oroidinu, katerega analogi imajo protibakterijsko delovanje, ni pa bilo za njih objavljenega mehanizma delovanja. Načrtovali in sintetizirali bomo torej analoge oroidina ob predpostavki, da se vežejo v ATP vezavno mesto GyrB (slika 4). Če bomo ugotovili, da analogi oroidina zavirajo GyrB in imajo protibakterijsko delovanje, bomo imeli v rokah močno orodje za nadaljnjo optimizacijo tovrstnih spojin s protibakterijskim delovanjem, saj je znanih precej strukturnih podatkov o ATP vezavnem mestu giraze. Z znanim vezavnim mestom in morebiti tudi kristalno strukturo inhibitorja v vezavnem mestu je optimizacija spojine vodnice bistveno bolj učinkovita, kot s klasičnimi SAR študijami.

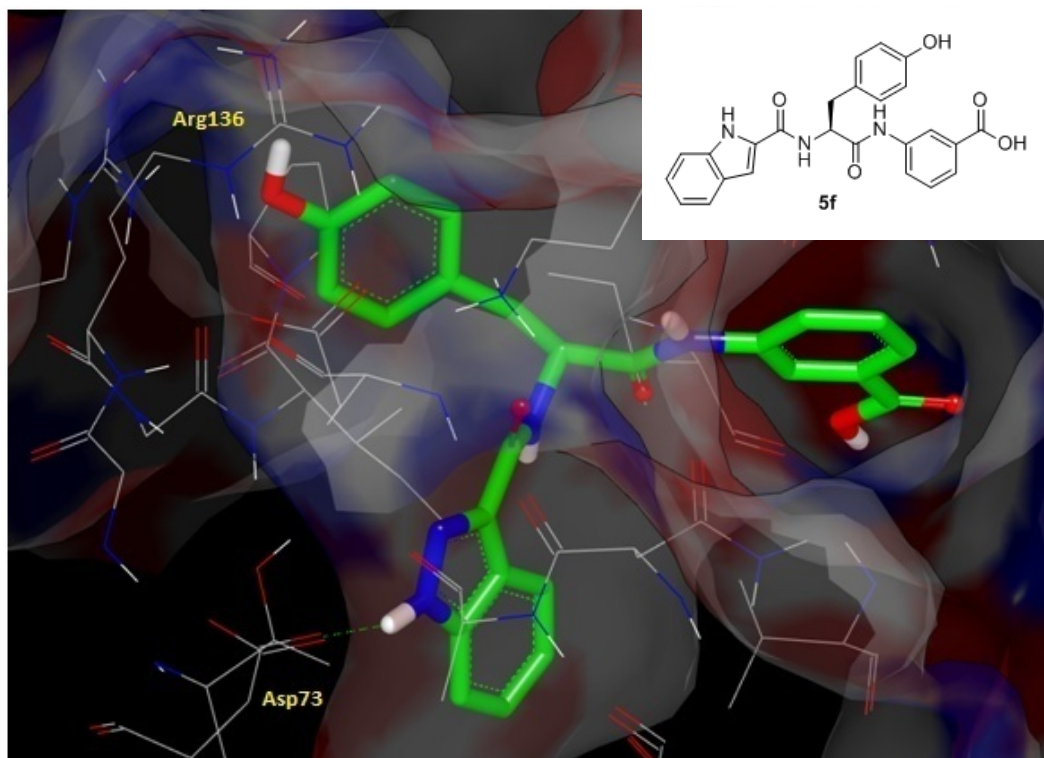
Dvojna vez v oroidinu se zlahka oksidira že ob prisotnosti zračnega kisika v kislih pogojih (27), kar bi nam nemara povzročalo težave, zato jo bomo bioizosterno zamenjali z amidno, ki jo je tudi sintezno lažje pripraviti. Če uvedemo to zamenjavo, lahko gledamo na oroidin kot na derivat glicina in kar sama se ponuja ideja, da bi pripravili in ovrednotili derivate z različnimi aminokislinami. Te bomo načrtovali z računalniškim sidranjem spojin v ATP vezavno mesto giraze. Za pirolni del bomo, po analogiji z znano kristalno strukturo spojine **Ic** v kompleksu s 24 kDa dolgo N-terminalno domeno GyrB *S. aureus*, predpostavili, da se veže v adeninski žep (28). Tam bomo obdržali 4,5-dibromopirolni fragment, ki je bil v podobnih spojinah pomemben za protibakterijsko aktivnost, ali pa ga zamenjali s 4,5-dikloropirolnim, indolnim ali indazolnim substituentom, ki bi lahko tvoril podobne hidrofobne interakcije. 2-aminoimidazolni del oroidina bomo zamenjali s fragmentom s kislo funkcionalno skupino, ki bi se lahko vezala v fosfatno vezavno mesto, lahko pa ima tudi pomembno vlogo pri prehajanju v gramnegativne bakterije. Pri teh je zunanja membrana permeabilna za majhne, nabite molekule prek porinov, notranji lipidni dvosloj pa je neprepusten za nabite molekule, zato so za delovanje na gramnegativne bakterije zaželeni molekule, za katere pri fiziološkem pH obstaja ravnotežje med nabito in nenabito zvrstjo (29).



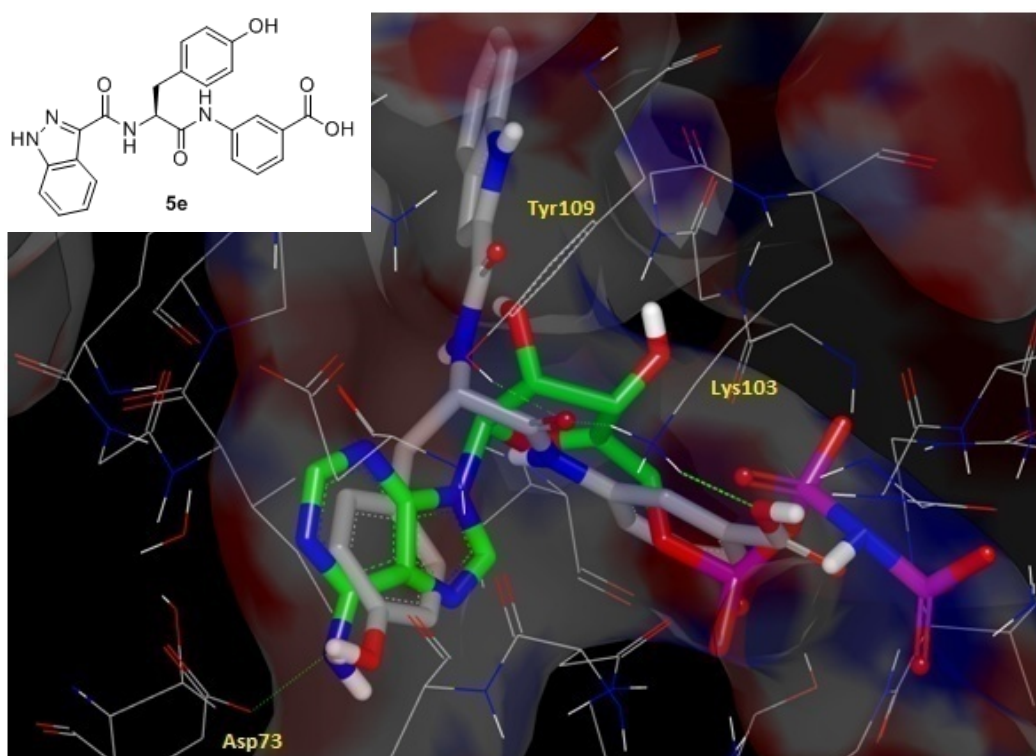
Slika 4: Načrtovani analogi oroidina kot potencialni inhibitorji giraze B

2.1 Računalniško sidranje

Zamišljene spojine smo sidrali v ATP vezavno mesto GyrB (kristalna struktura spojine **1b** s 24 kDa dolgo N-terminalno domeno GyrB *E. coli*, PDB koda 4DUH (30)) z uporabo programa FRED programskega paketa OpenEye. Najbolje je bila ocenjena spojina z indazolskim fragmentom na mestu A, 3-aminobenzojsko kislino na mestu B in tirozinskim fragmentom v sredini (spojina **5f**). NH skupina indazola tvori vodikovo vez z Asp73, aminobenzojski del se veže v fosfatno vezavno mesto, fenolna funkcionalna skupina tirozina pa se približa Arg136 in bi ob upoštevanju dinamike vezavnega mesta lahko tvorila interakcijo z njim (slika 5). Pri spojini s 4-aminopirololem na mestu A smo opazili dodatno vodikovo vez v adeninskem vezavnem mestu, zato smo v načrt dodali tudi sintezo aminopirolnih derivatov. Ko smo enake spojine sidrali v vezavno mesto derivata ATP, odpornega na hidrolizo v GyrB *E. coli*, PDB koda 1EI1 (16), je bila najboljše ocenjena spojina z indolom na mestu A in 3-aminobenzojsko kislino na mestu B (spojina **5e**), ki pa se je v adeninski žep vezala s fenolnim obročem tirozina, med tem ko je indolni fragment gledal iz encima. 3-Aminobenzojska kislina je tvorila vodikove vezi s Tyr109 in Lys103 v riboznem in fosfatnem žepu (slika 6). Dva možna načina vezave niti nista presenetljiva, saj je načrtovani tip molekul simetričen (v obliki črke T), nekonsistentnost predlaganega načina vezave pa kaže na to, da se bomo v zgodnjih fazah načrtovanja, ko imamo opravka s šibkejšimi inhibitorji, v našem primeru težko zanašali na rezultate računalniškega sidranja. To bi postalo uporabnejše, če bi poznali kristalno strukturo našega strukturnega tipa inhibitorjev v kompleksu z N-terminalnim delom GyrB.



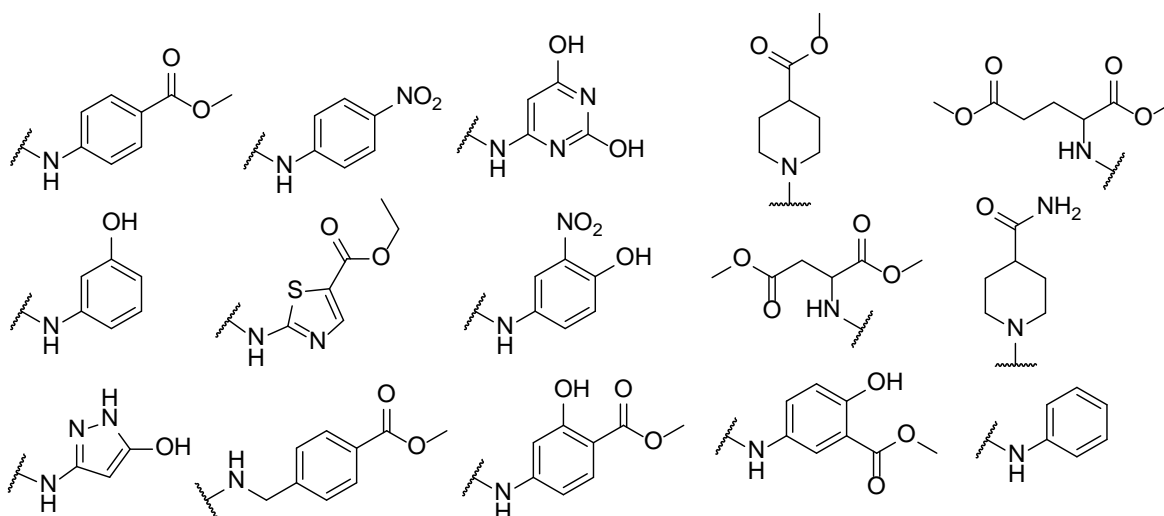
Slika 5: Računalniško sidranje spojine 5f v vezavno mesto znanega inhibitorja (Ib) GyrB (PDB koda 5DUH)



Slika 6: Računalniško sidranje spojine 5e (siva) v vezavno mesto na hidrolizo odpornega analoga ATP (zelena) (PDB koda 1EI1)

Z računalniškim sidranjem smo ugotovili, da se v ATP vezavno mesto GyrB najlepše vežejo derivati tirozina, zato bomo kot potencialne inhibitorje pripravili derivate te aminokisljine. Fenolna OH skupina tirozina je rahlo kislj (izračunana $pK_a = 9.4$), zato bi tudi ta fragment lahko imel pomembno vlogo pri prehajanju spojin v gramnegativne bakterije. Nekoliko presenetljivo so bile spojine s 4,5-dibromopirololem *in silico* ocenjene slabše, zato bomo v prvi seriji spojin najprej ovrednotiti pomen substituentov na mestu A na *in vitro* aktivnost. Ko bomo ugotovili, kakšna substitucija na mestu A daje najboljše rezultate encimskih in mikrobioloških testov, bomo spreminjali substituentne na mestu B. V drugi seriji spojin bomo tako pripravili derivate aromatskih in alifatskih aminov, ki vsebujejo predvsem kislj funkcionalne skupine ter ovrednotili *in vitro* aktivnost tako estrov, kot tudi hidroliziranih derivatov (slika 7).

Selektivnost naših spojin za GyrB bi lahko povečali (in s tem zmanjšali toksičnost za sesalske celice) s povečanjem fragmenta, ki se veže v adeninski žep, zato bomo pripravili tudi tribromopirolole derivate najbolj aktivnih spojin druge serije.



Slika 7: Načrtovani substituenti na mestu B za drugo serijo spojin

3 Materiali in metode

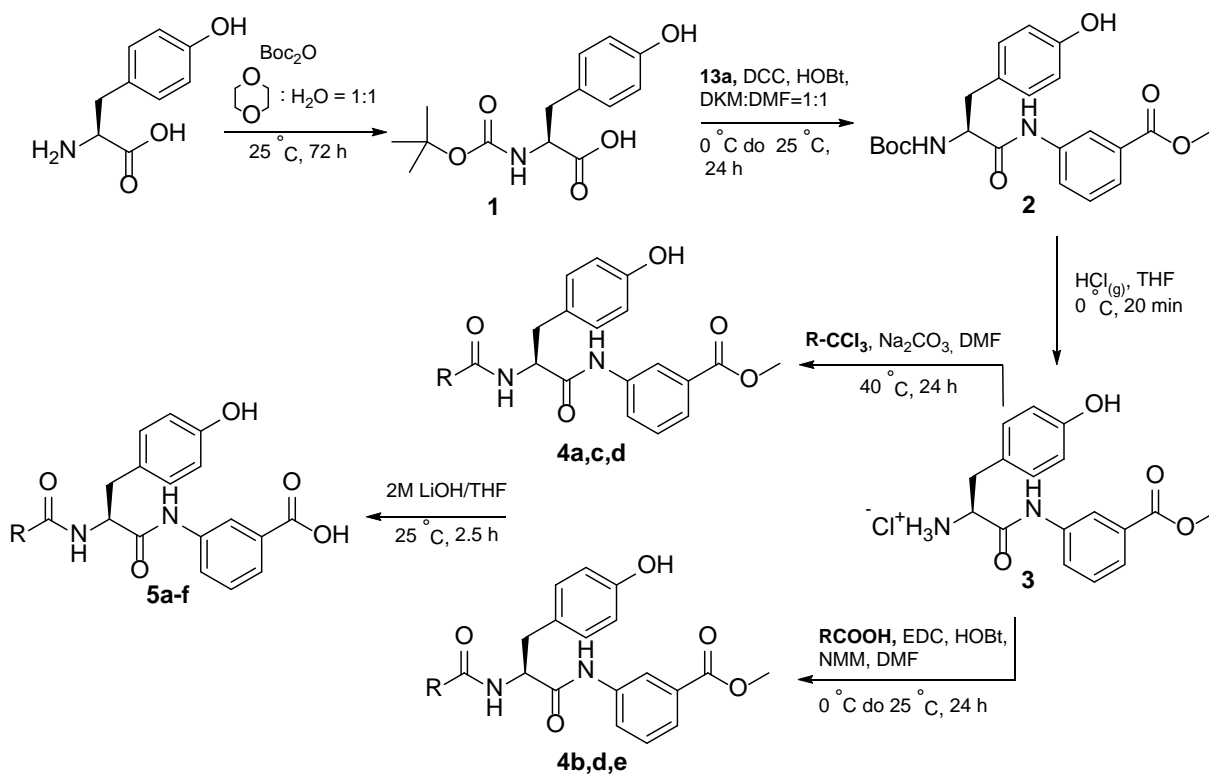
Komercialno dostopne kemikalije smo kupili pri proizvajalcih Acros Organics (Geel, Belgija) in Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, ZDA) in smo jih uporabili brez nadaljnega čiščenja. Za analitični TLC smo uporabili plošče s silikagelom 60 F₂₅₄ (0.25 mm), proizvajalca Merck. Za vizualizacijo smo uporabili UV svetlobo ($\lambda = 254$ nm in 365 nm) ter orositvene reagente ninhidrin, fosfomolibdensko kislino ali bromkrezol zeleno. Za preparativno flash kolonsko kromatografijo smo uporabili silikagel 60 (240-400 mesh). HPLC analize smo izvajali na instrumentu Agilent Technologies 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA) z UV-Vis detektorjem G1365B, termostatom G1316A in samovzorčevalnikom G1313A. Za reakcije, ki so potekale v mikrovalovnem reaktorju, smo uporabili CEM Discover mikrovalovni reaktor (CEM Corp., Matthews, NC, ZDA). Tališča smo določili na mikroskopu z grelno ploščo Reichert in so nekorrigirana. ¹H in ¹³C NMR spektre smo posneli pri 400 oziroma 100 MHz na spektrometru Bruker AVANCE III 400 (Bruker Corporation, Billerica, MA, ZDA) v DMSO-*d*₆, CDCl₃ ali MeOH-*d*₄ s tetrametilsilanom kot internim standardom. IR spektre smo posneli na spektrometru Thermo Nicolet Nexus FT-IR (Thermo Fisher Scientific, MA, ZDA). Masne spektre so posneli na Inštitutu Jožef Stefan na masnem spektrometru VG Analytical Autospec Q (Fisons, VG Analytical, Manchester, Velika britanija). Optična sučnost je bila izmerjena na Katedri za farmacevtsko kemijo s polarimetrom Perkin-Elmer 1241MC (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, ZDA) pri valovni dolžini 589,3 nm v kiveti dolžine 10 cm. Kemijska imena spojin so bila generirana s programom ChemBioDraw.

Zaviralno aktivnost na girazo B so ovrednotili z *E. coli* Microplate Assay Kit podjetja Inspiralis (Norwich, Velika Britanija). (31) Prva testiranja so opravili pri koncentraciji inhibitorja 100 μ M in 10 μ M in nato spojinam, ki so izkazovale inhibicijo pri teh koncentracijah, določili IC₅₀. SPR eksperiment so izvedli, kot je opisano v literaturi. (30) Protibakterijsko aktivnost spojin prve serije, ki so izkazovale zaviralno aktivnost na GyrB so ovrednotili na treh bakterijskih sevih (grampozitivnih *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ter gramnegativnem *Escherichia coli* ATCC 25922). Prva testiranja so opravili pri 50 μ M z metodo mikrodilucije gojišča in nato spojinam, ki so izkazovale več kot 80 % inhibicijo pri tej koncentraciji, določili MIC₉₀. Za drugo serijo spojin rezultati teh testiranj še niso na voljo, so pa na voljo rezultati testiranj na sevih *E. coli tolC* in *E. coli impA*. Prvi sev je izpeljan iz *E. coli* ECM1194 in nima funkcionalnega gena *tolC*, ki kodira protein, nujen za zunajmembransko komponento

efluks črpalke. Drugi sev je izpeljan iz *E. coli* MG1655 in ima mutacije na lokusu *imp* (povečana membranska permeabilnost, *increased membrane permeability*), kar spremeni permeabilnost zunanje membrane in poveča občutljivost na detergente, antibiotike in barvila.

4 Eksperimentalni del

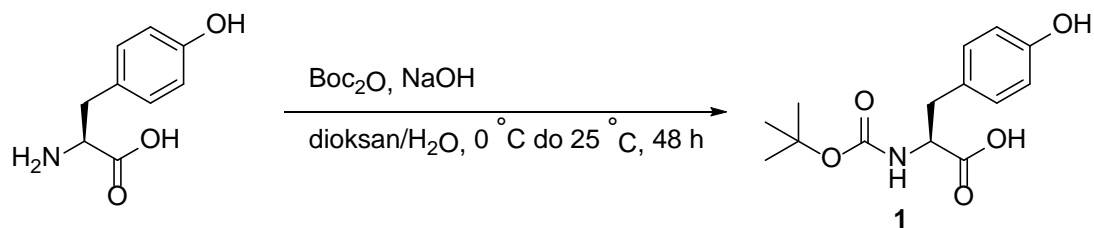
4.1 Sinteza prve serije spojin¹



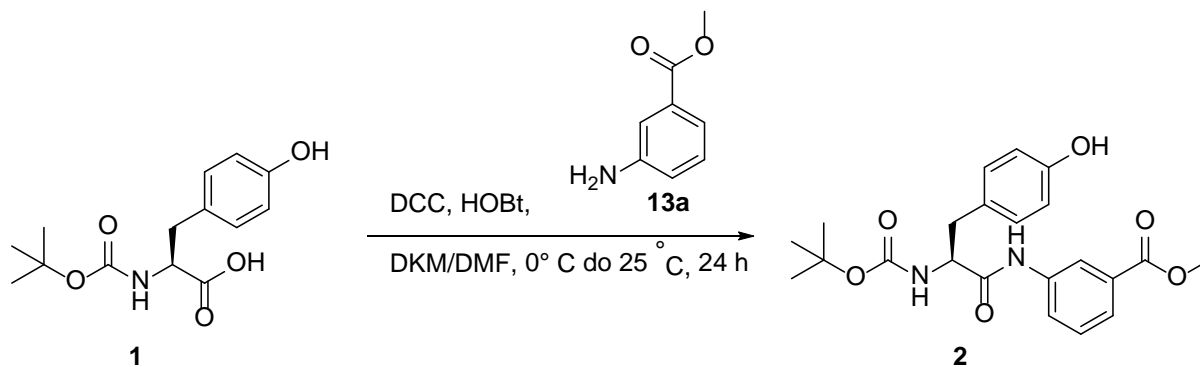
a: R=	b: R=	c: R=
d: R=	e: R=	f: R=

Slika 8: Sinteza prve serije spojin

¹ Prvo serijo spojin sva kot študentsko raziskovalno nalogo sintetizirala skupaj s kolegom Markom Trampužem.

Boc-L-tirozin (1)

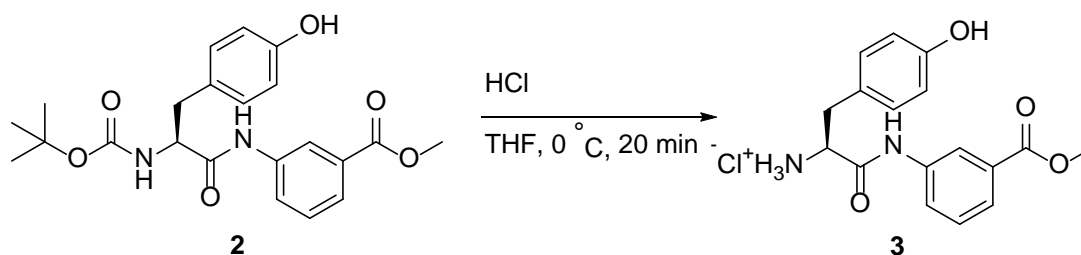
L-tirozin (8.80 g, 48.6 mmol) in NaOH (3.89g, 2 eq) raztopimo v 200 mL zmesi 1,4-dioksan:voda=1:1, ohlajene na 0 °C. Dodamo raztopino Boc_2O (10.64 g, 1eq), v 1,4-dioksanu (50 mL). Po 48 urah nakisamo do pH = 1, in spojino ekstrahiramo v EtOAc (3x 100 mL). Združene organske frakcije speremo z nasičeno raztopino NaCl , sušimo nad brezvodnim Na_2SO_4 in po filtraciji uparimo na rotavaporju. Dobimo bele kristale. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 1.40 (s, 9H, BOC- CH_3), 2.98 (dd, $J = 14.0, 6.0$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 3.02 (dd, $J = 14.0, 6.0$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 4.53 (ddd, $J = 8.4, 6.0, 6.0$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 5.10 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, NH), 6.69 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 6.95 (d, $J = 8.2$ Hz, fenol-3,5-H), 7.6 – 9.2 (bs, 2H, OH in COOH) ppm

Metil (S)-3-(2-((*tert*-butilkarbonil)amino)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)benzoat (2)

Na ledu raztopimo spojino **1** (5.03 g, 17.9 mmol), metil-3-aminobenzoat (**13a**) (5.39g, 2 eq), DCC (5.54 g, 1.5 eq) in HOBT (2.40 g, 1 eq) v 30 mL zmesi DKM:DMF = 1:1 in mešamo 24 ur. Uparimo topila in dodamo 100 mL EtOAc, ki ga spiramo z 10% vodno raztopino citronske kislina (2x 50 mL), nasičeno vodno raztopino NaHCO_3 (2x 50 mL) in nasičeno vodno raztopino NaCl (50 mL). Organsko fazo sušimo nad brezvodnim Na_2SO_4 , filtriramo in uparimo organsko fazo. Surovi produkt čistimo s flash kolonsko kromatografijo (n-heksan:EtOAc=1:1), da dobimo 5,66 g rahlo rožnatih kristalov (56%). Tališče: 187 °C. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ 1.33 (s, 9H, BOC- CH_3), 2.73 (dd, $J = 13.8, 9.7$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 2.87 (dd, $J = 13.8, 4.8$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 3.86 (s, 3H,

Me-ester-CH₃), 4.22 (ddd, $J = 9.7, 7.9, 4.8$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.65 (d, $J = 8.5$, 2H, fenol-2,6-H), 7.09 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, Boc-NH), 7.10 (d, $J = 8.5$, 2H, fenol-3,5-H), 7.46 (t, $J = 7.9$, 1H, anilin 5-H), 7.64 (dt, $J = 7.9, 1.7$ Hz, 1H, anilin-6-H), 7.85 (dd, $J = 7.9, 1.7$ Hz, 1H, aniline 4-H), 8.25 (dd, 1.7, 1.7 Hz, 1H, anilin 2-H), 9.19 (s, 1H, fenol-OH), 10.23 (s, 1H, Ar-amid-NH) ppm. ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 28.19, 36.58, 52.24, 57.07, 78.12, 114.85, 119.72, 123.70, 123.85, 127.87, 129.28, 130.08, 130.16, 139.36, 155.43, 155.83, 166.08, 171.36 ppm. MS (ESI): m/z 413.2 ([MH]⁻, 100), HRMS (ESI) za C₂₂H₂₅N₂O₆: izračunano, 413.1718; ugotovljeno, 413.1721. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 10% - 90% MeCN v TFA (0.1% v H₂O) v 15 min, nato 2.5 min pri 90%; pretok: 1.0 mL/min; volumen injeciranja: 5 μ l; retencijski čas: 15.9 min (97.7% pri 220 nm, 98.5% pri 254 nm)

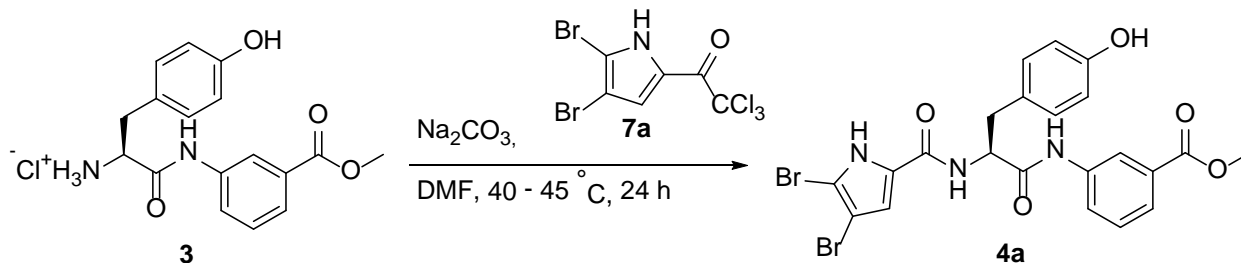
(S)-3-(4-hidroksifenil)-1-((3-(metoksikarbonil)fenil)amino)-1-oksopropan-2-aminijev klorid (3)



Spojino **2** (1.626g, 3.92mmol) raztopimo v THF (40 mL) in prepihujemo 20 min s HCl na ledeni kopeli. Ob dodatku dietiletra izpadejo beli kristali, ki jih nučamo, sušimo in hranimo v eksikatorju. 1.348 g (98 %). Tališče: 140 – 145 °C. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 3.01 (dd, $J = 13.8, 7.3$ Hz, 1H, benzil-CH₂), 3.12 (dd, $J = 13.8, 6.5$ Hz, 1H, benzil-CH₂), 3.86 (s, 3H, Me-ester-CH₃), 4.2 (bs, 1H, Tyr- α -CH), 6.70 (d, $J = 8.5$, 2H, fenol-2,6-H), 7.10 (d, $J = 8.5$, 2H, fenol-3,5-H), 7.50 (dd, $J = 8.1, 7.8$ Hz, 1H, anilin-5-H), 7.69 (ddd, $J = 7.8, 1.6, 1.0$ Hz, 1H, anilin-H), 7.85 (ddd, $J = 8.1, 2.1, 1.0$ Hz, 1H, anilin-H), 8.26 (dd, $J = 2.1, 1.8$ Hz, 1H, anilin-2-H), 8.4 (bs, 3H, NH₃), 9.41 (s, 1H), 11.14 (s, 1H) ppm. ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100MHz): δ 36.19, 52.32, 54.56, 115.36, 120.00, 124.02, 124.66, 129.48, 130.22, 130.52, 138.46, 138.51, 156.58, 165.94, 167.24 ppm. MS (ESI): m/z 315.1 ([MH]⁺, 100), HRMS (ESI) za C₁₇H₁₉N₂O₄: izračunano, 315.1339; ugotovljeno, 315.1339. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 10% - 90% MeCN v TFA (0.1% v H₂O) v 15 min, nato 2.5 min pri 90 %; pretok: 1.0 mL/min;

volumen injeciranja: 5 μ l; retencijski čas: 11.5 min (97.4 % pri 220 nm, 97.9 % pri 254 nm)

4.1.1 Tipični postopek za sintezo spojin 4a,c,d iz 2-trikloroacetilpirollov



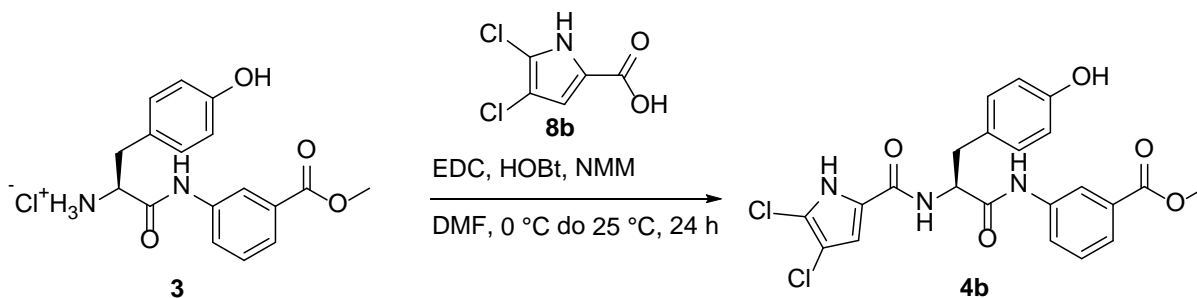
Metil (S)-3-(2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)benzoat (4a)

Spojino **3** (130 mg, 0.370 mmol) in Na_2CO_3 (35 mg, 1.1 eq) raztopimo v DMF (0.5 mL), prepihamo z Ar in mešamo na oljni kopeli, ogreti na 40 °C. Po kapljicah tekem 30 min dodajamo **7a** (135 mg, 1 eq), raztopljen v DMF (0.5 mL) in mešamo čez noč na 45°C. Nato uparimo DMF in dodamo EtOAc (20 mL) ter organsko fazo spiramo z 10 % vodno raztopino citronske kisline (2x 10mL), 1M NaOH (2x 10 mL), nato kislo frakcijo še enkrat spiramo z EtOAc (10 mL). Združene organske frakcije spiramo z nasičeno raztopino NaCl (20 mL), sušimo nad brezvodnim Na_2SO_4 , filtriramo in uparimo organsko frakcijo. Prekristaliziramo iz zmesi n-heksana in EtOAc, da dobimo rjavkaste kristale (41 mg, 20 %). Tališče: 126 – 132 °C. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ 2.88 (dd, $J = 13.8, 10.0$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 3.01 (dd, $J = 13.8, 4.9$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 3.85 (s, 3H, Me-ester- CH_3), 4.68 (ddd, $J = 10.0, 8.1, 4.9$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.64 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-2,4-H), 7.07 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.14 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.47 (dd, $J = 8.1, 7.9$ Hz, 1H, anilin-5H), 7.65 (ddd, $J = 7.9, 1.6, 1.0$ Hz, 1H, anilin-H), 7.86 (ddd, $J = 8.1, 2.1, 1.0$ Hz, 1H, anilin-H), 8.26 (dd, $J = 2.1, 1.6$ Hz, 1H, anilin-2-H), 8.37 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, amid-NH), 9.19 (s, 1H, Ar-amid-NH), 10.39 (s, 1H, fenol-OH), 12.64 (d, $J = 2.7$, 1H, pirol-NH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz): δ 37.23, 41.89, 52.11, 100.23, 102.44, 105.24, 114.93, 115.04, 124.99, 126.94, 127.16, 127.33, 128.11, 129.16, 130.27, 144.77, 156.03, 157.32, 166.10, 170.70 ppm. MS (ESI): m/z 563.9 ($[\text{MH}+2]^+$, 100), 562.0 ($[\text{MH}]^+$, 51), 566.0 ($[\text{MH}-2]^+$, 49),. HRMS (ESI) za $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5\text{Br}_2$: izračunano, 561.9619; ugotovljeno, 561.9599. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 40 % - 90 % MeOH v TFA (0.1 % v H_2O) v 15 min, nato 2.5 min pri

90%; pretok: 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 5 μ L; retencijski čas: 13.4 min (90.6 % pri 220 nm, 90.1 % pri 254 nm).

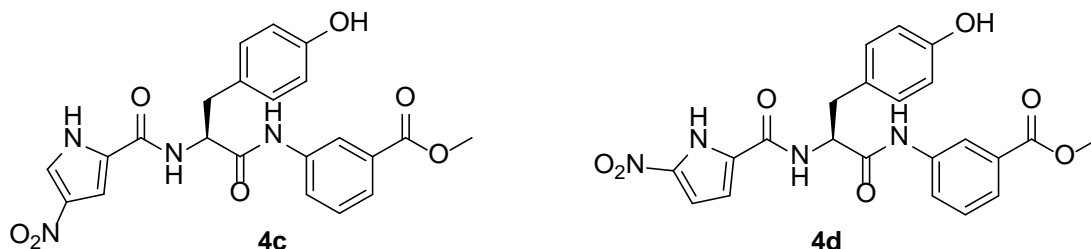
4.1.2 Tipični postopek za sintezo spojin 4b,e,f iz pirol-2-karboksilnih kislin

Metil (S)-3-(2-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)benzoat (4b)



Spojino **8b** (35 mg, 0.13 mmol), spojino **3** (52 mg, 1.1 eq), HOBt (25 mg, 1 eq) in NMM (105 μ L, 5 eq) raztopimo v DMF (2.5 mL) ter ohladimo na 0 °C. Nato dodamo EDC (46 mg, 1.25 eq) in mešamo čez noč. Po končani reakciji uparimo DMF in ostanek v bučki raztopimo v EtOAc (20 mL). Raztopino spiramo z 10 % vodno raztopino citronske kisline (2x 10 mL), nato kislno frakcijo še enkrat spiramo z EtOAc (10 mL). Združene organske frakcije nato spiramo z 1M NaOH (2x 10 mL), nasičeno raztopino NaCl (20 mL), sušimo nad brezvodnim Na₂S₄, filtriramo in uparimo organsko fazo. Čistimo z gradientno flash kromatografijo z uporabo mobilne faze n-heksan : EtOAc = 2 : 1 \rightarrow n-heksan : EtOAc = 1 : 1. Dobimo rjavkaste kristale. Tališče: 125 – 127 °C. IR (ATR): ν 3273, 2952, 1705, 1682, 1621, 1514, 1434, 1299, 1239, 1201, 1173, 752 cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.88 (dd, *J* = 13.9, 9.9 Hz, 1H, benzil-CH₂), 3.01 (d, *J* = 13.9, 1H, benzil-CH₂), 3.85 (s, 3H, Me-ester-CH₃), 4.7 (m, 1H, Tyr- α -CH), 6.64 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, fenol-2,4-H), 7.04 (d, *J* = 1.3 Hz, 1H, pirol-CH), 7.14 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.47 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H anilin-5-H), 7.65 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, anilin-H), 7.86 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, anilin-H), 8.26 (s, 1H, anilin-2-H), 8.40 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, amid-NH), 9.19 (s, 1H, Ar-amid-NH), 10.40 (s, 1H, fenol-OH), 12.68 (d, *J* = 1.3, 1H, pirol-NH) ppm. MS (ESI): *m/z* = 476.1 ([MH]⁺, 100), 478.1 ([MH+2]⁺, 64), 480.1 ([MH+4]⁺, 10). HRMS (ESI) za C₂₂H₂₀N₃O₅Cl₂: izračunano, 476.0775; ugotovljeno, 476.0779. [α]_D +32.3 (*c* 1.00, MeOH)

Metil (S)-3-(2-(4-nitro-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)benzoat (**4c**) in metil (S)-3-(2-(5-nitro-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)benzoat (**4d**)

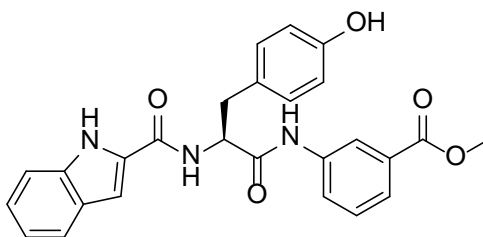


Spojini **4c** in **4d** pripravimo po tipičnem postopku za sintezo spojin **4** iz trikloroacetil pirollov in sicer iz spojine **3** (300 mg, 0.854 mmol) in zmesi 4 in 5-nitro-2-trikloroacetilpirollov (234 mg, 1 eq). Spojini očistimo s flash kromatografijo z uporabo mobilne faze $\text{CHCl}_3 : \text{MeOH} : \text{AcOH} = 10 : 0.5 : 0.1$. Ločimo oba derivata, ki sta oranžna praška. **4c**: 157 mg. Tališče: 140 °C. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ 2.91 (dd, $J = 13.8, 10.2$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 3.04 (dd, 13.8, 5.0 Hz, 1H, benzil- CH_2), 3.85 (s, 3H, Me-ester- CH_3), 4.73 (ddd, $J = 10.2, 8.1, 5.0$, 1H, Tyr- α -CH), 6.65 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.17 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.47 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1H, anilin-5-H), 7.62 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.65 (ddd, $J = 8.0, 1.9, 1.3$ Hz, 1H, anilin-H), 7.88 (ddd, $J = 8.0, 1.9, 1.2$ Hz, 1H, anilin-H), 7.91 (d, $J = 1.6$ Hz, 1H, pirol-CH), 8.27 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, anilin-2-H), 8.74 (d, $J = 8.1$, 1H, amid-NH), 9.2 (bs, 1H, fenol-OH), 10.43 (s, 1H, Ar-amid-NH), 12.4 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz): δ 36.45, 52.25, 55.81, 106.07, 114.95, 119.89, 122.88, 123.84, 124.04, 126.49, 127.84, 129.31, 130.12, 136.33, 136.33, 139.23, 155.87, 159.44, 166.06, 170.69, 172.16 ppm. MS (ESI): m/z 451.1 ($[\text{MH}]^-$, 100). HRMS (ESI) za $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_7$: izračunano, 451.1259; ugotovljeno, 451.1249. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 10 % - 90 % MeCN v TFA (0.1 % v H_2O) v 15 min, nato 2.5 min pri 90 %; pretok: 1.0 mL/min; volumen injeciranja: 5 μl ; retencijski čas: 14.6 min (97.5 % pri 254 nm, 96.2 % pri 260 nm).

4d: 130mg. Tališče: 124°C. IR (ATR): ν 3281, 3143, 2952, 1702, 1637, 1556, 1514, 1443, 1290, 1236, 1204, 1106, 808, 754, 681 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{MeOH-}d_4$, 400 MHz): δ 3.04 (dd, $J = 13.8, 8.2$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 3.17 (dd, $J = 13.8, 7.1$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 3.90 (Me-ester- CH_3), 4.83 (dd, $J = 8.2, 7.1$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.68 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-2,6-

H), 6.90 (d $J = 4.3$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.07 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.12 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.41 (dd, $J = 8.2, 7.7$ Hz, 1H, anilin-5-H), 7.73 (ddd, $J = 8.2, 2.3, 1.1$ Hz, 1H, anilin-H), 7.75 (ddd, $J = 7.7, 1.7, 1.1$ Hz, 1H, anilin-H), 8.19 (dd, $J = 2.3, 1.7$ Hz, 1H, anilin-2-H) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100MHz): δ 36.74, 52.22, 55.66, 110.92, 113.15, 114.83, 114.98, 119.89, 123.83, 124.09, 127.41, 129.30, 130.07, 138.61, 139.10, 155.89, 166.01, 170.36 ppm. MS (ESI): m/z 451.1 ($[\text{MH}]^-$, 100). HRMS (ESI) za $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_7$: izračunano, 451.1259; ugotovljeno, 451.1250. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 10 % - 90 % MeCN v TFA (0.1 % v H_2O) v 15 min, nato 2.5 min pri 90 %; pretok: 1.0 mL/min; volumen injeciranja: 5 μl ; retencijski čas: 15.1 min (90.8 % pri 220 nm, 90.1 % pri 254 nm).

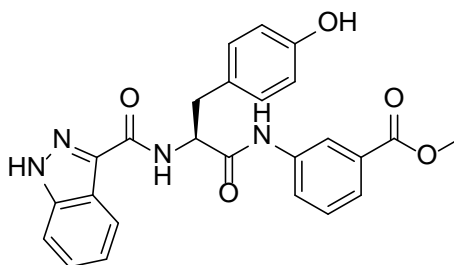
Metil (S)-3-(2-(1H-indol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)benzoat (4e)



Spojino **4e** sintetiziramo po tipičnem postopku za sintezo spojin **4** iz karboksipirolov iz spojine **3** (130 mg, 0.373 mmol) in 2-karboksi-1H-indola (66 mg, 1.1 eq). Prekristalizacija surovega produkta iz EtOAc/n-heksan dá rumenkaste kristale z maso 66 mg, 39 %. Tališče: 127 – 130 °C. IR (ATR): ν 3283, 2951, 1705, 1624, 1593, 1540, 1514, 1488, 1439, 1300, 1231, 1202, 1173, 1107, 812, 746 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2.99 (dd, $J = 13.7, 9.8$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 3.07 (dd, $J = 13.7, 5.1$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 3.87 (s, 3H, Me-ester- CH_3), 4.79 (ddd, $J = 9.8, 7.9, 5.1$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.65 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.04 (ddd, $J = 8.0, 6.9, 0.8$ Hz, 1H, indol-5-H), 7.18 (ddd, $J = 8.3, 6.9, 1.1$ Hz, 1H, indol-6-H), 7.20 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.27 (dd, $J = 2.2, 0.9$ Hz, 1H, indol-3-H), 7.41 (dd, $J = 8.3, 0.8$ Hz, 1H, indol-7-H), 7.49 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1H, anilin-5-H), 7.65 (dd, $J = 8.0, 0.9$ Hz, 1H, indol-4-H), 7.67 (ddd, $J = 8.0, 1.6, 1.2$ Hz, 1H, anilin-H), 7.90 (ddd, $J = 8.0, 2.2, 1.2$ Hz, 1H, anilin-H), 8.29 (dd, $J = 2.2, 1.6$ Hz, 1H, anilin-2-H), 8.72 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, amid-NH), 9.18 (s, 1H, Ar-amid-NH), 10.46 (s, 1H, fenol-OH), 11.53 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, pirol-NH) ppm. MS (ESI): m/z 456.1 ($[\text{MH}]^-$, 100). HRMS (ESI) za $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_5$: izračunano, 456.1565; ugotovljeno, 456.1555. HPLC:

Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 40 % - 90 % MeCN v TFA (0.1 % v H₂O) v 16 min, nato 2.5 min pri 90 %; pretok: 1.0 mL/min; volumen injeciranja: 5 µl; retencijski čas: 13.3 min (93.9 % pri 220 nm, 93.0 % pri 254 nm). $[\alpha]_D^{20} = +34.2$ (*c* 1.00, MeOH)

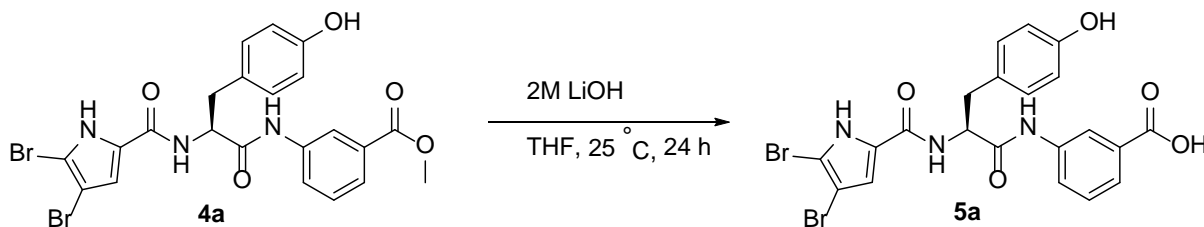
Metil (S)-3-(2-(1*H*-indazol-3-karboxamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)benzoat (4f)



Spojino **4f** sintetiziramo po tipičnem postopku za sintezo spojin **4** iz karboksipirolov iz spojine **3** (102 mg, 0.373 mmol) in 3-karboksi-1*H*-indazola (47 mg, 1.1eq). Spojino čistimo s flash kromatografijo z uporabo mobilne faze n-heksan : EtOAc = 1 : 1, da dobimo bele kristale. Tališče: 123 – 124 °C. IR (ATR): ν 3267, 1702, 1639, 1613, 1534, 1514, 1439, 1292, 1234, 1170, 750 cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 3.08 (dd, *J* = 15.4, 6.3, 1H, benzil-CH₂), 3.11 (dd, *J* = 15.4, 6.3, 1H, benzil-CH₂), 3.85 (s, 3H, Me-ester-CH₃), 4.86 (td, *J* = 8.0, 6.3 Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.11 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.23 (ddd, *J* = 8.2, 7.0, 0.7 Hz, 1H, indazol-6-H), 7.41 (ddd, *J* = 8.4, 7.0, 1.0 Hz, 1H, indazol-5-H), 7.48 (dd, *J* = 7.9, 7.9 Hz, 1H, anilin-5-H), 7.62 (ddd, *J* = 8.4, 1.0, 1.0 Hz), 1H, indazol-7-H), 7.66 (ddd, *J* = 7.9, 1.8, 1.0 Hz, 1H, anilin-H), 7.87 (ddd, *J* = 7.9, 2.2, 1.0 Hz, 1H, anilin-H), 8.11 (dd, *J* = 8.2, 0.7 Hz, 1H, indazol-4-H), 8.20 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, amid-NH), 8.27 (dd, *J* = 2.2, 1.8 Hz, 1H, anilin-2-H), 9.21 (s, 1H, Ar-amid-NH), 10.44 (s, 1H, fenol-OH), 13.66 (s, 1H, pirol-NH). MS (ESI): *m/z* 459.2, ([MH]⁺, 100). HRMS (ESI) za C₂₅H₂₃N₄O₅: izračunano, 459.1663; ugotovljeno, 459.1664.

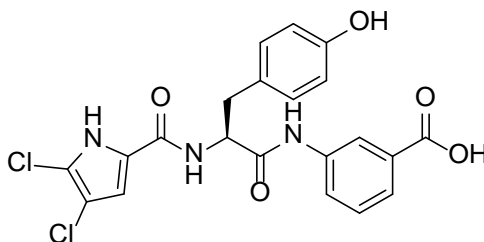
4.1.3 Tipični postopek za hidrolizo estrov (4a-f, 12b-f, 12et in 12ft) do končnih spojin (5a-f, 12b'-f', 12e't in 12ft)

(S)-3-(2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)benzojska kislina (5a)



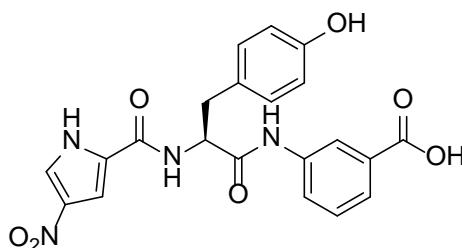
Spojino **4a** (50 mg, 88 μmol) raztopimo v THF (1 mL) in dodamo 2M vodno raztopino LiOH (0.5 mL, 5 eq) ter mešamo čez noč na sobni temperaturi. Nato dodamo EtOAc (10 mL) in dobljeno raztopino spiramo z 1M NaOH (2x 5 mL). Vodno fazo nakisamo s koncentrirano klorovodikovo kislino do pH = 1 in spojino ekstrahiramo iz vodne faze v EtOAc (3x 5 mL). Združene organske frakcije spiramo z nasičeno raztopino NaCl (10 mL), sušimo nad brezvodnim Na_2SO_4 , filtriramo in uparimo topilo. Čistimo s flash kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze n-heksan : EtOAc : AcOH = 1 : 1 : 0.01, da dobimo rjavkaste kristale. Tališče: 127 – 132 °C. IR (ATR): ν 3144, 2359, 1683, 1612, 1554, 1513, 1437, 1392, 1301, 1232, 1106, 974, 809, 752 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ 2.88 (dd, $J = 13.7$ Hz, 10.3 Hz, 1H, benzil-H), 3.01 (dd, $J = 13.7$, 4.5 Hz, 1H, benzil-H), 4.69 (ddd, $J = 10.3$, 8.0, 4.5 Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.07 (s, 1H, pirol-CH), 7.14 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.43 (dd, $J = 7.9$, 7.9 Hz, 1H, anilin-5-H), 7.63 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, anilin-H), 7.84 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, anilin-H), 8.22 (s, 1H, anilin-2-H), 8.37 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, amid-NH), 9.19 (s, 1H, Ar-amid-NH), 10.36 (s, 1H, fenol-OH), 12.64 (s, 1H, pirol-NH), 13.0 (bs, 1H, COOH) ppm. MS (ESI): m/z 550.0 ($[\text{MH}+2]^+$, 100), 548.0 ($[\text{MH}]^+$, 51), 552.0 ($[\text{MH}+4]^+$, 49). HRMS za $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_5\text{Br}_2$: izračunano, 547.9462; ugotovljeno, 547.9469. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 70 % - 90 % MeOH v TFA (0.1 % v H_2O) v 15 min, nato 2.5 min pri 90 %; pretok: 1.0 mL/min; volumen injeciranja: 5 μl ; retencijski čas: 2.87 min (93.6 % pri 220 nm, 95.0 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +27.0$ (c 1.00, MeOH).

(S)-3-(2-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)benzojska kislina (5b)



Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za hidrolizo estrov do končnih spojin iz spojine **4b** in čistimo z gradientno flash kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze n-heksan : EtOAc : AcOH = 2 : 1 : 0.01 → n-heksan : EtOAc : AcOH = 1 : 1 : 0.01, da dobimo rjavkaste kristale. Tališče: 127 – 132°C. IR (ATR): ν 3270, 1677, 1612, 1599, 1560, 1513, 1436, 1229, 1104, 1019, 812, 754 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2.89 (dd, $J = 13.8, 10.1$ Hz, 1H, benzil-H), 3.02 (dd, 13.8, 4.8 Hz, 1H, benzil-H), 4.70 (ddd, $J = 10.1, 7.9, 4.8$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.65 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.05 (s, 1H, pirol-CH), 7.15 (d $J = 8.4$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.44 (dd, $J = 8.0, 7.8$ Hz, 1H, anilin-5-H), 7.64 (ddd, $J = 7.8, 1.6, 1.1$ Hz, 1H, anilin-H), 7.85 (ddd, $J = 8.0, 2.3, 1.0$ Hz, 1H, anilin-H), 8.23 (dd, $J = 2.3, 1.6$ Hz, 1H, anilin-3-H), 8.41 (d $J = 7.9$ Hz, 1H, amin-NH), 9.20 (s, 1H, Ar-amid-NH), 10.37 (s, 1H, fenol-OH), 12.70 (s, 1H, pirol-NH), 12.9 (bs, COOH) ppm. MS (ESI): m/z 460.1 ($[\text{MH}]^+$, 100), 462.1 ($[\text{MH}+2]^+$, 64), 464.1 ($[\text{MH}+4]^+$, 10). HRMS za $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_5\text{Cl}_2$: izračunano, 460.0472; ugotovljeno, 460.0472. $[\alpha]_D^{25} +29.2$ (c 1.00, MeOH).

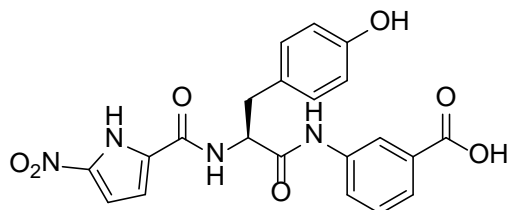
(S)-3-(2-(4-nitro-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)benzojska kislina (5c)



Spojino **5c** sintetiziramo po tipičnem postopku za hidrolizo estrov do končnih spojin iz spojine **4c** in čistimo s flash kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze n-heksan : EtOAc : AcOH = 1 : 1 : 0.01, da dobimo rjavkaste kristale. Tališče: 163 – 165 °C. IR

(ATR): ν 3267, 3137, 1693, 1671, 1611, 1593, 1531, 1514, 1446, 1414, 1370, 1312, 1259, 1205, 1174, 1105, 889, 839, 811, 749 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{MeOH-}d_4$, 400 MHz): δ 3.06 (dd, $J = 13.7, 8.3$ Hz, 1H, benzil-H), 3.20 (dd, $J = 13.7, 7.1$ Hz, 1H, benzil-H), 4.87 (dd, $J = 8.3, 7.1$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.71 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 6.91 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.07 (d, $J = 4.3$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.15 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.42 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1H, anilin-5-H), 7.73 – 7.77 (m, 2H, anilin-4,6-H), 8.17 (t, $J = 2.0$ Hz, anilin-2-H) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz): δ 38.51, 57.61, 111.37, 113.42, 116.41, 122.76, 125.89, 126.69, 128.84, 130.04, 130.66, 131.51, 132.74, 139.78, 140.68, 157.53, 161.43, 169.57, 172.43 ppm. MS (ESI): m/z 437.1 ($[\text{MH}]^+$, 100). HRMS (ESI) za $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_7$: izračunano, 437.1103; ugotovljeno, 437.1093. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 10 % - 90 % MeCN v TFA (0.1 % v H_2O) v 15 min, nato 2.5 min pri 90%; pretok: 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 5 μl ; retencijski čas: 13.438 min (93.4 % pri 254 nm, 90.9 % pri 260 nm). $[\alpha]_D = +49.7$ (c 1.00, MeOH).

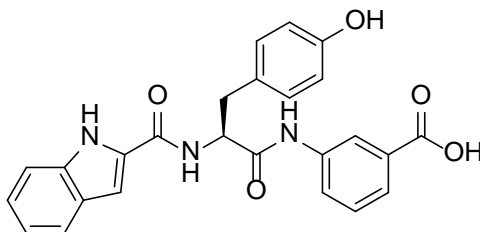
(S)-3-(2-(5-nitro-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)benzojska kislina (5d)



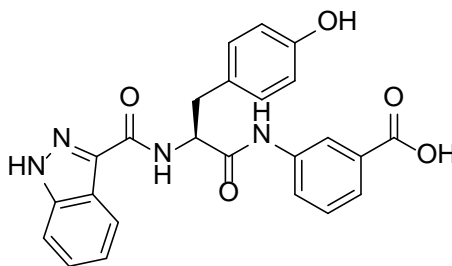
Spojino **5d** sintetiziramo po tipičnem postopku za hidrolizo estrov do končnih spojin iz spojine **4d**. Spojina je zadovoljivo čista že po ekstrakciji iz kisle faze v EtOAc in je ne čistimo dodatno s kolonsko kromatografijo. Tališče: 125 – 134 $^{\circ}\text{C}$. IR (ATR): ν 3276, 3128, 1696, 1638, 1592, 1556, 1514, 1446, 1367, 1288, 1231, 1174, 1106, 1046, 807, 754 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ 2.91 (m, 1H, benzil- CH_2), 3.07 (m, 1H, benzil- CH_2), 4.80 (m, 1H, Tyr- α -CH), 6.66 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 6.93 (s, 1H, pirol-CH), 7.15 (m, 3H, fenol-3,5-H in pirol CH), 7.65 (dd, $J = 7.6, 7.6$ Hz, 1H, anilin-5-H), 7.65 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, anilin-H), 7.85 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, anilin-H), 8.24 (s, 1H), 8.86 (d, $J = 6.7$ Hz, pirol-CONH), 9.23 (s, 1H), 10.45 (s, 1H, fenol-OH), 12.6-13.3 (bs, 1H, COOH), 13.53 (s, 1H, pirol-NH) ppm. MS (ESI): m/z 437.1 ($[\text{MH}]^+$, 100). HRMS (ESI) za $\text{C}_{21}\text{H}_{17}\text{N}_4\text{O}_7$: izračunano, 437.1103; ugotovljeno, 437.1094. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 20 % - 50 % MeCN v TFA (0.1 % v H_2O)

v 15 min, nato 2.5 min pri 90 %; pretok: 1.0 mL/min; volumen injeciranja: 5 μ l; retencijski čas: 13.9 min (91.5 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +11.7$ (*c* 1.00, MeOH).

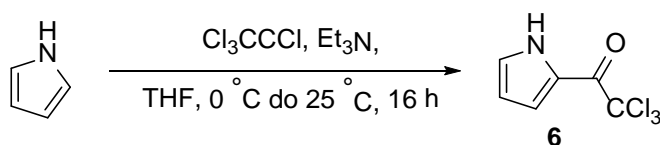
(S)-3-(3-(4-hidroksifenil)-2-(1*H*-indol-2-karboksamido)propanamido)benzojska kislina (5e)



Spojino **5e** sintetiziramo po tipičnem postopku za hidrolizo estrov do končnih spojin iz spojine **4e**. Surovi produkt po ekstrakcijah čistimo s prekristalizacijo iz n-heksan/EtOAc, da dobimo bele kristale. Tališče: 146 – 149°C. IR (ATR): ν 3236, 1707, 1687, 1635, 1618, 1540, 1514, 1485, 1373, 1300, 1251, 1198, 1168, 1115, 1047, 809, 757, 679, 649 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$), 400 MHz): δ 2.97 (dd, $J = 13.6, 10.0$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 3.06 (dd, $J = 13.6, 4.9$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 4.78 (ddd, $J = 10.0, 8.2, 4.9$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.64 (d, $J = 8.4$ Hz, fenol-2,6-H), 7.03 (ddd, $J = 8.0, 7.0, 0.9$ Hz, 1H, indol-5-H), 7.17 (ddd, $J = 8.3, 7.0, 1.1$ Hz, 1H, indol-6-H), 7.19 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.25 (dd, $J = 2.1, 0.8$ Hz, 1H, indol-3-H), 7.40 (dd, $J = 8.3, 0.9$ Hz, 1H, indol-7H), 7.44 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz), 7.61-7.65 (m, 2H, indol-4-H in anilin-H), 7.85 (ddd, $J = 8.0, 1.9, 1.0$ Hz, 1H, anilin-H), 8.24 (dd, $J = 1.9, 1.9$ Hz, 1H, anilin-2-H), 8.70 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, pirol-CONH), 9.23 (s, 1H, Ar-amid-NH), 10.41 (s, 1H, fenol-OH), 11.5 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, pirol-NH), 16.5 (bs, 1H, COOH) ppm. MS (ESI): m/z 442.1 ($[\text{MH}]^-$, 100). HRMS (ESI) za $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_3\text{O}_5$: izračunano, 442.1408; ugotovljeno, 442.1400. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 40 % - 90 % MeCN v TFA (0.1 % v H_2O) v 16 min, nato 2.5 min pri 90%; pretok: 1.0 mL/min; volumen injeciranja: 5 μ l; retencijski čas: 11.796 min (99.1 % pri 220 nm, 98.8 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +29.1$ (*c* 1.00, MeOH).

(S)-3-(3-(4-hidroksifenil)-2-(1H-indazol-3-karboksamido)propanamido)benzojska kislina (5f)

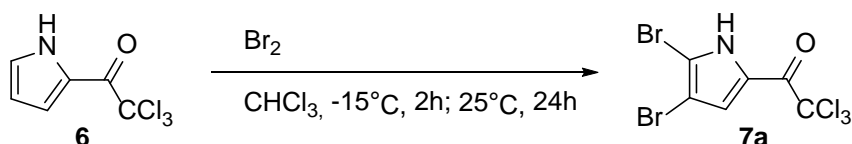
Spojino **5f** sintetiziramo po tipičnem postopku za hidrolizo estrov do končnih spojin iz spojine **4f** in jo čistimo s flash kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze: n-heksan : EtOAc : AcOH = 1 : 5 : 0.05, da dobimo bele kristale. Tališče: 125 – 130°C. IR (ATR): ν 3261, 1642, 1613, 1593, 1534, 1514, 1444, 1234, 1169, 749 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 3.06-3.11 (m, 2H, benzil- CH_2), 4.85 (m, 1H, Tyr- α -CH), 6.63 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.11 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.23 (ddd, $J = 8.1, 7.0, 0.7$ Hz, 1H, indazol-6-H), 7.41 (ddd, $J = 8.3, 7.0, 1.1$ Hz, 1H, indazol-5-H), 7.44 (dd, $J = 7.9, 7.9$ Hz, 1H, anilin-5-H), 7.62 (ddd, $J = 8.3, 0.7, 0.7$ Hz, 1H, indazol-7-H), 7.63 (ddd, $J = 7.9, 1.7, 1.0$ Hz, 1H, anilin-H), 7.84 (ddd, $J = 7.9, 2.1, 1.0$ Hz, 1H, anilin-H), 8.10 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.18 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H), 8.22 (dd, $J = 2.1, 1.7$ Hz, 1H, anilin-2-H). MS (ESI) $m/z = 445.1$ ($[\text{MH}]^+$, 100). HRMS (ESI) za $\text{C}_{24}\text{H}_{21}\text{N}_4\text{O}_5$: izračunano, 445.1506; ugotovljeno, 445.1499.

4.2 Sinteza pirolnih gradnikov**2-Trikloroacetil-1H-pirol (6)**

Spojino sintetiziramo po objavljenem literaturnem postopku. (32) Trikloroacetilklorid (61.3 mL, 1.3 eq) kapljamo pol ure pri 0 °C in v argonovi atmosferi v raztopino pirola (30.0 mL, 0.432 mol) in trietilamina (78.5 mL, 1.3 eq) v THF (400 mL). Mešamo 16 ur, nato dodamo EtOAc (200 mL) in dobljeno raztopino spiramo z nasičeno vodno raztopino NaHCO_3 (2x 200 mL), 1M HCl (200 mL), nasičeno vodno raztopino NaCl (200 mL) ter sušimo nad brezvodnim Na_2SO_4 . Filtriramo in uparimo do suhega (EtOAc moti

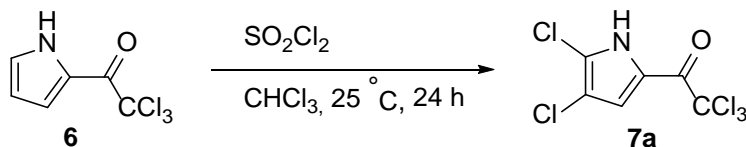
kristalizacijo). Kristaliziramo iz n-heksana, da dobimo srebrno svetlikajoče mazave kristale: 63.83 g (70 %). $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 6.37 (dt, $J = 4.1, 2.5$ Hz, 1H, pirol-4-H), 7.17 (ddd, $J = 3.1, 2.5, 1.3$ Hz, 1H), 7.38 (ddd, $J = 4.1, 2.5, 1.3$ Hz, 1H), 9.7 (bs, 1H, pirol-NH). Kemijski premiki in sklopitvene konstante signalov se ujemajo z literaturnimi podatki (32).

4,5-Dibromo-2-trikloroacetil-1H-pirol (7a)



2-Trikloroacetil-1H-pirol (**6**) (20.0 g, 94.1 mmol) raztopimo v kloroformu (700 mL), raztopino preprihamo z Ar in jo ohladimo na -15°C . Tekom dveh ur v raztopino kapljamo Br_2 (10.7 mL, 2.2 eq) in pustimo, da se med mešanjem reakcijska zmes čez noč segreje na sobno temperaturo. Po končani reakciji raztopino spiramo s 5 % vodno raztopino $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (200 mL), pri čemer izpade malo oborine, ki jo odfiltriramo in kasneje prekristaliziramo skupaj z ostalim produktom. Organsko fazo spiramo z vodo (200 mL), nasičeno vodno raztopino NaCl (100 mL), sušimo nad brezvodnim Na_2SO_4 , filtriramo in koncentriramo na rotavaporju. Izpadejo črni kristali, ki jih odnučamo in spiramo z ohlajenim kloroformom, da dobimo bele kristale, ki na svetlobi posivijo. Matičnico spet koncentriramo in postopek kristalizacije pri -20°C ponovimo. Po dveh kristalizacijah dobimo 27.41g (82 %) produkta. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO}-d_6$, 400 MHz): δ 7.39 (s, 1H, pirol-CH), 13.75 (s, 1H, pirol-NH) ppm. Kemijski premiki signalov se ujemajo z literaturnimi podatki (33).

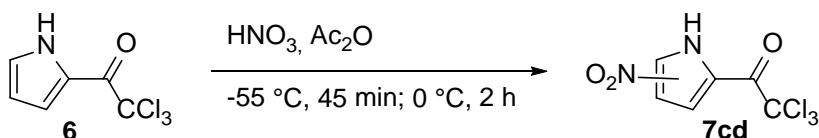
4,5-Dikloro-2-trikloroacetil-1H-pirol (7b)



2-Trikloroacetil-1H-pirol (**6**) (5.00 g, 23.5 mmol) raztopimo v kloroformu (65 mL) in mešamo pod Ar. Nato po kapljicah med mešanjem tekom 15 min dodajamo sulfuril klorid (4 mL, 2,1 eq) in pustimo mešati čez noč. Po končani reakciji reakcijsko zmes spiramo z nasičeno raztopino NaHCO_3 (2x 30 mL), sušimo nad brezvodnim Na_2SO_4 , filtriramo in uparimo, da dobimo surovi produkt. Čistimo ga s flash kolonsko kromatografijo

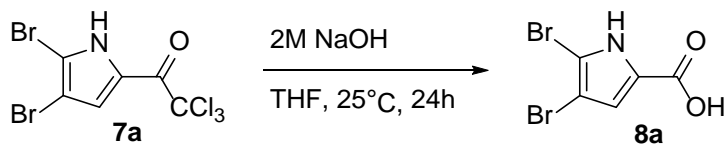
(kristalizacije so neuspešne) z uporabo mobilne faze: n-heksan : EtOAc = 10 : 1. Pri uparevanju čistih frakcij na rotavaporju izpadejo beli kristali. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 7.43 (s, 1H, pirol-CH), 13.87 (s, 1H, pirol-NH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100MHz): δ 94.17, 110.84, 119.67, 119.91, 123.60, 171.20 ppm. Kemijski premiki signalov se ujemajo z literaturnimi podatki (34).

Zmes 4-nitro-2-trikloroacetil-1H-pirola in 5-nitro-2-trikloroacetil-1H-pirola (7cd)

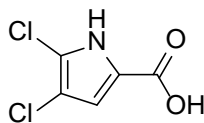


V raztopino 2-trikloroacetil-1H-pirola (**6**) (1.94 g, 9.11 mmol) v acetanhidridu (10.7 ml, 10 eq) pri -55°C kapljamo 65% dušikovo kislino (0.86 mL, 1,4 eq) tekom 45 minut. Reakcijsko zmes nato prestavimo na ledeno kopel za 2 uri. Reakcijo ustavimo z dodatkom 20 mL ledene vode in pustimo čez vikend, da izpadejo beli kristali, zmes 4 in 5 nitriranega derivata v razmerju 3.3 : 1 (glede na $^1\text{H-NMR}$). $^1\text{H-NMR}$ (MeOH- d_4 , 400 MHz): δ 7.14 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, 5-nitropirol-CH), 7.37 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H, 5-nitropirol-CH), 7.77 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 4-nitropirol-CH), 8.08 (d, $J = 1.5$ Hz, 1H, 4-nitropirol-CH) ppm.

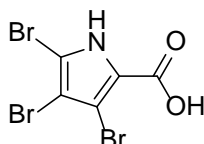
4,5-Dibromo-1H-pirol-2-karbonsilna kislina (8a)



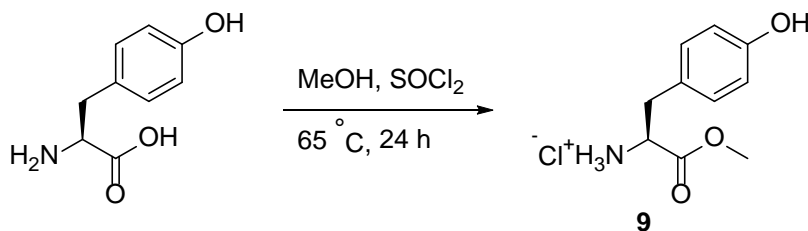
V THF (200 mL) raztopimo **7a** (15 g, 40.5 mmol) in dodamo 2M NaOH (100 mL, 5eq) ter mešamo čez noč. Nato dodamo EtOAc (200 mL), ki ga speremo z 1M HCl (300 mL). Vodno fazo nato ponovno spiramo z EtOAc (2x 100 mL), združene organske frakcije pa nato spiramo z nasičeno raztopino NaCl (200 mL). Organsko topilo sušimo nad brezvodnim Na_2SO_4 , filtriramo in uparimo, da dobimo 10.9 g rdečkastih kristalov (100%). $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 6.84 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, pirol-CH), 12.7 (bs, 1H, COOH), 12.98 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, pirol-NH) ppm. Kemijski premiki in sklopitvene konstante signalov se ujemajo z literaturnimi podatki (35).

4,5-Dikloro-1*H*-pirol-2-karboksilna kislina (8b)

V THF (20 mL) raztopimo **7a** (2 g, 11 mmol) in dodamo 2M NaOH (10 mL, 5eq) ter mešamo čez noč. Nato dodamo EtOAc (20 mL), ki ga speremo z 1M HCl (30 mL). Vodno fazo nato ponovno spiramo z EtOAc (2x 10 mL), združene organske frakcije pa nato spiramo z nasičeno raztopino NaCl (20 mL). Organsko topilo sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄, filtriramo in uparimo, da dobimo sive kristale. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 6.81 (s, 1H), 12.86 (s, 1H), 13.03 (s, 1H) ppm. Kemijski premiki se ujemajo z literaturnimi podatki (36).

3,4,5-Tribromo-1*H*-pirol-2-karboksilna kislina (8t)

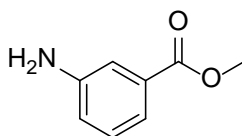
¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 12.99 (bs, 1H), 13.37 (bs, 1H) ppm. ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 103.36, 104.29, 106.70, 122.52, 159.40 ppm. Kemijski premiki se ujemajo z literaturnimi podatki (36).

4.3 Sinteza gradnikov za drugo serijo spojin**4.3.1 Tipičen postopek za sintezo metilnih estrov (9 in 13a-e)****(*S*)-3-(4-hidroksifenil)-1-metoksi-1-oksopropan-2-aminijev klorid (9)**

L-tirozin (7.00 g, 38.6 mmol) suspendiramo v MeOH (300 mL) in ohladimo na 0 °C. Po kapljicah dodamo SOCl₂ (3.1 mL, 1.1eq) in mešamo čez noč pri refluxu. Po odparitvi topila dobimo 8.9 g (100%) belih kristalov, ki jih spiramo z dietil etrom in sušimo na

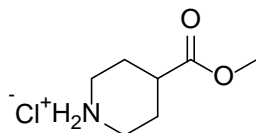
vakuumski črpalki eno uro. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ 3.01 (dd, $J = 14.2, 5.8$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 3.08 (dd, $J = 14.2, 5.8$ Hz, 1H, benzil- CH_2) 3.67 (s, 3H, Me-ester- CH_3), 4.15 (dd, $J = 7.1, 5.8$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.73 (d, $J = 8.6$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.01 (d, $J = 8.57$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 6.6 (bs, 3H, NH_3), 9.51 (s, 1H, fenol-OH) ppm.

Metil 3-aminobenzoat (13a)



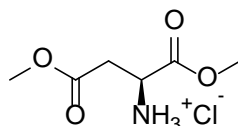
Spojino pripravimo po tipičnem postopku za sintezo metilnih estrov iz 3-aminobenzojske kisline. Na koncu spojino nevtraliziramo z nasičeno vodno raztopino NaHCO_3 in jo ekstrahiramo v DKM ter uparimo topilo, da dobimo rjavkaste kristale. $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 400 MHz): δ 3.76 (s, 2H, NH_2), 3.86 (s, 3H, Me-ester- CH_3), 6.85 (ddd, $J = 8.0, 2.5, 1.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.19 (dd, $J = 8.0, 7.7$ Hz, 1H, Ar-5-H), 7.34 (dd, $J = 2.5, 1.4$ Hz, 1H, Ar-2-H), 7.41 (ddd, $J = 7.7, 1.4, 1.0$ Hz, 1H, Ar-H) ppm.

4-(Metoksikarbonil)piperidinijev klorid (13b)



Spojino pripravimo po tipičnem postopku za sintezo metilnih estrov iz piperidin-4-karboksilne kisline. Dobimo bele kristale. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ 1.8 (m, 2H), 1.95 (m, 2H), 2.7 (m, 1H), 2.9 (m, 2H), 3.2 (m, 2H), 3.62 (s, 3H, Me-ester- CH_3), 9.28 (d, $J = 10.7$, 1H, NH), 9.42 (d, $J = 10.7$, 1H, NH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz): δ 24.26 (R- CH_3), 37.50 (R_2CH_2), 41.88 (R_3CH), 51.69 (R- CH_2 -N), 173.6 (R-COO) ppm.

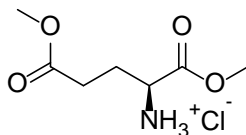
Dimetil L-asparaginijev klorid (13c)



Spojino pripravimo po tipičnem postopku za sintezo metilnih estrov iz asparaginske kisline. Dobimo bele kristale. $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ 3.01 (dd, $J = 17.1, 5.5$

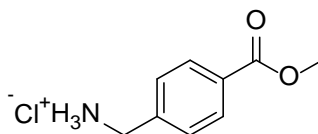
Hz, 1H Asp- β -CH), 3.07 (dd, $J = 17.01, 5.5$ Hz, 1H, Asp- β -CH), 3.64 (s, 3H, Me-ester-CH₃), 3.72 (s, 3H, Me-ester-CH₃), 4.31 (t, $J = 5.5$ Hz, 1H, Asp- α -CH), 8.86 (s, 3H, NH₃) ppm. ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 34.04, 48.47, 52.21, 53.08, 168.72, 169.66 ppm.

Dimetil L-glutaminijev klorid (13d)



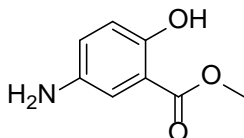
Spojino pripravimo po tipičnem postopku za sintezo metilnih estrov iz glutaminske kisline. Dobimo bele kristale. NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.07 (dd, $J = 14.5, 7.4$ Hz, 2H, Glu- γ -CH₂), 2.42 – 2.63 (m, 2H, Asp- β -CH₂), 3.58 (s, 3H, CH₃), 3.69 (s, 3H, CH₃), 4.00 (dd, $J = 6.7, 6.7$ Hz, 1H, Glu- α -CH), 8.85 (s, 3H, NH₃) ppm. ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 25.14, 28.98, 51.16, 51.62, 52.84, 169.53, 172.27 ppm.

(4-(Metoksikarbonil)fenil)metanaminijev klorid (13e)



Spojino pripravimo po tipičnem postopku za sintezo metilnih estrov. Dobimo bele kristale. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ =3.85 (s, 3H, Me-ester-CH₃), 4.07 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, Benzil-H), 4.11 (d, $J = 5.2$ Hz, 1H, benzil-H), 7.66 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, Ar-H), 7.96 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, Ar-H), 6.62 (s, 3H, NH₃) ppm

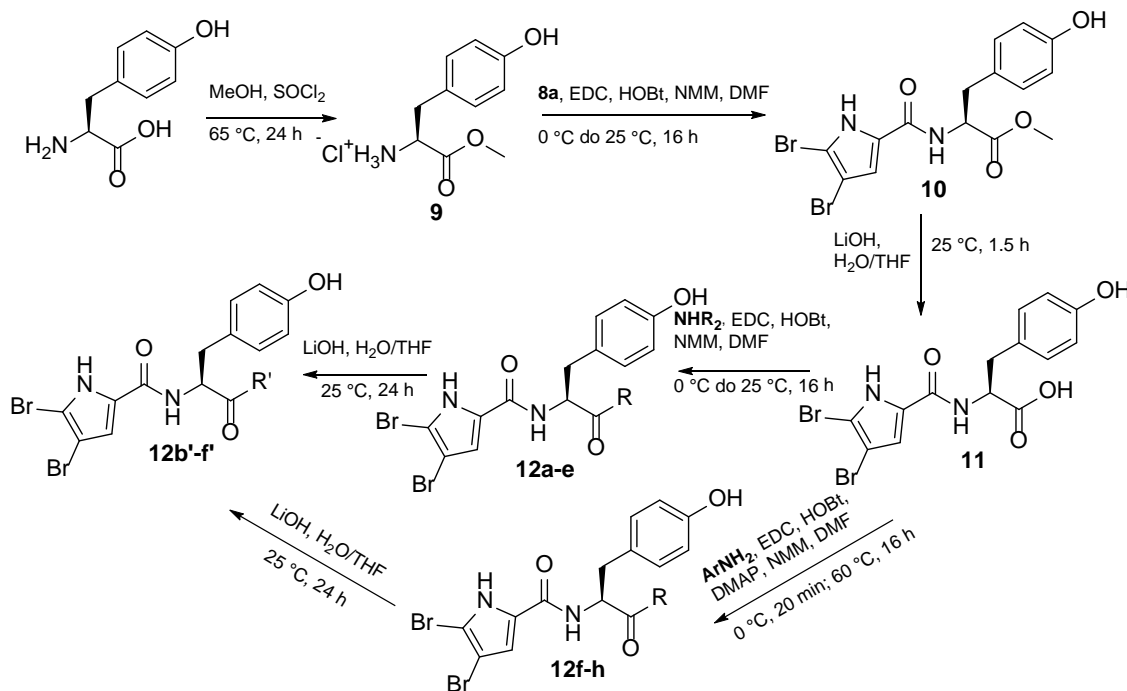
Metil 5-aminosalicilat (13f)



V suspenzijo 5-aminosalicilne kisline (3g, 19.6 mmol) v metanolu (40 mL), ohlajeno na 0°C, kapljamo SOCl₂ (1.6 mL, 1.1 eq) in pustimo mešati na sobni temperaturi čez noč. Ker reakcija ne poteče do konca, dodamo H₂SO₄ (5 mL) in raztopino refluktiramo 48 ur. Po odparitvi MeOH oborino spiramo z dietiletom, nato dodamo nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (100 mL) in ekstrahiramo v EtOAc (3x 50 mL). Združene organske faze spiramo

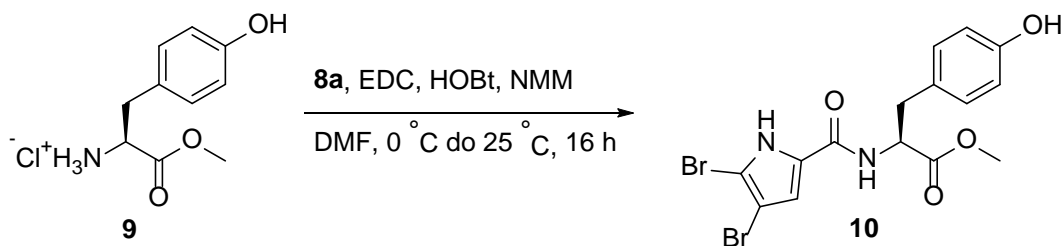
z nasičeno raztopino NaCl (100 mL), sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo, da dobimo bele kristale. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 3.69 (s, 1H, Me-ester-CH₃), 7.11 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, 6-H), 7.49 (dd, *J* = 8.9, 2.8 Hz, 1H, 6-H), 7.76 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, 2-H), 6.5 – 7.7 (bs, 2H, NH₂), 9.4 – 10.4 (bs, 1H, OH) ppm. ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 52.23 (CH₃), 112.12, 112.90, 117.65, 123.22, 141.20, 151.75, 169.82 (COOMe) ppm.

4.4 Sinteza druge serije spojin

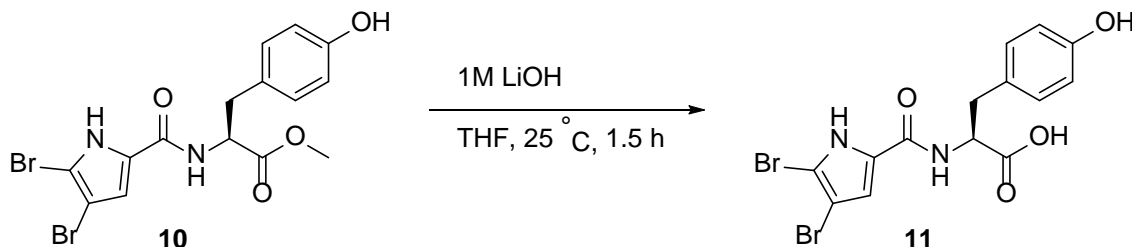


a: R=	b: R=	c: R=	d: R=
e: R=	f: R=	g: R=	h: R=
	b': R'=	c': R'=	d': R'=
e': R'=	f': R'=		

Slika 9: Sinteza druge serije spojin

Metil (4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karbonil)-*L*-tirozinat (10)

4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino (**8a**) (4 g, 14.9 mmol), **9** (3.79 g, 1.1 eq), HOBt (2.00 g, 1 eq) in NMM (5.6 mL, 4 eq) suspendiramo v DMF (100 mL), ohladimo ledeni kopeli in na koncu dodamo še EDC (3.13 g, 1.2 eq). Reakcijsko zmes pustimo, da se čez noč ob mešanju segreje na sobno temperaturo, nato uparimo DMF in dodamo EtOAc (200 mL). Spiramo z 10 % vodno raztopino citronske kisline (2x 100 mL), nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2x 100 mL) in nasičeno raztopino NaCl (100 mL). Organsko fazo nato sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo, da dobimo 5.20 g rjavkastih kristalov (79 %). Tališče: 94 – 100 °C. IR (ATR): ν 3272, 2952, 1724, 1316, 1557, 1512, 1435, 1209, 1173 cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.88 (dd, *J* = 13.9, 9.9 Hz, 1H, benzil-CH₂), 2.99 (dd, *J* = 13.9, 5.3 Hz, 1H, benzil-CH₂), 3.61 (s, 3H, Me-ester-CH₃), 4.51 (ddd, *J* = 9.9, 8.0, 5.4 Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.01 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, pirol-CH), 7.03 (d, *J* = 8.5, 2H, Fenol-3,5-H), 8.43 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, amid-NH), 9.21 (s, 1H, Tyr-OH), 12.68 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 35.67, 51.91, 54.04, 97.89, 105.13, 113.32, 115.02, 127.34, 127.41, 129.96, 155.93, 158.75, 172.22 ppm. MS (ESI): *m/z* 546.9 ([MH+2]⁺, 100), 444.9 ([MH]⁺, 40.4), 448.9 ([MH+4]⁺, 48.6). HRMS (ESI) za C₁₅H₁₅N₂O₄Br₂: izračunano, 444.9393; ugotovljeno, 444.9396. [α]_D = -49.1 (*c* 1.00, MeOH)

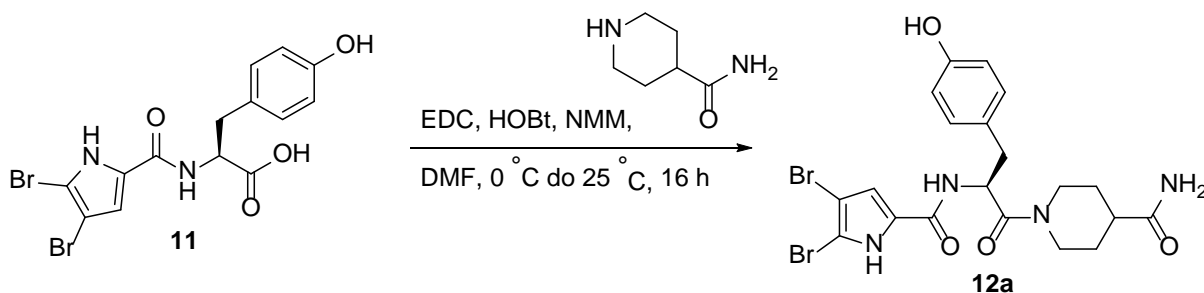
4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karbonil-*L*-tirozin (11)

LiOH (2.5 g, 5 eq) in H₂O (56 mL, da tvori 1M LiOH) dodamo k raztopini **10** (5.00 g, 11.6 mmol) v THF (100 mL). Nastalo raztopino močno mešamo na sobni temperaturi 1.5 h

(konec reakcije spremljamo s TLC), nato dodamo EtOAc (100 mL), spojino ekstrahiramo v 1M NaOH (2x 50 mL). Združeni vodni frakciji nakisamo do pH = 1, nato spojino ekstrahiramo v EtOAc (3x 100 mL). Združene organske faze spiramo z nasičeno raztopimo NaCl (100 mL), sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo. Po sušenju 2.5 h na vakuumski črpalki dobimo 4.60 g rjavkastih kristalov (95 %). Tališče: 113 – 117 °C. IR (ATR): ν 3174, 2924, 1716, 1612, 1557, 1413, 1212 cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.85 (dd, *J* = 13.8, 10.3 Hz, 1H, benzil-CH₂), 3.03 (dd, *J* = 13.8, 4.3 Hz, 1H, benzil-CH₂), 4.47 (ddd, *J* = 10.3, 8.3, 4.3 Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.02 (s, 1H, pirol-CH), 7.06 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, fenol-3,5-H), 8.3 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, amid-NH), 9.20 (s, 1H, fenol-OH), 12.67 (s, 1H, pirol-NH), 12.7 (bs, 1H, COO-H) ppm. ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 35.71, 53.96, 97.85, 104.90, 113.18, 114.99, 127.60, 127.93, 129.95, 155.85, 158.72, 173.25 ppm. MS (ESI) *m/z* = 432.9 ([MH+2]⁺, 100), 430.9 ([MH]⁺, 40.4), 434.9 ([MH+4]⁺, 48.6). HRMS (ESI) za C₁₄H₁₃N₂O₄Br₂: izračunano, 430.9237; ugotovljeno, 430.9240. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 30 % - 95 % MeOH v TFA (0.1 % v H₂O) v 15 min, nato 2.5 min pri 95 %; pretok: 1.0 mL/min; volumen injeciranja: 5 μ L; retencijski čas: 13.077 min (94.8 % pri 220 nm, 94.1 % pri 254 nm). [α]_D = -37.5 (*c* 1.00, MeOH)

4.4.1 Tipični postopek za sintezo derivatov alifatskih aminov 12a-e

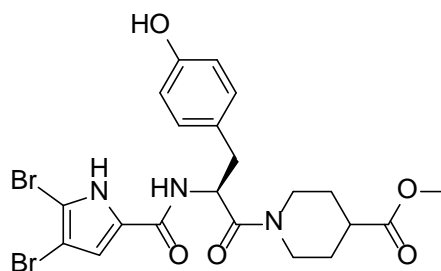
1-((4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karbonil)-*L*-tirozil)piperidin-4-karboksamid (12a)



Spojino **11** (150 mg, 0.347 mmol), izonipekotamid (49 mg, 1.1 eq), HOBt (47 mg, 1 eq), NMM (153 μ L, 4 eq) raztopimo v DMF (4 mL) in na ledeni kopeli dodamo še EDC (80 mg, 1.2 eq). Reakcijsko zmes mešamo čez noč, da se segreje na sobno temperaturo. Po odparitvi DMF dodamo EtOAc (10 mL) in spiramo z 10 % vodno raztopino citronske kisline (2x 10mL), ki jo nato speremo še z EtOAc (5 mL). Združene organske frakcije speremo z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2x 10 mL) in nasičeno vodno raztopino

NaCl (20 mL) ter sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄. Po filtraciji in odparitvi topila dobimo 185 mg surovega produkta oljnate konsistence. Surovi produkt čistimo s flash kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze DKM : MeOH = 9 : 1 (RF = 0.24), da dobimo 88 mg belih kristalov (47 %). Tališče: 168 – 172 °C. IR (ATR): ν 3186, 1609, 1544, 1511, 1447, 1378, 1213 cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-*d*₆): δ 1.21 – 1.44 (m, 2H), 1.54 – 1.72 (m, 2H), 2.21 – 2.32 (m, 1H), 2.70 – 2.90 (m, 3H), 2.98 – 3.09 (m, 1H), 3.88 – 3.98 (m, 1H), 4.20 – 4.37 (m, 1H), 4.91 – 4.99 (m, 1H, Tyr- α -CH, Tyr- α -CH'), 6.61 (d, J = 8.3 Hz, 2H, fenol-2,6-H, fenol-2,6-H'), 6.77 (s, 1H, amid-NH₂), 6.80 (s, 1H, amid-NH₂'), 7.04 (d, J = 8.3 Hz, 2H, fenol-3,5-H, fenol-3,5-H'), 7.07 (d, J = 2.7 Hz, 1H, pirol-CH, pirol-CH'), 7.23 (s, 1H, amid-NH₂), 7.24 (amid-NH₂'), 8.36 (d, J = 8.2 Hz, amid-NH), 8.43 (d, J = 8.2 Hz, amid-NH'), 9.16 (s, 1H, fenol-OH), 9.17 (s, 1H, fenol-OH'), 12.61 (d, J = 2.7 Hz, 1H, pirol-NH), 12.67 (d, J = 2.7 Hz, pirol-NH') ppm. MS (ESI): m/z 541.0 ([MH+2]⁺, 100), 539.0 ([MH]⁺, 51.4), 543.0 ([MH+4]⁺, 48.6). HRMS (ESI) za C₂₀H₂₁N₄O₄Br₂: izračunano, 538.9935; ugotovljeno, 538.9945. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 30 % - 95 % MeOH v TFA (0.1% v H₂O) v 15 min, nato 2.5 min pri 95 %; pretok: 1.0 mL/min; volumen injeciranja: 5 μ l; retencijski čas: 12.4 min (100 % pri 220 nm, 100 % pri 254 nm) [α]_D = -6.85 (*c* 1.00, DMF).

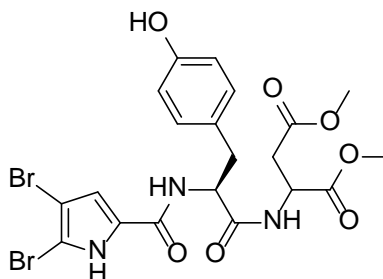
Metil 1-((4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karbonil)-*L*-tirozil)piperidin-4-karboksilat (12b)



Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za sintezo derivatov alifatskih aminov iz spojine **11** in spojine **13b** in jo očistimo z uporabo mobilne faze: DKM : MeOH = 40 : 1 (Rf = 0.36). IR (ATR): ν 3154, 2951, 1724, 1610, 1544, 1513, 1448, 1378, 1206, 1172, 1037 cm⁻¹. ¹H NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 0.95 – 1.1 (m, 1H), 1.20 – 1.50 (m, 2H), 1.65 – 1.85 (m, 2H), 2.65 – 2.96 (m, 4H), 3.02 – 3.13 (m, 1H), 3.58 (s, 3H, CH₃), 3.60 (s, 3H, CH₃'), 3.80 – 3.95 (m, 1H), 4.1 – 4.24 (m, 1H), 4.89 – 4.99 (m, 1H, Tyr- α -CH, Tyr- α -CH'), 6.61 (d, J = 8.4 Hz, 2H, fenol-2,6-OH, fenol-2,6-OH'), 7.03 (d, J = 8.4 Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.04 (d, J = 8.4 Hz, 2H, fenol-3,5-H'), 7.06 (d, J = 1.9 Hz, 1H, pirol-CH), 7.07 (d, J

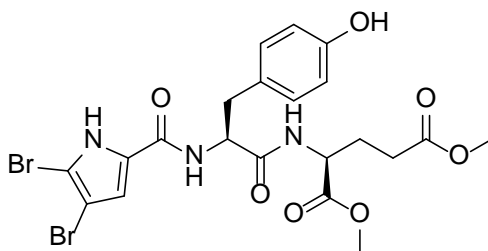
= 1.9 Hz, 1H, pirol-CH'), 8.40 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, amid-NH), 8.43 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, amid-NH'), 9.16 (s, 1H, fenol-OH), 9.17 (fenol-OH'), 12.63 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, pirol-NH), 12.66 (d, $J = 1.9$ Hz, 1H, pirol-NH') ppm. MS (ESI): m/z 556.0 ($[MH+2]^+$, 100), 554.0 ($[MH]^+$, 51.4), 558.0 ($[MH+4]^+$, 48.6). HRMS (ESI) za $C_{21}H_{22}N_3O_5Br_2$: izračunano, 553.9932; ugotovljeno, 553.9920. $[\alpha]_D = 0$ (c 1.00, DMF)

Dimetil-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksil)-*L*-tirozil-*L*-aspartat (12c)



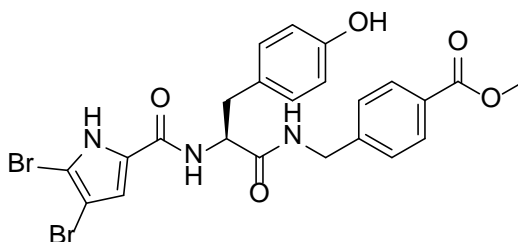
Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za sintezo derivatov alifatskih aminov iz spojine **11** in spojine **13c**. Čistimo z gradientno flash kromatografijo z uporabo mobilne faze DKM : MeOH = 40 : 1 \rightarrow 20 : 1, da dobimo rumenkaste kristale. Izkoristek: 75 %. Tališče: 98 – 101 °C. IR (ATR): ν 3279, 2952, 1732, 1629, 1543, 1504, 1436, 1372, 1217, 1172 cm^{-1} . 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2.72 (dd, $J = 16.4, 7.1$ Hz, 1H, Asp- β -CH $_2$), 2.73 (dd, $J = 13.8, 10.7$ Hz, 1H, benzil-CH $_2$), 2.83 (dd, $J = 16.4, 6.2$ Hz, 1H Asp- β -CH $_2$), 2.95 (dd, $J = 13.8, 3.8$ Hz, 1H, benzil-CH $_2$), 3.60 (s, 3H, Me-ester-CH $_3$), 3.61 (s, 3H, Me-ester-CH $_3$), 4.57 (ddd, $J = 10.7, 8.6, 3.8$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 4.66 (ddd, $J = 7.9, 6.2, 7.1$ Hz, 1H, Asp- α -CH), 6.61 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.01 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 8.20 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, Asp-NH-amid), 8.58 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, Tyr-NH-amid), 9.15 (s, 1H, fenol-OH), 12.62 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, pirol-NH) ppm. MS (ESI): m/z 574.0 ($[MH+2]^+$, 100), 572.0 ($[MH]^+$, 51.4), 576.0 ($[MH+4]^+$, 48.6). HRMS za $C_{20}H_{20}N_3O_7Br_2$: izračunano, 571.9673; ugotovljeno, 571.9662.

Dimetil-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksil)-*L*-tirozil-*L*-glutamat (12d)



Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za sintezo derivatov alifatskih aminov iz spojine **11** in spojine **13d**. Čistimo s flash kromatografijo z uporabo mobilne faze DKM : MeOH = 20 : 1, da dobimo rumenkaste kristale. Izkoristek: 80 % Tališče: 96 – 98 °C. IR (ATR): ν 3288, 2952, 1725, 1630, 1557, 1513, 1436, 1415, 1326, 1209, 1172, 973, 825, 756 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 1.82 (ddt, $J = 13.7, 9.2, 7.5$ Hz, 1H, Glu- β -CH $_2$), 1.98 (dtd, $J = 13.7, 7.5, 5.5$ Hz, 1H, Glu- β -CH $_2$), 2.30 (t, $J = 7.5$ Hz, 2H, Glu- γ -CH $_2$), 2.75 (dd, $J = 13.8, 10.4$ Hz, 1H, benzil-CH $_2$), 2.91 (dd, $J = 13.8, 4.5$ Hz, 1H, benzil-CH $_2$), 3.58 (s, 3H, Me-ester-CH $_3$), 3.62 (s, 3H, Me-ester-CH $_3$), 4.30 (ddd, $J = 9.2, 7.8, 5.5$ Hz, 1H, Glu- α -CH), 4.63 (ddd, $J = 10.4, 8.6, 4.5$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.61 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.03 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H pirol-CH), 7.08 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 8.19 (d, $J = 8.6$ Hz, 1H, Tyr-NH-amid), 8.54 (d, $J = 7.8$ Hz, Glu-NH-amid), 9.14 (s, 1H, fenol-OH), 12.63 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, pirol-NH). $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 26.14, 29.43, 36.99, 50.97, 51.40, 51.97, 54.30, 97.82, 104.66, 113.33, 114.82, 127.69, 127.95, 130.04, 155.76, 158.48, 171.62, 171.97, 172.56. MS (ESI): m/z 590.0 ([MH+2] $^+$, 100), 588.0 ([MH] $^+$, 51.4), 592.0 ([MH+4] $^+$, 48.6). HRMS (ESI) za C $_{21}$ H $_{24}$ N $_3$ O $_7$ Br $_2$: izračunano, 587.9976; ugotovljeno, 587.9976. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 30 % - 95 % MeOH v TFA (0.1 % v H $_2$ O) v 15 min, nato 2.5 min pri 95 %; pretok: 1.0 mL/min; volumen injeciranja: 5 μ l; retencijski čas: 12.8 min (92.0 % pri 220 nm, 91.9 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = -36.7$ (c 1.00, MeOH).

Metil-(S)-((2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)metil)benzoat (12e)



Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za sintezo alifatskih aminov iz spojine **11** in spojine **13e**. Čistimo z gradientno flash kromatografijo z uporabo mobilne faze DKM : MeOH = 40 : 1 \rightarrow 20 : 1, da dobimo bele kristale. Izkoristek: 45 %. Tališče: 135 °C. IR (ATR): ν 3282, 2950, 1702, 1613, 1557, 1513, 1434, 1415, 1281, 1224, 1178, 1107, 1019, 972, 832, 752, 705 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2.81 (dd, $J = 13.8, 9.9$ Hz, 1H, Tyr-benzil-CH $_2$), 2.98 (dd, $J = 13.8, 5.1$ Hz, 1H, Tyr-benzil-CH $_2$), 3.84 (s, 3H, Me-ester-

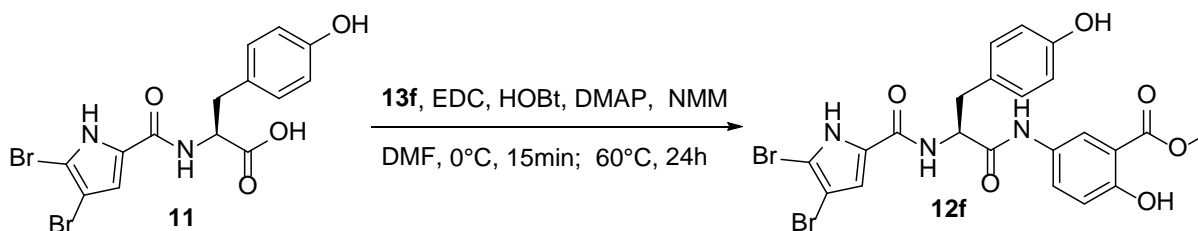
CH₃), 4.32 (dd, $J = 16.4, 6.1$ Hz, 1H, NH-benzil-CH₂), 4.38 (dd, $J = 16.4, 6.1$ Hz, 1H, NH-benzil-CH₂), 4.58 (ddd, $J = 9.9, 8.4, 5.1$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.63 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.04 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.29 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, benzoat-2,6-H), 7.88 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, benzoat-3,5-H), 8.27 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, amid-NH pri pirolu), 8.65 (t, $J = 6.1$ Hz, 1H, amid-NH pri aminometilbenzoatu), 9.19 (s, 1H, fenol-OH), 12.64 (d, $J = 2.6$ Hz, pirol-NH) ppm. ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 36.68, 41.86, 52.11, 54.91, 97.85, 104.711, 113.41, 114.93, 127.17, 127.76, 128.04, 128.11, 129.16, 130.09, 145.08, 155.81, 158.68, 166.12, 171.53 ppm. MS (ESI): m/z 578.0 ([MH+2]⁺, 100), 576.0 ([MH]⁺, 51.4), 580.0 ([MH+4]⁺, 48.6). HRMS (ESI) za C₂₃H₂₀N₃O₅Br₂: izračunano, 575.9775; ugotovljeno, 575.9770. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 30 % - 95 % MeOH v TFA (0.1 % v H₂O) v 15 min, nato 2.5 min pri 95 %; pretok: 1.0 mL/min; volumen injeciranja: 5 μ l; retencijski čas: 14.3 min (100 % pri 220 nm, 100 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = -8.96$ (c 1.00, MeOH)

4.4.2 Tipični postopek za sintezo derivatov aromatskih aminov 12f-h

Metil

(*S*)-5-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-(4-

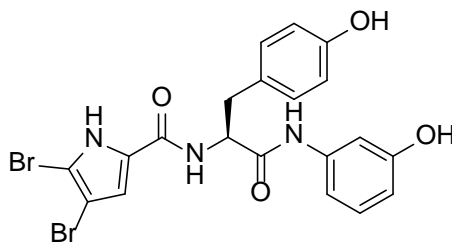
hidroksifenil)propanamido)-2-hidroksibenzoat (**12f**)



Spojino **11** (400 mg, 0.925 mmol), metil 5-aminosalicilat (**13f**) (207 mg, 1.1 eq), HOBt (63 mg, 0.5 eq), DMAP (57 mg, 0.5 eq) in NMM (407 μ L, 4 eq) raztopimo v DMF (10 mL) na ledeni kopeli in dodamo EDC (213 mg, 1.2 eq) ter mešamo 15 min pod Ar. Po 15 min reakcijsko zmes segrejemo na 60 °C. Po 24 h odparimo DMF, dodamo EtOAc (20 mL) in spiramo z 10 % vodno raztopino citronske kisline (2x 10 mL), nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2x 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (20 mL). Organsko fazo sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo, da dobimo 471 mg surovega produkta. Surovi produkt čistimo z gradientno flash kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze DKM : MeOH = 40 : 1 \rightarrow 20 : 1, da dobimo 150 mg produkta po odstranitvi topila iz čistih

frakcij. Nečiste frakcije prekrizaliziramo iz DKM/MeOH in dobimo še 137 mg rahlo rumenkastih kristalov. Skupaj: 287 mg (53 %). Tališče: 217 – 220 °C. IR (ATR): ν 3381, 3259, 3149, 1669, 1627, 1560, 1512, 1492, 1199, 1167, 1083, 973, 826, 793 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2.86 (dd, $J = 13.8, 9.8$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 2.99 (dd, $J = 13.8, 5.1$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 3.89 (s, 3H, Me-ester- CH_3), 4.63 (ddd, $J = 9.8, 8.2, 5.1$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.63 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Fenol-2,6-H), 6.95 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, anilin-5-H), 7.06 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.12 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, Fenol-3,5-H), 7.66 (dd, $J = 9.0, 2.7$ Hz, 1H, anilin-6-H), 8.09 (d, $J = 2.7$, 1H, anilin-2-H), 8.33 (d, $J = 8.2$, 1H, amid-NH), 9.18 (s, 1H, Ar-amid-NH), 10.13 (s, 1H, salicil-OH), 10.27 (s, 1H, Tyr-OH), 12.63 (d, $J = 2.8$, 1H, pirol-NH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 36.59, 52.52, 55.48, 97.86, 104.81, 112.47, 113.44, 114.89, 117.57, 120.45, 127.57, 127.61, 130.07, 130.72, 155.79, 156.03, 158.75, 168.92, 170.13 ppm. MS (ESI): m/z 580.0 ($[\text{MH}+2]^+$, 100), 578.0 ($[\text{MH}]^+$, 51.4), 582.0 ($[\text{MH}+4]^+$, 48.6). HRMS (ESI) za $\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_6\text{Br}_2$: izračunano, 577.9568; ugotovljeno, 577.9562. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 30% - 95% MeOH v H_2O v 15 min, nato 2.5 min pri 95%; pretok: 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 5 μL ; retencijski čas: 15.2 min (96.4 % pri 220 nm, 96.8 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = -3.82$ (c 1.00, DMF)

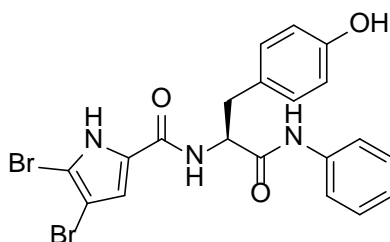
(S)-4,5-dibromo-N-(3-(4-hidroksifenil)-1-((3-hidroksifenil)amino)-1-oksopropan-2-il)-1H-pirol-2-karboksamid (12g)



Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za sintezo derivatov aromatskih aminov iz spojine **11** in 3-aminofenola. Surovo zmes po ekstrakciji raztopimo v MeOH in prefiltriramo rumeno nečistoto. Matičnico nato uparimo in čistimo s kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze: DKM : MeOH = 20 : 1, da dobimo Bele kristale (14 %). Tališče: 145 – 147 °C. $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2.84 (dd, $J = 13.8, 10.3$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 2.96 (dd, $J = 13.8, 4.6$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 4.69 (ddd, $J = 10.3, 8.4, 4.6$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.45 (ddd, $J = 8.0, 2.3, 0.9$ Hz, 1H, anilin-Ar-H), 6.63 (d, $J = 8.5, 2\text{H}$, fenol-2,6-H), 6.96 (ddd, $J = 8.0, 2.1, 0.9$ Hz, 1H, anilin-Ar-H), 7.06 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H,

pirol-CH), 7.07 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, 1H, anilin-5-H), 7.13 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.17 (dd, $J = 2.3, 2.1$ Hz, 1H, anilin-2-H), 8.33 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, amid-NH), 9.18 (s, 1H), 9.39 (s, 1H), 10.04 (s, 1H), 12.63 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, pirol-NH) ppm. ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 38.59, 57.20, 100.12, 106.47, 108.76, 112.50, 115.15, 116.29, 128.38, 128.95, 130.51, 131.44, 140.39, 157.33, 158.87, 161.29, 172.20 ppm. MS (ESI): $m/z = 521.9$ ($[\text{MH}+2]^+$, 100), 519.9 ($[\text{MH}]^+$, 51.4), 523.9 ($[\text{MH}+4]^+$, 48.6). HRMS (ESI) za $\text{C}_{20}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4\text{Br}_2$: izračunano, 519.9513; ugotovljeno, 519.9508. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 30 % - 95 % MeOH v TFA (0.1 % v H_2O) v 15 min, nato 2.5 min pri 95 %; pretok: 1.0 mL/min; volumen injeciranja: 5 μl ; retencijski čas: 13.1 min (95.2 % pri 220 nm, 95.9 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +6.00$ (c 1.00, MeOH)

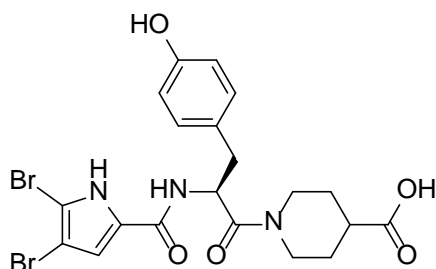
(S)-4,5-dibromo-N-(3-(4-hidroksifenil)-1-okso-1-(fenilamino)propan-2-il)-1H-pirol-2-karboksamid (12h)



Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za sintezo derivatov aromatskih aminov iz spojine **11** in anilina. Surovo zmes po ekstrakciji raztopimo v MeOH in prefiltriramo rumeno nečistoto. Matičnico nato uparimo in čistimo s kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze DKM : MeOH = 40 : 1, da dobimo rumenkaste kristale (14%). Tališče: 130 °C. IR (ATR): ν 3265, 1596, 1497, 1443, 1414, 1391, 1311, 1229, 1171, 751 cm^{-1} . ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2.86 (dd, $J = 13.8, 10.2$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 2.98 (dd, $J = 13.8, 4.5$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 4.71 (ddd, $J = 10.2, 8.2, 4.5$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.63 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.04 (ddd, $J = 7.4, 1.2, 1.2$ Hz, 1H, anilin-4-H), 7.06 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.13 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.30 (dd, $J = 8.6, 7.4$ Hz, 2H, anilin-3,5-H), 7.59 (dd, $J = 8.6, 1.2$ Hz, 2H, anilin-2,6-H), 8.35 (d, $J = 8.2$ Hz, amid-NH), 9.17 (s, 1H, fenol-OH), 10.16 (s, 1H, Ar-amid-NH), 12.63 (d, $J = 2.6$, 1H, pirol-NH) ppm. ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 29.02, 47.67, 90.56, 96.92, 105.60, 106.72, 112.12, 115.98, 118.82, 119.39, 120.23, 121.88, 129.74, 147.80, 151.76, 162.74 ppm. MS (ESI): m/z 506.0 ($[\text{MH}+2]^+$, 100), 504.0 ($[\text{MH}]^+$, 51.4), 508 ($[\text{MH}+4]^+$, 48.6). HRMS (ESI) za

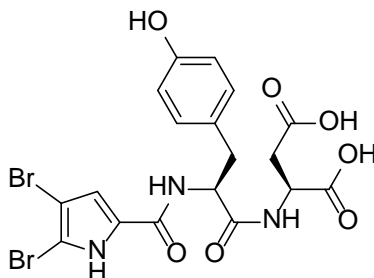
$C_{20}H_{16}N_3O_3Br_2$: izračunano, 503.9564; ugotovljeno, 503.9558. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 30 % - 95 % MeOH v TFA (0.1 % v H_2O) v 15 min, nato 2.5 min pri 95 %; pretok: 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 5 μ l; retencijski čas: 14.5 min (90.8 % pri 220 nm, 94.0 % pri 254 nm)

1-((4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karbonil)-*L*-tirozil)piperidin-4-karboksilna kislina (**12b'**)



Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za hidrolizo estrov do končnih spojin (poglavje 4.1.3) iz spojine **12b**. Po nakisanju iz 1M NaOH izpadejo beli kristali, ki jih nučamo in sušimo pri znižanem tlaku 1 uro. Tališče: 158 – 161 °C. IR (ATR): ν 3150, 2957, 1706, 1609, 1546, 1448, 1378, 1208, 1173 cm^{-1} . 1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 1.10 – 1.50 (m, 2H), 1.68 – 1.84 (m, 2H), 2.60 – 3.16 (m, 5H), 3.80 – 3.94 (m, 1H), 4.07 – 4.29 (m, 1H), 4.96 (m, 1H, Tyr- α -CH), 6.63 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.06 (m, 3H, fenol-3,5-H, pirol-CH), 8.41 (d, $J = 8.3$ Hz, amid-NH), 8.45 (d, $J = 8.3$ Hz, amid-NH'), 9.18 (s, 1H, fenol-OH), 9.19 (s, 1H, fenol-OH'), 12.25 (s, 1H, COOH), 12.65 (s, 1H, pirol-NH), 12.68 (s, 1H, pirol-NH') ppm. , MS (ESI): m/z 542.0 ([MH+2] $^+$, 100), 540.0 ([MH] $^+$, 51.4), 544.0 ([MH+4] $^+$, 48.6). HRMS (ESI) za $C_{20}H_{20}N_3O_5Br_2$: izračunano, 539.9775; ugotovljeno, 539.9764.

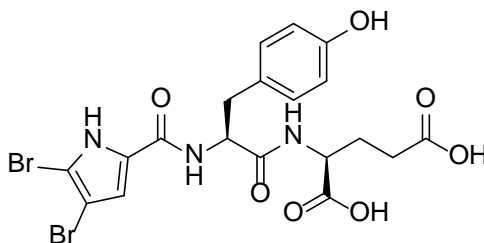
4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksil-*L*-tirozil-*L*-asparaginska kislina (**12c'**)



Spojino smo sintetizirali po tipičnem postopku za hidrolizo estrov do končnih spojin iz spojine **12c**. Po nakisanju 1M NaOH izpadejo beli kristali, ki jih nučamo in sušimo pri

znižanem tlaku 1 uro. Tališče: 230 – 233 °C. IR (ATR): ν 3404, 3288, 3066, 2969, 1718, 1690, 1674, 1625, 1542, 1505, 1279 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ 2.6 (dd, $J = 16.8, 6.9$ Hz, 1H, Asp- β - CH_2), 2.7 (m, 2H, Asp- β - CH_2 in benzil- CH_2), 2.98 (dd, $J = 14.0, 3.4$ Hz, benzil- CH_2), 4.6 (m, 2H, Tyr- α -CH in Asp- α -CH), 6.60 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-2,6-OH), 7.00 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 8.19 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, Glu-NH), 8.43 (d, $J = 8.0$ Hz, Tyr-NH), 9.14 (s, 1H, fenol-OH), 12.1 – 12.6 (bs, 2H, COOH), 12.61 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, pirol-NH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 100 MHz): δ 38.08, 38.31, 51.32, 56.42, 100.10, 106.49, 115.04, 116.33, 128.52, 129.51, 131.48, 157.29, 161.38, 173.43, 175.41, 175.50 ppm. MS (ESI): m/z 545.9 ($[\text{MH}+2]^+$, 100), 543.9 ($[\text{MH}]^+$, 51.4), 547.9 ($[\text{MH}+4]^+$, 48.6). HRMS (ESI) za $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_7\text{Br}_2$: izračunano, 543.9360; ugotovljeno, 543.9343. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 30 % - 95 % MeOH v TFA (0.1 % v H_2O) v 15 min, nato 2.5 min pri 95 %; pretok: 1.0 mL/min; volumen injeciranja: 5 μl ; retencijski čas: 11.5 min in 11.841 min (diastereomera: 84.4 % in 13.9 % pri 220 nm, 83.8 % in 14.3 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = -40.9$ (c 1.00, MeOH)

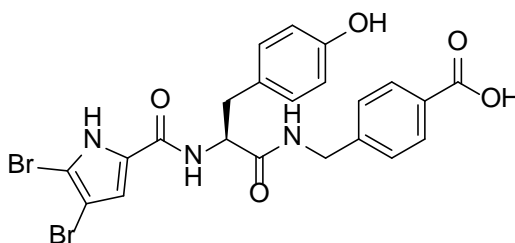
4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksil-L-tirozil-L-glutaminska kislina (12d')



Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za hidrolizo estrov do končnih spojin iz spojine **12d**. Po nakisanju 1M NaOH izpadejo beli kristali, ki jih nučamo in sušimo pri znižanem tlaku 1 uro. Tališče: 132 – 135 °C. IR (ATR): ν 3420, 3356, 3295, 3105, 2962, 1725, 1660, 1555, 1515, 1609, 1224, 1167, 1113, 984, 896, 814 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$, 400 MHz): δ 1.77 (dtd, $J = 13.9, 7.6, 8.1$ Hz, 1H, Glu- β - CH_2), 1.97 (dtd, J 13.9, 7.6, 5.2 Hz, 1H, Glu- β - CH_2), 2.23 (t, $J = 7.6$ Hz, 2H, Glu- γ -CH), 2.74 (dd, $J = 13.8, 10.8$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 2.92 (dd, $J = 13.8, 4.2$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 4.24 (ddd, $J = 8.7, 8.1, 5.2$ Hz, 1H, Glu- α -CH), 4.65 (ddd, 10.8, 8.0, 4.2 Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.60 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.02 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 8.17 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, Glu-NH), 8.4 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, Tyr-NH), 9.14 (s, 1H, fenol-OH), 12.0-12.6 (bs, 2H, COOH), 12.62 (d, $J = 2.6$ Hz, pirol-NH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ ($\text{DMSO-}d_6$,

100 MHz): δ 26.48, 29.89, 37.09, 51.08, 54.33, 97.79, 104.61, 113.28, 114.81, 127.73, 128.10, 130.06, 155.71, 158.45, 171.53, 173.13, 173.69 ppm. MS (ESI): m/z 559.9 ([MH+2]⁺, 100), 558.0 ([MH]⁺, 51.4), 561.9 ([MH+4]⁺, 48.6). HRMS (ESI) za C₁₉H₁₈N₃O₇Br₂: izračunano, 557.9517; ugotovljeno, 557.9500. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 30 % - 95 % MeOH v TFA (0.1 % v H₂O) v 15 min, nato 2.5 min pri 95 %; pretok: 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 5 μ l; retencijski čas: 12.1 min (97.5 % pri 220 nm, 97.6 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = -27.6$ (c 1.00, MeOH)

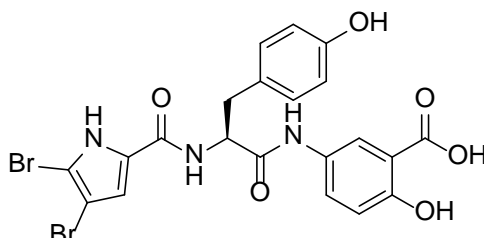
(S)-((2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)metil)benzojska kislina (12e')



Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za hidrolizo estrov do končnih spojin iz spojine **12e**. Po nakisanju 1M NaOH izpadejo beli kristali, ki jih nučamo in sušimo pri znižanem tlaku 1 uro. Tališče: 232 – 235 °C. IR (ATR): ν 3293, 3115, 2947, 1700, 1626, 1590, 1553, 1513, 1449, 1405, 1382, 1243, 1172, 751 cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.82 (dd, $J = 13.7, 10.1$ Hz, 1H, Tyr-benzil-CH₂), 2.99 (dd, $J = 13.7, 5.2$ Hz, 1H, benzil-CH₂), 4.33 (dd, $J = 16.1, 5.9$ Hz, 1H, NH-benzil-CH₂), 4.38 (dd, $J = 16.1, 5.9$ Hz, 1H, NH-benzil-CH₂), 4.6 (ddd, $J = 10.1, 8.2, 5.2$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.64 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.05 (s, 1H, pirol-CH), 7.09 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.27 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, benzoat-2,6-H), 7.87 (d, $J = 8.3$ Hz, benzoat-2,6-H), 8.28 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, amid-NH pri pirolu), 8.65 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, amid-NH pri aminometilbenzoatu), 9.20 (s, 1H, fenol-OH), 12.66 (s, 1H, pirol-NH), 12.9 (bs, 1H, COOH) ppm. ¹³C-NMR (DMSO-*d*₆, 100 MHz): δ 36.70, 41.88, 54.91, 97.87, 104.72, 113.41, 114.97, 127.00, 127.76, 128.11, 129.17, 129.30, 130.08, 144.55, 155.81, 158.67, 167.20, 171.49 ppm. MS (ESI): m/z 564.0 ([MH+2]⁺, 100), 562.0 ([MH]⁺, 51.4), 566.0 ([MH+4]⁺, 48.6). HRMS (ESI) za C₂₂H₁₈N₃O₅Br₂: izračunano, 561.9619; ugotovljeno, 561.9613. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (4.6 mm x 150 mm); mobilna faza: 30 % - 95 % MeOH v TFA (0.1 % v H₂O) v 15 min, nato 2.5 min pri 95 %; pretok: 1.0 mL/min; volumen injiciranja:

5 μ l; retencijski čas: 13.6 min (99.4 % pri 220 nm, 98.1 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = -8.28$ (c 1.00, MeOH)

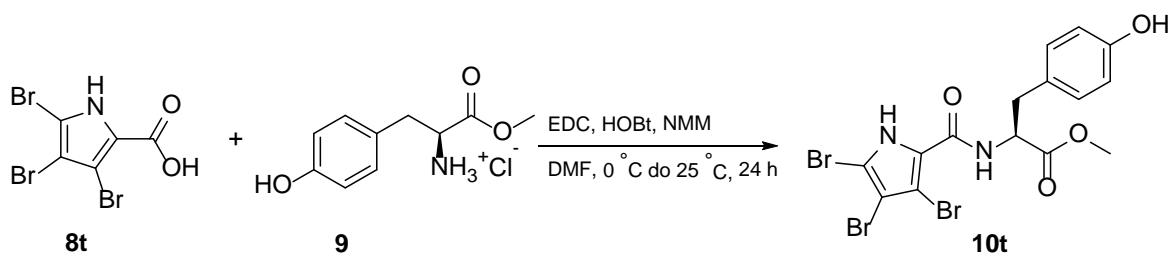
(S)-5-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)-2-hidroksibenzojska kislina (12f')



Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za hidrolizo estrov do končnih spojin iz spojine **12f**. Po nakisanju 1M NaOH izpadejo rdečerjavi kristali, ki jih nučamo in sušimo pri znižanem tlaku 1 uro. Tališče: 246 – 250 °C. IR (ATR): ν 3173, 3122, 3073, 2957, 1662, 1595, 1550, 1450, 1284, 1226, 1172, 834, 673 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2.87 (dd, $J = 13.8, 9.9$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 3.00 (dd, $J = 13.8, 4.8$ Hz, 1H, benzil- CH_2), 4.65 (ddd, $J = 9.9, 8.2, 4.8$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.64 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, Fenol-2,6-H), 6.93 (d, $J = 9.0$ Hz, 1H, anilin-5-H), 7.07 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.13 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, Fenol-3,5-H), 7.68 (dd, $J = 9.0, 2.7$ Hz, 1H, anilin-6-H), 8.09 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, anilin-2-H), 8.35 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, amid-NH), 9.19 (s, 1H, Ar-amid NH), 10.13 (s, 1H, Tyr-OH), 11.0 (bs, 1H, salicil-OH), 12.64 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, pirol-NH), 14.0 (bs, 1H, COOH) ppm. $^{13}\text{C-NMR}$ (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 36.65, 55.51, 97.88, 104.82, 112.43, 113.47, 114.92, 117.22, 120.76, 127.65, 127.65, 130.11, 130.58, 155.82, 157.18, 158.77, 170.15, 171.68 ppm. MS (ESI): m/z 565.9 ($[\text{MH}+2]^-$, 100), 563.9 ($[\text{MH}]^-$, 51.4), 567.9 ($[\text{MH}+4]^-$, 48.6), $[\text{M-H}]^-$. HRMS (ESI) za $\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_6\text{Br}_2$: izračunano, 563.9411; ugotovljeno, 563.9406. $[\alpha]_D = +12.9$ (c 1.00, MeOH)

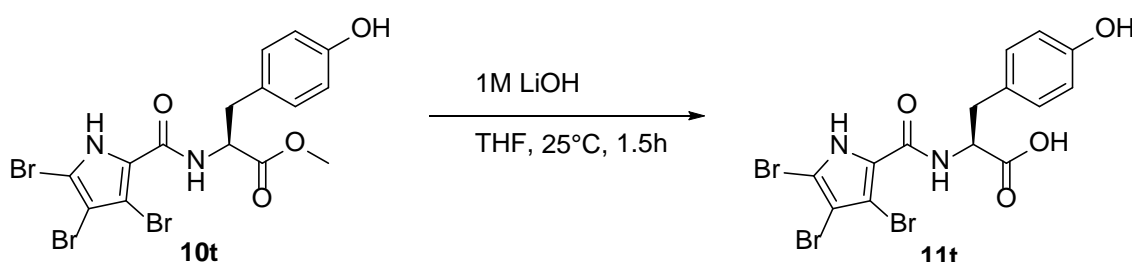
4.4.3 Sinteza derivatov tribromopirola

Metil (3,4,5-tribromo-1*H*-pirol-2-karbonil)-*L*-tirozinat (10t)



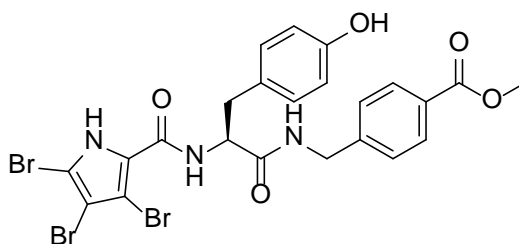
4,5,6-Tribromopirrol-2-karboksilno kislino (**8t**) (4 g, 14.9 mmol), **9** (3.79 g, 1.1 eq), HOBt (2.00 g, 1 eq) in NMM (5.6 mL, 4 eq) suspendiramo v DMF (100 mL) na ledeni kopeli in na koncu dodamo še EDC (3.13 g, 1.2 eq). Pustimo, da se reakcijska zmes čez noč ob mešanju segreje na sobno temperaturo. Po uparitvi DMF, raztopimo suhi preostanek v EtOAc (200 mL) in dobljeno raztopino spiramo z 10 % vodno raztopino citronske kisline (2x 100 mL), nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (2x 100 mL), nasičeno raztopino NaCl (100 mL) in sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄. Po filtracijo in odparitvi topila dobimo 5.20 g surovega produkta, ki ga brez čiščenja uporabimo v naslednji stopnji sinteze.

(3,4,5-Tribromo-1*H*-pirrol-2-karbonil)-*L*-tirozin (11t**)**



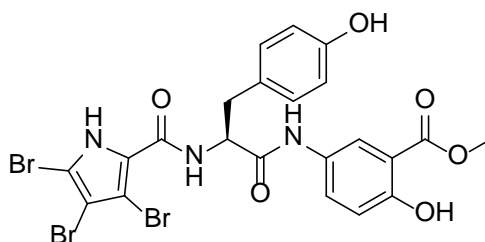
Spojino **10t** (5.00 g, 11.6 mmol) raztopimo v THF (100mL) in dodamo LiOH (2.5 g, 5 eq) in H₂O (56 mL, da tvori 1M LiOH) ter močno mešamo na sobni temperaturi 1.5 h (konec reakcije spremljamo s TLC). Po končani reakciji dodamo EtOAc (100 mL) in spojino ekstrahiramo v 1M NaOH (2x 50 mL). Združeni vodni frakciji nakisamo do pH = 1 in spojino ekstrahiramo v EtOAc (3x 100 mL). Združene organske faze spiramo z nasičeno raztopino NaCl, sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo. Produkt sušimo 2.5 h na vakuumski črpalki, da dobimo 4.60 g surovega produkta, ki ga kot takega uporabimo v nadaljnjih reakcijah.

Metil (S)-4-((3-(4-hidroksifenil)-2-(3,4,5-tribromo-1*H*-pirrol-2-karboksamido)propanamido)metil)benzoat (12et**)**



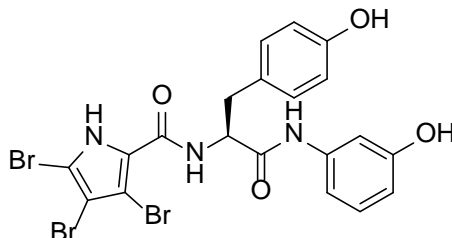
Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za sintezo derivatov alifatskih amidov (poglavje 4.4.1). Produkt očistimo s prekristalizacijo iz MeOH, da dobimo bele kristale (16 %). Tališče: 235 – 240 °C. IR (ATR): 3403, 3279, 3158, 1699, 1659, 1638, 1612, 1498, 1432, 1289, 1246 cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.87 (dd, *J* = 13.3, 7.7 Hz, 1H, Tyr-benzil-CH₂), 3.00 (dd, *J* = 13.7, 5.1 Hz, 1H, Tyr-benzil-CH₂), 3.84 (s, 3H, Me-ester-CH₃), 4.31 (dd, *J* = 16.5, 4.7 Hz, 1H, NH-benzil-CH₂), 4.41 (dd, *J* = 16.5, 4.7 Hz, 1H, NH-benzil-CH₂), 4.68 (ddd, *J* = 7.7, 7.6, 5.1 Hz, 1H, Tyr-α-CH), 6.64 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, Ar-H), 7.00 (d, *J* = 7.7 Hz, 2H, Ar-H), 7.28 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, Ar-H), 7.59 (d, *J* = 7.6 Hz, 1H, pirol-CO-NH), 7.89 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, Ar-H), 8.75 (t, *J* = 4.7 Hz, 1H, Tyr-CO-NH), 9.23 (s, 1H, fenol-OH), 13.19 (s, 1H, pirol-NH) ppm. MS (ESI): *m/z* 657.8 ([MH+2]⁺, 100), 655.8 ([MH]⁺, 68), 659.8 ([MH+4]⁺, 67). [α]_D = -4.77 (*c* 1.00, DMF).

Metil (S)-2-hidroksi-5-(3-(d-hidroksifenil)-2-(3,4,5-tribromo-1H-pirol-2-karboksamido)propanamido)benzoat (12ft)



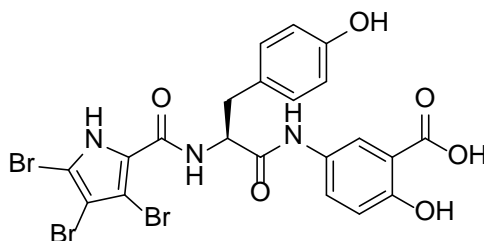
Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za sintezo derivatov aromatskih aminov (poglavje 4.4.2). Produkt čistimo s prekristalizacijo iz MeOH, da dobimo bele kristale (21 %). Tališče: 281 °C. IR (ATR): ν 3455, 3405, 3254, 3156, 1668, 1637, 1541, 1488, 1438, 1242, 1210 cm⁻¹. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.91 (dd, *J* = 13.8, 8.1 Hz, 1H, benzil-H), 3.05 (dd, *J* = 13.8, 5.0 Hz, 1H, benzil-H), 3.89 (s, 3H, Me-ester-CH₃), 4.74 (ddd, *J* = 8.1, 7.5, 5.0 Hz, 1H, kiralni-H), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenol-2,6-H), 6.96 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, anilin 5-H), 7.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.62 (dd, *J* = 8.9, 2.7 Hz, 1H, anilin 6-H), 7.64 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, amid-NH), 8.09 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, anilin 2-H), 9.23 (s, 1H, Ar-amid-NH), 10.19 (s, 1H, salicil-OH), 10.21 (s, 1H, Tyr-OH), 13.21 (s, 1H, pirol-NH). MS (ESI): *m/z* 657.8 ([MH+2]⁻, 100), 659.8 ([MH+4]⁻, 97), 655.8 ([MH]⁻, 34), 661.8 ([MH+6]⁻, 32). [α]_D = -3.82 (*c* 1.00, DMF).

(S)-3,4,5-tribromo-N-(3-(4-hidroksifenil)-1-((3-hidroksifenil)amino)-1-oksopropan-2-il)-1H-pirol-2-karboksamid (12gt)



Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za sintezo derivatov aromatskih aminov. Surovi produkt čiščimo z gradientno flash kolonsko kromatografijo z uporabo mobilne faze: DKM : MeOH = 40 : 1 → 20 : 1. Produkt nato prekrizaliziramo iz MeOH, da dobimo bele kristale (7.6 %). Tališče: 224 – 226 °C. IR (ATR): ν 3404, 3286, 3171, 1665, 1599, 1495, 1438, 1199 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2.90 (dd, $J = 13.9, 8.3$ Hz, 1H, benzil-H), 3.05 (dd, $J = 13.9, 5.3$ Hz, 1H, benzil-H), 4.79 (ddd, $J = 8.3, 7.7, 5.3$ Hz, 1H, Tyr- α -CH), 6.47 (ddd, $J = 8.1, 2.1, 0.9$ Hz, 1H, Ar-H), 6.65 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 6.94 (ddd, $J = 8.1, 2.1, 0.9$ Hz, 1H, Ar-H), 7.04 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.09 (dd, $J = 8.1, 8.1$ Hz, 1H, anilin 5-H), 7.16 (t, $J = 2.11$ Hz, 1H, anilin 2-H), 7.65 (d, $J = 7.7$ Hz, 1H, amid-NH), 9.23 (s, 1H, fenol-OH), 9.43 (s, 1H, fenol-OH), 10.10 (s, 1H, Ar-amid-NH), 13.2 (s, 1H, pirol-NH) ppm. MS (ESI): m/z 599.7 ($[\text{MH}+2]^+$, 100), 601.7 ($[\text{MH}+4]^+$, 97), 597.7 ($[\text{MH}]^-$, 34), 603.7 ($[\text{MH}+6]^+$, 32). $[\alpha]_D = +4.11$ (c 1.00, MeOH).

(S)-2-hidroksi-5-(3-(4-hidroksifenil)-2-(3,4,5-tribromo-1H-pirol-2-karboksamido)propanamido)benzojska kislina (12f't)

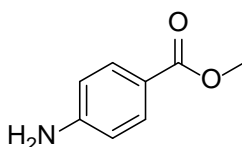


Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za hidrolizo estrov do končnih spojin iz spojine **12ft**. Po nakisanju iz vode izpadejo rožnati kristali. Tališče: 194 – 195 °C. IR (ATR): ν 3195, 1664, 1611, 1547, 1511, 1491, 1428, 1378, 1201, 1172, 1080 cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$

NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 2.86-2.97 (m, 1H, benzil-CH₂), 3.01-3.11 (m, 1H, benzil-CH₂), 4.68-4.79 (m, 1H, Tyr- α -CH), 6.64 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 6.93 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, salicil-3 ali -4-H), 7.03 (d, $J = 7.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-OH), 7.63 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, salicil-3 ali -4-H), 7.66 (s, 1H), 8.07 (s, 1H), 9.23 (s, 1H), 10.17 (s, 1H), 10.68-11.46 (bs, 1H, salicil-OH), 13.21 (s, 1H, pirol-NH), 13.45-14.50 (bs, 1H, COOH) ppm. MS (ESI) $m/z = 643.9$ ([MH+2]⁺, 100), 645.9 ([MH+4]⁺, 97.3), 641.9 ([MH]⁺, 34.3), 647.9 ([MH+6]⁺, 31.5). HRMS (ESI) za C₂₁H₁₅N₃O₆Br₃: izračunano, 641.8516; ugotovljeno, 641.8511. $[\alpha]_D = +5.70$ (c 1.00, MeOH).

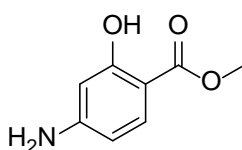
4.4.4 Sinteza intermediatov, ki niso vodili do končnih spojin

Metil 4-aminobenzoat (FCT 48)



Spojino sintetiziramo po tipičnem postopku za sintezo metilnih estrov (poglavje 4.3.1) iz 4-aminobenzojske kisline. Na koncu kristale nevtraliziramo z nasičeno raztopino NaHCO₃, ekstrahiramo v DKM in uparimo topilo, da dobimo rjavkaste kristale. ¹H-NMR (CDCl₃, 400MHz): δ 3.83 (s, 3H, CH₃), 4.0 (s, 2H, NH₂), 6.66 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, Ar-H), 7.87 (d, $J = 8.7$ Hz, 2H, Ar-H) ppm.

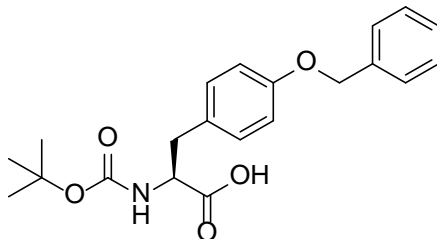
Metil 4-aminosalicilat (FCT 99)



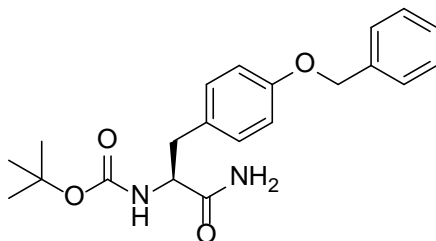
V suspenzijo 4-aminosalicilne kisline (3.00g, 19.6 mmol) v metanolu (40 mL), ohlajeno na 0°C, kapljamo SOCl₂ (1.6 mL, 1.1 eq) in pustimo mešati na sobni temperaturi. Po 24 h dodamo H₂SO₄ (5 mL) in refluktiramo 48 h. Nato odparimo MeOH, spiramo z dietiletrom, dodamo nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ (100 mL) in spojino ekstrahiramo v EtOAc (3x 50 mL). Združene organske faze spiramo z nasičeno raztopino NaCl (100 mL), sušimo nad Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo, da dobimo bele kristale. ¹H-NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 3.78 (s, 3H, CH₃), 6.03 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, salicil-3-H), 6.13 (s, 2H, NH₂), 6.13 (dd, $J = 8.7, 2.2$ Hz, 1H, salicil-5-H), 7.46 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, salicil-6-H), 10.80 (s,

1H, OH) ppm. ^{13}C -NMR (DMSO- d_6 , 100 MHz): δ 51.52, 98.61, 99.63, 106.66, 131.09, 156.05, 162.93, 169.98 ppm

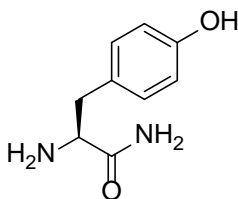
***N*-Boc-*O*-benzil-*L*-tirozin (FCT 107-1)**



V raztopino (*S*)-3-(4-hidroksifenil)-1-metoksi-1-oksopropan-2-aminijevega klorida (**9**) (5.00 g, 21.6 mmol) in trietilamina (6.0 mL, 2 eq) v diklorometanu (60 mL) pri 0°C, po kapljicah dodamo raztopino Boc₂O (5.18 g, 1.1 eq) v DKM (10 mL). Po 24 h dodamo še 80 mL DKM in raztopino spiramo z 10 % vodno raztopino citronske kisline (2x 50 mL), nasičeno vodno raztopino NaCl (20 mL), sušimo nad Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo, da dobimo oljnato tekočino. 2 g te tekočine raztopimo v acetonu (10 mL) ter dodamo K₂CO₃ (1.04 g, 1.1 eq), benzilbromid (0.92 mL, 1.15 eq) in konico spatule NaI. Mešamo najprej 24 h na sobni temperaturi in nato še 4 h na refluxu. Uparimo aceton in dodamo EtOAc (30 mL). Spiramo z 1M NaOH (2x 10 mL), uparimo topilo in dodamo 96% etanol (30 mL) ter 35 % vodno raztopino NH₃ (2 mL) in mešamo šez noč, da se porabi prebitni benzilbromid. Dodamo EtOAc (30 mL) in spiramo z 1M HCl (3x 20 mL). Topilo uparimo ter dodamo THF (10 mL) in 1M LiOH (10 mL). Mešamo 1 h, nato dodamo 1M NaOH (20 mL) in spiramo z EtOAc (2x 20 mL). Vodno fazo previdno nakisamo do pH = 1 in ekstrahiramo z EtOAc (3x 15 mL). Združene organske frakcije spiramo z nasičeno vodno raztopino NaCl (20 mL), sušimo nad Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo, da dobimo prozoren produkt steklaste konsistence. ^1H -NMR (DMSO- d_6 , 400 MHz): δ 1.33 (s, 9H, Boc-CH₃), 2.76 (dd, $J = 13.8, 10.2$ Hz, 1H, Tyr-benzil-CH₂), 2.94 (dd, $J = 13.8, 4.5$ Hz, 1H, Tyr-benzil-CH₂), 4.00-4.07 (m, 1H, Tyr- α -CH), 5.07 (s, 2H, O-benzil-CH₂), 6.92 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.08 (t, $J = 8.6$ Hz, 1H, O-CH₂-Ph-4-H), 7.17 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.25-7.45 (m, 5H), 12.5 (bs, 1H, COOH) ppm.

***N*-Boc-*O*-benzil-*L*-tirozinamid (FCT 109)**

V raztopino **FCT 107-1** (760 mg, 2.05 mmol) in sveže predestiliranega Et₃N (285 μL, 1eq) v brezvodnem THF (30 mL), ohlajenem na -10°C v argonovi atmosferi dodamo izobutilkloroformat (291 μL, 1.1 eq) in mešamo 1 h. V raztopino nato 1 h uvajamo NH₃ (reakcijo spremljamo s TLC). Delno uparimo THF in dodamo EtOAc (30 mL), ki ga spiramo z vodo (3x 20 mL), z nasičeno vodno raztopino NaCl (20 mL), sušimo nad Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo, da dobimo belo steklasto snov. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400MHz): δ 1.30 (s, 9H, BOC-CH₃), 2.66 (dd, *J* = 13.8, 10.1 Hz, 1H, Tyr-benzil-CH₂), 2.87 (dd, *J* = 13.8, 4.5 Hz, 1H, Tyr-benzil-CH₂), 4.02 (ddd, *J* = 10.1, 8.4, 4.5 Hz, 1H, Tyr-α-CH), 5.05 (s, 2H, O-benzil-CH₂), 6.90 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.16 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.25-7.44 (m, 8H) ppm.

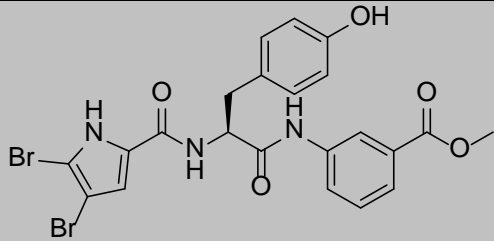
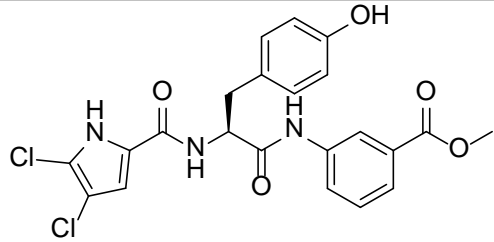
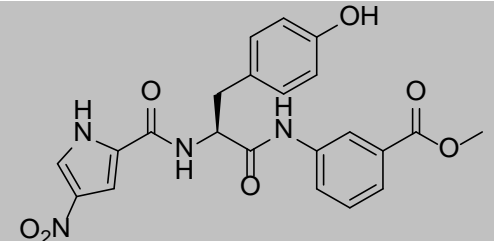
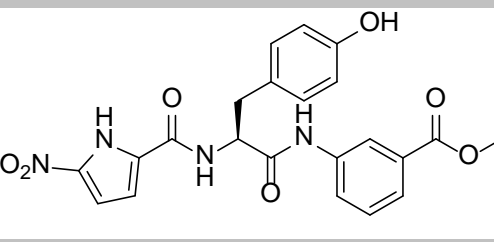
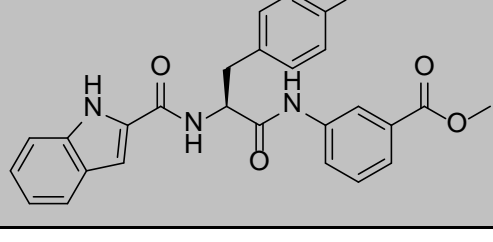
***L*-tirozinamid (FCT 110)**

(*S*)-3-(4-hidroksifenil)-1-metoksi-1-oksopropan-2-aminijev klorid (**9**) (3.0 g, 15.4 mmol) raztopimo v CH₃CN (30 mL), prepriamo z NH₃ do nasičenja in mešamo 24 ur na sobni temperaturi. Izpadajo beli kristali (1.8 g, 65%), ki jih odfiltriramo. ¹H-NMR (DMSO-*d*₆, 400 MHz): δ 2.90 (dd, *J* = 14.2, 7.0 Hz, 1H, benzil-CH₂), 2.98 (dd, *J* = 14.2, 6.5 Hz, 1H, benzil-CH₂), 3.85 (dd, *J* = 7.0, 6.5 Hz, 1H, Tyr-α-CH), 6.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, fenol-2,6-H), 7.06 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenol-3,5-H), 7.48 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, CONH₂), 7.97 (d, *J* = 1.7 Hz, 1H, CONH₂), 8.13 (s, 2H, NH₂), 9.45 (s, 1H, OH) ppm.

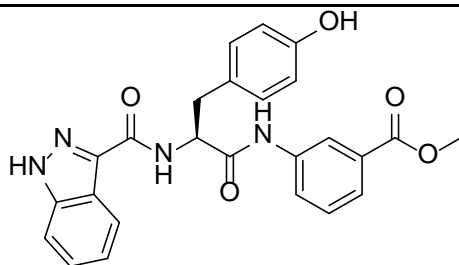
5 Rezultati bioloških testiranj

V preglednici III so zbrani rezultati bioloških testiranj, ki so dostopni do oddaje magistrske naloge.

Preglednica III: Rezultati bioloških testiranj

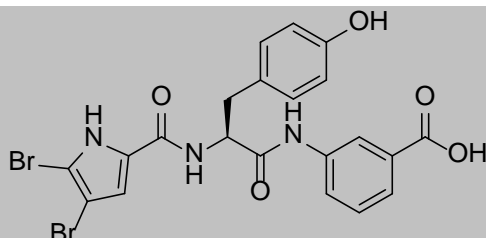
oznaka	struktura	<i>E. Coli</i> Giraza B	protibakterijska testiranja
4a		Supercoiling: $IC_{50} = 40,1 \mu\text{M}$ SPR: $K_d = 45,7 \mu\text{M}$	<i>E. coli</i> : neaktivna <i>S. aureus</i> : $MIC_{90} = 14 \mu\text{g/mL}$ <i>E. faecalis</i> : $MIC_{90} = 14 \mu\text{g/mL}$ <i>E. coli</i> tolC: $MIC > 256 \mu\text{g/mL}$ <i>E. coli</i> impA: $MIC > 256 \mu\text{g/mL}$
4b			<i>E. coli</i> tolC: $MIC = 32 \mu\text{g/mL}$ <i>E. coli</i> impA: $MIC = 16 \mu\text{g/mL}$
4c		neaktivna	
4d		neaktivna	
4e		neaktivna	

4f



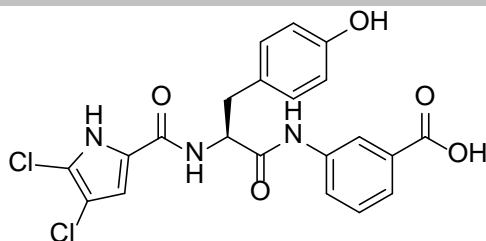
neaktivna

5a

 $IC_{50} = 16,1 \mu M$

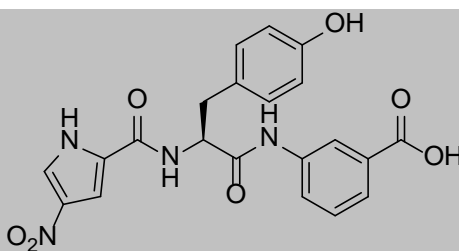
E. coli:
neaktivna
S. aureus:
neaktivna
E. faecalis:
neaktivna
E. coli tolC:
MIC > 256 $\mu g/mL$
E. coli impA:
MIC > 256 $\mu g/mL$

5b

 $IC_{50} = 23,6 \mu M$

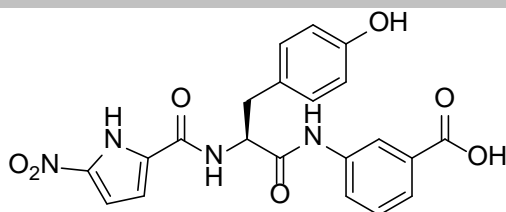
E. coli:
neaktivna
S. aureus:
MIC = 14 $\mu g/mL$
E. faecalis:
MIC = 14 $\mu g/mL$

5c



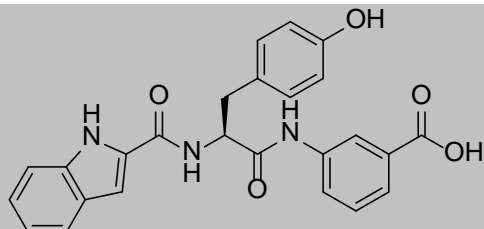
neaktivna

5d



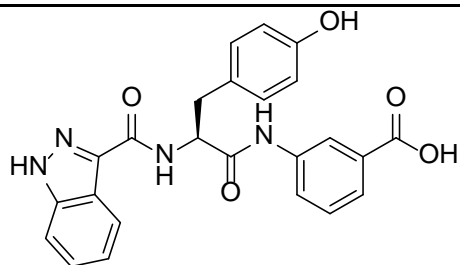
neaktivna

5e



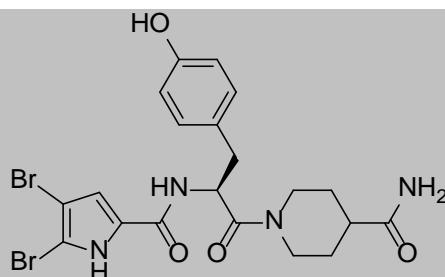
neaktivna

5f

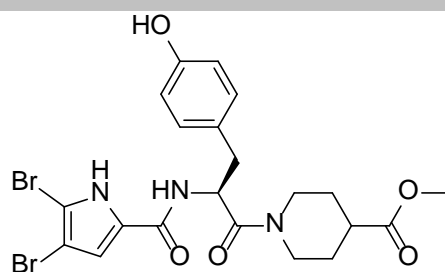


neaktivna

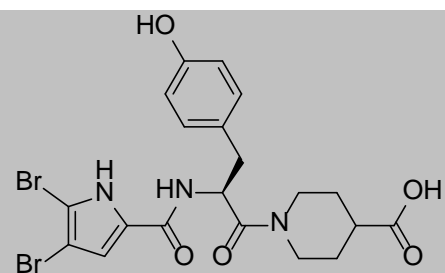
12a

 $IC_{50} \sim 50 \mu M$

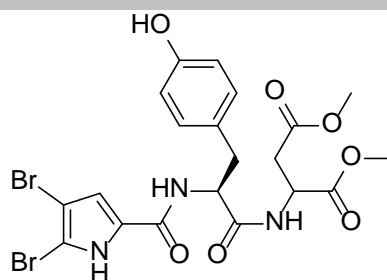
12b

 $IC_{50} = 197 \mu M$

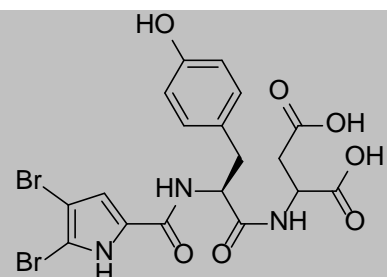
12b'

 $IC_{50} > 50 \mu M$

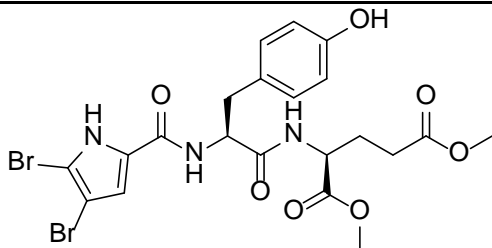
12c

 $IC_{50} \sim 50 \mu M$

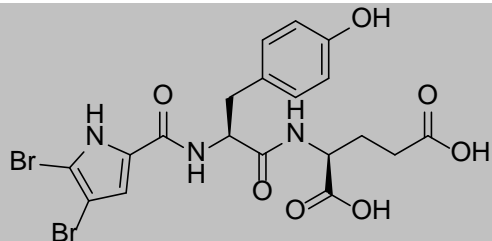
12c'

 $IC_{50} = 205 \mu M$

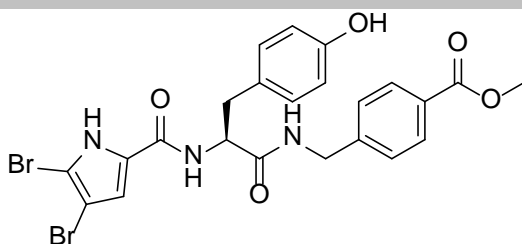
12d

 $IC_{50} > 50 \mu M$

12d'

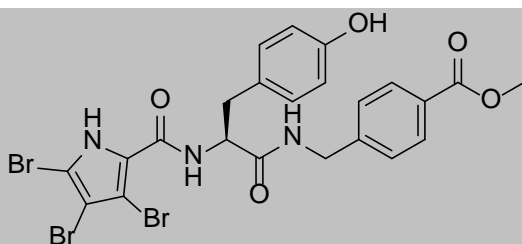
 $IC_{50} > 50 \mu M$

12e

 $IC_{50} = 0,97 \mu M$

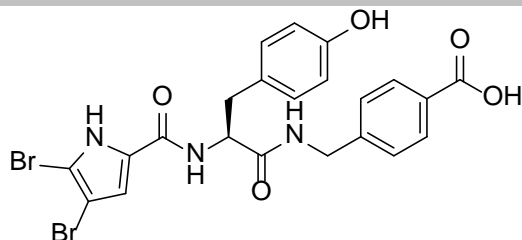
E. coli tolC:
MIC = 16 $\mu g/mL$
E. coli impA:
MIC = 256
 $\mu g/mL$

12et

 $IC_{50} = 162 \mu M$

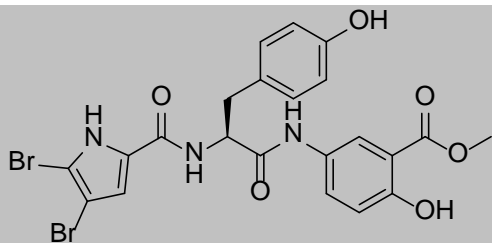
E. coli tolC:
MIC = 2 $\mu g/mL$
E. coli impA:
MIC > 256
 $\mu g/mL$

12e'

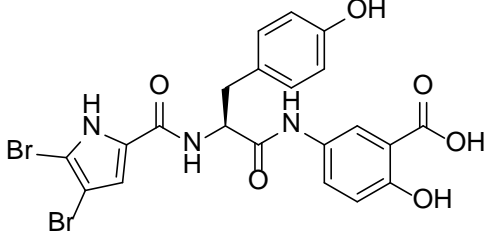
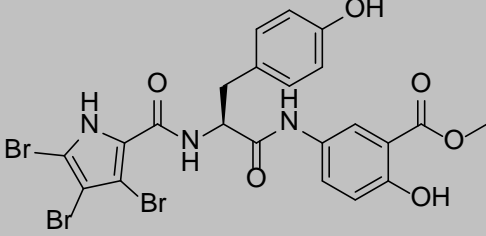
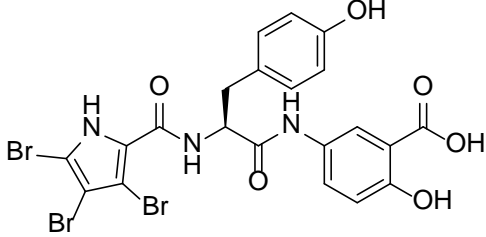
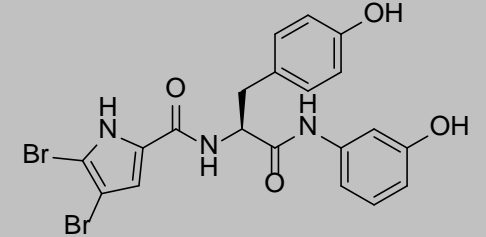
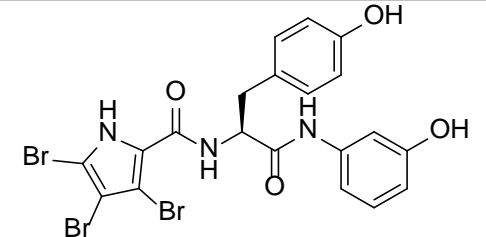
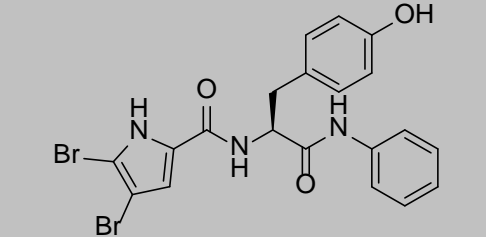
 $IC_{50} = 0,619 \mu M$

E. coli tolC:
MIC > 256
 $\mu g/mL$
E. coli impA:
MIC > 256
 $\mu g/mL$

12f

 $IC_{50} = 30,1 \mu M$

E. coli tolC:
MIC = 32 $\mu g/mL$
E. coli impA:
MIC = 32 $\mu g/mL$

12f'		$IC_{50} = 10,3 \mu M$	<i>E. coli</i> tolC: MIC > 256 $\mu g/mL$ <i>E. coli</i> impA: MIC > 256 $\mu g/mL$
12ft		$IC_{50} > 100 \mu M$	<i>E. coli</i> tolC: MIC > 256 $\mu g/mL$ <i>E. coli</i> impA: MIC > 256 $\mu g/mL$
12f't		$IC_{50} = 4,98 \mu M$	<i>E. coli</i> tolC: MIC > 256 $\mu g/mL$ <i>E. coli</i> impA: MIC > 256 $\mu g/mL$
12g		$IC_{50} = 13,3 \mu M$	<i>E. coli</i> tolC: MIC = 16 $\mu g/mL$ <i>E. coli</i> impA: MIC = 32 $\mu g/mL$
12gt		$IC_{50} = 10,8 \mu M$	<i>E. coli</i> tolC: MIC = 8 $\mu g/mL$ <i>E. coli</i> impA: MIC = 4 $\mu g/mL$
12h		$IC_{50} = 1,95 \mu M$	

6 Razprava

6.1 Kemijski del

6.1.1 Prva serija spojin

Za sintezo prve serije spojin (slika 8) smo najprej tvorili amidno vez z reakcijo med Boc-L-Tyr in metil 3-aminobenzoatom (**13a**) in po odstranitvi zaščitne skupine pripravili intermediat **3**. Vzporedno smo po v literaturi dostopnih postopkih pripravili substituirane 2-trikloroacetil-1*H*-pirole **7a-d** ki smo jih uporabili v reakciji z intermediatom **3**. Ker je $-CCl_3$ dobra izstopajoča skupina, se lahko spojine s trikloroacetilno funkcionalno skupino uporablja za tvorbo amidne vezi. Ta tip reakcije je potekal učinkovito pri sintezi derivatov **4a, c in d**, kjer smo kot trikloroacetilne reagente uporabili 4,5-dibromopirolni (**7a**) ter 4- in 5-nitropirolni derivat (**7cd**). Pri sintezi derivatov z nitropirolom (**4c in 4d**) smo izhajali iz zmesi 4- in 5- nitro-2-trikloroacetil-1*H*-pirola v razmerju 3.3: 1 (nitriranje trikloroacetilpirola poteče preferenčno na mesto 4) ter šele po končani reakciji ločili obe končni spojini ter se tako izognili dodatni ločbi **7c in 7d** s kolonsko kromatografijo. Ko smo skušali na enak način pripraviti tudi derivat s 4,5-dikloropirolo (**4b**), nismo bili uspešni. Postopek smo poskušali optimizirati tako, da smo spremenili topilo (CH_3CN namesto DMF) in bazo (Et_3N namesto $NaCO_3$), poleg tega smo reakcijo nastavili tudi v mikrovalovnem reaktorju, vendar pri nobenem od uporabljenih pogojev nismo dobili želene spojine v zadostni količini. 4,5-dikloro-2-trikloroacetil-1*H*-pirol (**7b**) smo zato hidrolizirali do karboksilne kisline **8b**, ki smo jo nato v reakciji z intermediatom **3** in z uporabo EDC in HOBt pretvorili v spojino **4b**. Na enak način smo pripravili tudi derivata **4e in 4f** iz komercialno dostopnih indol-2-karboksilne kisline in indazol-3-karboksilne kisline. Da bi se izognili racemizaciji L-tirozina, do katere bi lahko prišlo pri uporabi ostrejših pogojev (npr. NaOH), smo za hidrolizo estrov **4a-e** do želenih karboksilnih kislin **5a-f** uporabili šibkejšo bazo (LiOH v zmesi H_2O in THF).

Vse derivate z nitropirolom (**4c,d in 5c,d**) smo skušali tudi reducirati do aminopirolov tako, da smo raztopino/suspenzijo derivata nitropirola in Pd/C v etanolu, očetni kislini ali zmesi metanola in dimetilformamida prepihavali z vodikom, vendar želene spojine nismo uspeli izolirati. Glede na TLC smo vselej dobili množico produktov, ki jih nismo uspeli očistiti niti s kolonsko kromatografijo, niti s kristalizacijami. V literaturi je opisana sinteza metil 5-aminopiroلكarboksilata iz ustrezne nitro spojine. (37) Ta spojina bi bila po zaščiti

amino skupine in hidrolizi estra uporabna za sintezo derivatov naših spojin z aminopirolnim fragmentom na mestu A.

6.1.2 Druga serija spojin

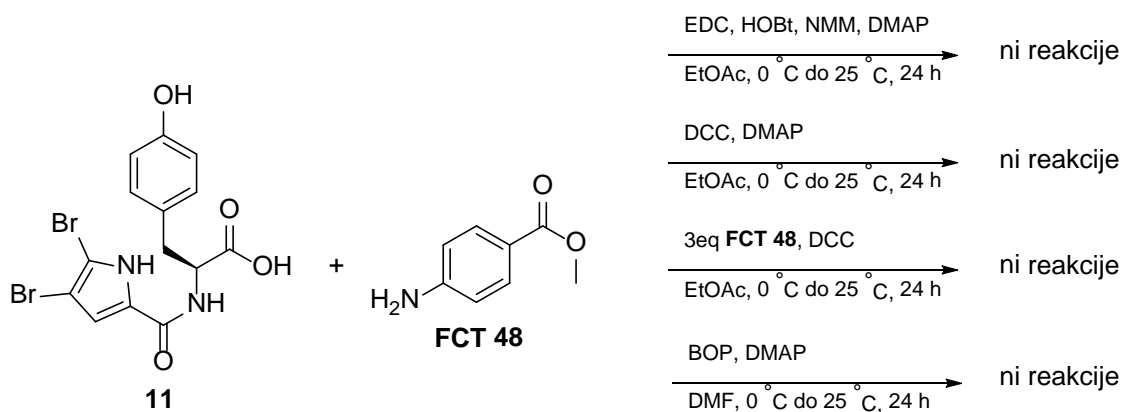
Za sintezo druge serije spojin (slika 9) smo, da bi se izognili zaščiti in odščiti tirozinske karboksilne funkcionalne skupine, intermediat **11** najprej skušali pripraviti iz L-tirozina in 2-trikloroacetil-4,5-dibromo-1*H*-pirola (**7a**). Reakcijo smo nastavili v mikrovalovnem reaktorju (20 min, 90 °C, 20 W) v DMF in z Na₂CO₃ kot bazo. Ker reakcija ni bila uspešna, smo poizkusili s kapljanjem raztopine **7a** v DMF v raztopino tirozina in Na₂CO₃ v DMF pri 45 °C in pustili čez noč na 45 °C. Tudi ta postopek se ni obnesel, zato smo pripravili metilni ester L-tirozina in ga v reakciji s 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino (**8a**) ter z uporabo EDC in HOBt (tudi pri metilnem estru zgoraj opisana reakcija preko **7a** ni bila uspešna) pretvorili v spojino **10**. Po odščiti karboksilne skupine smo nato dobili intermediat **11**, ki smo ga uporabili pri reakcijah z amini.

V primeru sinteze aminokislinskih derivatov **12c** in **12d** je reakcija tvorbe amidne vezi med kislino **11** in estroma aminokislin z uporabo EDC in HOBt potekla skoraj izključno do želenega produkta. To je pričakovano, saj je bil ta reagent razvit za peptidno kemijo. Večjih težav s sintezo ni bilo tudi pri ostalih derivatih alifatskih aminov (**12a**, **12b** in **12e**), ki pa, razen **12e**, ki vsebuje aromatski obroč, niso bili biološko aktivni.

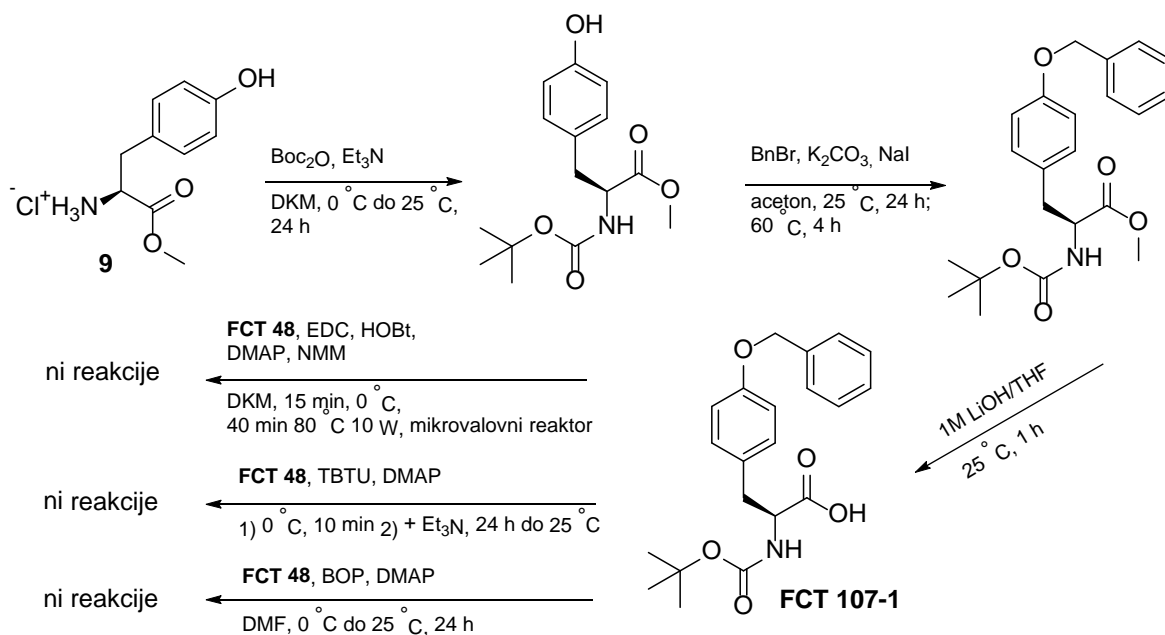
6.1.2.1 Tvorba amidne vezi z aromatskimi amini

Optimizacije reakcije med spojino **11** in aromatskimi amini smo se lotili na derivatu *p*-aminobenzojske kisline, ki ima strukturo, najbolj podobno spojini vodnici iz prve serije (**4a**) (slika 8). Nekoliko presenetljivo reakcija med spojino **11** in metil 4-aminobenzoatom (**FCT 48**) z uporabo EDC in HOBt skoraj ni potekla, niti ko smo dodali pomožni nukleofil dimetilaminopiridin (DMAP). Najprej smo poskušali z uporabo različnih sklopitvenih reagentov: BOP reagent, DCC/DMAP brez dodane baze (sumili smo, da se fenolni OH ali pirolni NH deprotonirata in postaneta bolj nukleofilna od anilinskega NH in tako motita reakcijo), nato smo reakcijo izvedli še s trikratnim prebitkom metil *p*-aminobenzojske kisline brez baze in DMAP. Nastavili smo reakcijo med Boc-L-Tyr (**1**) in metil 4-aminobenzoatom na 60 °C z uporabo EDC, HOBt in DMAP, ki ni bila uspešna (slika 10). Z uporabo različnih aktivacijskih reagentov (slika 11) smo, prav tako neuspešno, skušali spojiti tudi Boc-*O*-benzil-Tyr (**FCT 107-1**) in metil 4-aminobenzoat. Poleg tega smo

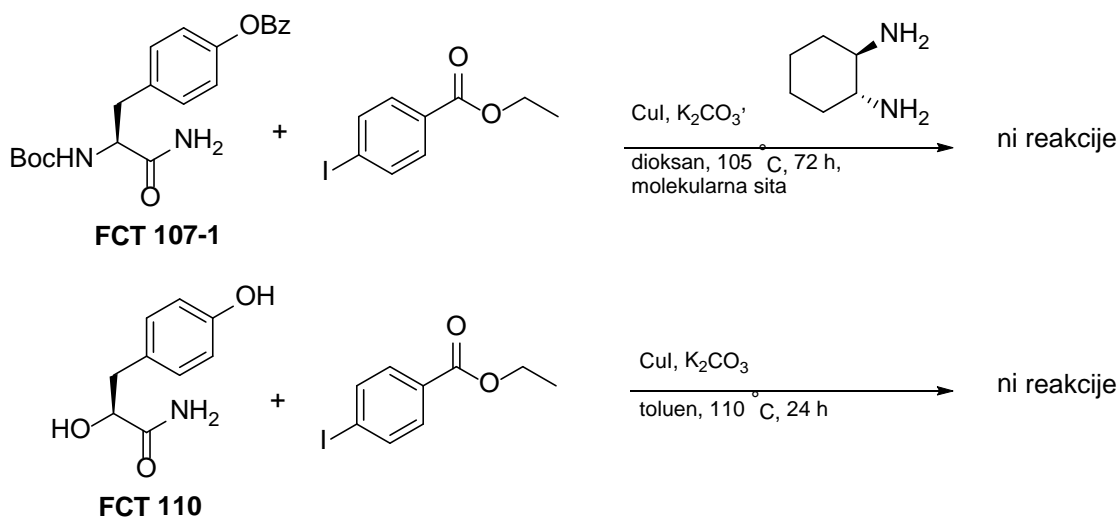
amidno vez poizkusili tvoriti tudi z aromatsko substitucijo s pomočjo CuI (iz etil 4-jodobenzoata in tirozinamida (**FCT 110**) (38) ali Boc-*O*-benzil-tirozinamida (**FCT 109**) (39)), ki je glede na TLC potekala le v manjši meri, tako da želenega produkta nismo uspeli izolirati.



Slika 10: Neuspešni poskusi tvorbe amidne vezi z različnimi aktivacijskimi reagenti



Slika 11: Neuspešni poskusi tvorbe amidne vezi z različnimi aktivacijskimi reagenti

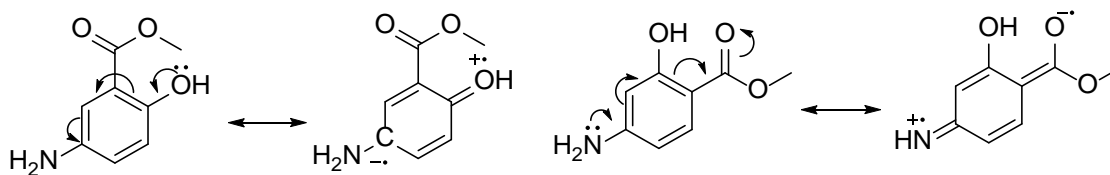


Slika 12: Neuspešni poskusi tvorbe amidne vezi z aromatsko substitucijo

Vsi poskusi tvorbe amidne vezi med derivati tirozina in metil 4-amino benzoata so bili neuspešni, zato menimo, da tvorba amidne vezi s slabo nukleofilnimi amini predstavlja odprt problem, ki se ga tudi v strokovnih krogih pogosto zapostavlja in se mu posveča premalo pozornosti (40, 41).

Zaradi neuspešne sinteze derivata *p*-aminobenzojske kisline smo postavili delovno hipotezo, da so aromatski amini z elektronprivlačno skupino na orto ali para mestu preslabo nukleofilni za tvorbo amidnih vezi z derivati aminokislin; sklapljanje z metil *m*-aminobenzoatom nam je zato uspelo, s para derivatom pa smo imeli težave. Lotili smo se torej načrtovanega derivata z elektrondonorsko skupino na aromatskem obroču (**12g**). Tudi tukaj smo najprej poizkusili z različnimi aktivacijskimi reagenti: EDC in HOBt na ledu in v mikrovalovnem reaktorju, TBTU, difenilfosforil azid (DPPA). Naposled nam je uspelo, sicer v nizkem izkoristku, po opisanem postopku (poglavje 4.4.2) z uporabo EDC, HOBt in DMAP ter segrevanjem na 65 °C. Segrevanje je ključno, da se preseže aktivacijsko energijo za nukleofilni napad (še vedno slabo nukleofilnega) aromatskega amina na aktivirano karboksilno skupino. Po enakem postopku smo uspeli pripraviti tudi derivat anilina (**12h**) in derivat 5-aminosalicilne kisline (**12f**), ki je potrdil hipotezo o vplivu funkcionalnih skupin na uspešnost reakcije s tirozinom: vzporedno smo nastavili reakciji intermediata **11** z metil 4-aminosalicilatam in metil 5-aminosalicilatam. Reakcija s 5-aminosalicilatam je potekla boljše kot s 4-hidroksianilinom (elektronprivlačna karbonilna skupina je na meta mestu glede na NH₂ in nima resonančnega vpliva nanjo, elektrondonorska hidroksilna skupina pa je na para mestu glede na NH₂ in z resonančnim

efektom povečuje njeno nukleofilnost (slika 13)), pri reakciji s 4-aminosalicilatom (**FCT 99**) pa glede na TLC nismo dobili željenega produkta.



Slika 13: Vpliv substituentov na nukleofilnost anilina

Zanimiva neizčrpana možnost tvorbe amidne vezi iz slabo nukleofilnih aminov in estrov je tudi z uporabo trimetilaluminija (AlMe_3) (42) ali na zraku stabilnega kompleksa $(\text{AlMe}_3)_2 \cdot \text{DABCO}$ (41), kjer s tvorbo intermediata – kovinskega amida – povečamo nukleofilnost dušika.

6.2 Biološka testiranja

Rezultati bioloških testiranj (preglednica III) nam dajejo vpogled v odnos med strukturo in delovanjem našega strukturnega tipa inhibitorjev GyrB, čeprav do oddaje magistrske naloge še niso na voljo vsi rezultati, ki bi dali celostno sliko. S prvo serijo spojin smo ugotovili, da je za inhibitorno delovanje na GyrB najprimernejša dibromo substitucija na pirolu (spojini **4a** in **5a** imata IC_{50} vrednost 40.1 μM ozr. 16.1 μM), aktiven pa je tudi dikloro derivat (**5b** ima IC_{50} vrednost 23.6 μM). Že tu smo opazili, da so hidrolizirani derivati na mestu B (slika 4) za faktor 2 boljši inhibitorji GyrB od metilnih estrov, nimajo pa protibakterijskega delovanja. Razlog je verjetno v tem, da so derivati benzojske kisline prekisli ($\text{pK}_a \sim 4$) in so pri fiziološkem pH pretežno nabiti ter tako ne morejo prehajati v bakterije. Najboljša spojina prve serije (**4a**) izkazuje delovanje le proti grampozitivnim bakterijam (MIC_{90} za *S. aureus* in *E. faecalis* je 14 $\mu\text{g/mL}$), ne pa tudi proti gramnegativni *E. coli*. Spojina ne deluje niti proti sevom z izbitim genom za efluks črpalko (tolC) in povečano permeabilnostjo membrane (impA), iz česar lahko sklepamo, da razlog za neaktivnost ni v črpanju spojine iz bakterijske celice ali slabem prehajanju vanjo. Za to spojino smo specifično vezavo v ATP vezavno mesto potrdili tudi s površinsko plazmotsko resonanco ($K_d = 45.7 \mu\text{M}$).

V drugi seriji (poglavje 4.4), kjer smo spreminjali aminobenzoatni del spojine, smo ugotovili, da aromatski obroč na mestu B igra pomembno vlogo pri interakciji z aktivnim mestom, derivati alifatskih aminov namreč izkazujejo za vsaj en velikostni razred slabšo

inhibicijo GyrB ($IC_{50} \sim 200 \mu\text{M}$) od derivatov aromatskih aminov. Različni derivati anilina (**12f,g,h** in **12f',g',h'**) imajo podobno aktivnost na GyrB kot derivata 3-aminobenzojske kisline (**4a** in **5a**) iz prve serije (IC_{50} med 2 in 30 μM), derivat 4-aminometilbenzojske kisline (**12e'**), pri katerem je molekula podaljšana za eno CH_2 skupino pa izkazuje boljšo inhibicijo GyrB ($IC_{50} = 619 \text{ nM}$). S spojinami druge serije smo potrdili, da je za protibakterijsko delovanje nujna odsotnost COOH skupine (MIC_{90} za *E. coli tolC* in *E. coli impA* so med 16 in 256 $\mu\text{g/mL}$) in da je razlog za neaktivnost spojin proti nemutiranim sevom *E. coli* verjetno v slabem prehajanju zunanje membrane ali črpanju spojin iz bakterij z efluks črpalko. Rezultatov testiranj na grampozitivne bakterije za drugo serijo spojin sicer še ni na voljo, a lahko na podlagi dosedanjih rezultatov domnevamo, da bodo spojine aktivne tudi nanje.

Pri derivatu 4,5,6-tribromo-1*H*-pirola **12et** je ohranjena dobra zaviralna aktivnost na GyrB ($IC_{50} = 10.8 \mu\text{M}$) s hkratnim protibakterijskim delovanjem (MIC_{90} proti *E. coli tolC* in *E. coli impA* sta 8 $\mu\text{g/mL}$ oziroma 4 $\mu\text{g/mL}$). To je uporaben podatek za razvoj spojin z bolj selektivno toksičnostjo, ki jo lahko dosežemo z večanjem fragmenta, ki se veže v adenoziški žep (glej poglavje 1.3.1).

7 Sklep

Načrtovali in sintetizirali smo serijo inhibitorjev giraze B, ki temelji na strukturi oroidina, pirol-imidazolnega alkaloida, ki je bil izoliran iz alg rodu *Agelas*. Od skupno 29 pripravljenih spojin jih 7 izkazuje obetavno protibakterijsko aktivnost proti grampozitivnim bakterijam (spojina **4a** ima MIC₉₀ za *S. aureus* in *E. faecalis* 14 µg/mL) oziroma mutiranim sevom gramnegativnih bakterij (MIC₉₀ za *E. coli TolC* ozi. *E. coli impA* od 2 µg/mL do 256 µg/mL). Zaključimo lahko, da je za afiniteto do ATP vezavnega mesta ključen 4,5-dibromo-1*H*-pirolni fragment, za prehajanje v bakterijo in s tem protibakterijsko delovanje pa je ključna rahlo kisljena fenolna skupina tirozina in odsotnost močnejše kisljenih funkcionalnih skupin. Pomembno vlogo pri inhibiciji giraze B ima tudi aromatski obroč na mestu B (slika 4).

Naši rezultati dajejo pomembne informacije za nadaljnjo optimizacijo 4,5-dibromo-1*H*-pirolnih inhibitorjev giraze B s tirozinskim fragmentom. Predvsem je obetavno, da imajo tovrstne spojine že pri inhibiciji giraze B v nizkem mikromolarnem območju IC₅₀ solidno protibakterijsko delovanje. V prihodnje bi bilo smiselno razrešiti kristalno strukturo predstavnika tega strukturnega tipa v ATP vezavnem mestu giraze, saj bi s to informacijo lažje optimizirali zaviralno aktivnost na girazo B in s tem dosegli boljše protibakterijsko delovanje. Pomembno bo tudi spremljanje selektivne toksičnosti.

8 Priloga: šifrant spojin

Oznaka spojine v magistrski nalogi	Oznaka spojine v laboratorijskem dnevniku	Oznaka spojine v magistrski nalogi	Oznaka spojine v laboratorijskem dnevniku
1	FCT 53	12h	FCT 116
2	FCT 55	12b'	FCT 96P
3	FCT 56	12c'	FCT 94P
4a	FCT 59	12d'	FCT 80P
4b	FCT 66	12e'	FCT 97P
4c	FCT 58-1a	12f'	FCT 105P
4d	FCT 58-2a	12et	FCT 95
4e	FCT 61	12ft	FCT 104
4f	FCT 70	12gt	FCT 82
5a	FCT 67a	12ft'	FCT 105
5b	FCT 69b	13a	FCT 47
5c	FCT 60	13b	FCT 87
5d	FCT 64	13c	FCT 86
5e	FCT 63	13d	FCT 75
5f	FCT 71	13e	FCT 91
6	FCT 56-2	13f	FCT 100
7a	FCT 56-2B		
7b	FCT 62		
7cd	FCT 57		
8a	FCT 56H		
8b			
8t	FNK 42		
9	FCT 73		
10	FCT 74		
11	FCT 72		
12a	FCT 88P		
12b	FCT 90P		
12c	FCT 89P		
12d	FCT 79P		
12e	FCT 95P		
12f	FCT 104P		
12g	FCT 82P		

9 Literatura

1. **Stuart B. Levy in Bonnie Marchall.** Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses. *Nature Med Suppl*, 2004, 10(12): 122-129.
2. **Ursula Theuretzbacher.** Global antibacterial resistance: The never-ending story. *JGAR*, 2013, 1: 63-69.
3. **David C Hooper.** Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat*, 1999, 2(1): 38-55.
4. **Sean Shinabarger.** Mechanism of action of the oxazolidinone antibacterial agents. *Expert Opin Investig Drugs*. 1999, 8(8): 1195-1202.
5. **Kerry L. Tedesco in Michael J. Rybak.** http://www.medscape.com/viewarticle/466847_3. [Elektronski] 2004. [dostop: 27. maj 2014.]
6. **Ronald N. Jones, Thomas R. Fritsche, Helio S. Sader in James E Ross.** Activity of Retapamulin (SB-275833), a Novel Pleuromutilin, against Selected Resistant Gram-Positive Cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006, 50(7): 2583-2586.
7. **Anilrudh A. Venugopal in Stuart Johnson.** Fidaxomicin: A Novel Macrocyclic Antibiotic Approved for Treatment of Clostridium difficile Infection. *Clin Infect Dis.*, 2012, 54(4): 568-574.
8. **Koen Anddries, Peter Verhasselt, Jerome Guillemont, Hinrich W H Göhlmann, Jean-Marc Neefs, Hans Winkler, Jef Van Gestel, Philip Timmerman, Min Zhu, Ennis Lee, Peter Williams, Didier de Chaffoy, Emma Huitric, Sven Hoffner, Emmanuelle Cambau, Chantal Truffot-Pernot, Nacer Lounis, Vincent Jarlier.** A Diarylquinoline Drug Active on the ATP Synthase of Mycobacterium tuberculosis. *Science*, 2005, 307: 223-227.
9. **Mark S. Butler, Mark A. Blaskovich in Matthew A. Cooper.** Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J. Antibiot.*, 2013, 66: 571-591.
10. **James C. Wang.** Cellular roles of DNA topoisomerases: A molecular perspective. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2002, 3, 430-440.

11. **Frederic Collin, Shantani Karkare in Anthony Maxwell.** Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2011, 92: 479-497.
12. **Tihomir Tomašič in Lucija Peterlin Mašič.** Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases. *Curr. Top. Med. Chem.*, 2014, 14: 130-151.
13. **Patrick Chène.** ATPases as drug targets: learning from their structure. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1: 665-673.
14. **Rinku Dutta in Masayori Inouye.** GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *TIBS*, 2000, 25(1): 24-28.
15. **Ramesh R. Kale, Manoj G. Kale, Waterson D, Raichurkar A, Hameed SP, Manjunatha MR, Kishore Reddy BK, Malolanarasimhan K, Shinde V, Koushik K, Jena LK, Menasinakai S, Humnabadkar V, Madhavapeddi P, Basavarajappa H, Sharma S, Nandishaiah R, Mahesh Kumar KN, Ganguly S, Ahuja V, Gaonkar S, Naveen Kumar CN, Ogg D, Boriack-Sjodin PA, Sambandamurthy VK, de Sousa SM, Ghorpade SR.** Thiazolopyridone ureas as DNA gyrase B inhibitors: Optimization of antitubercular activity and efficacy. *Bioorg Med Chem Lett.*, 2014, 24: 870-879.
16. **Brino L, Urzhumtsev A, Mousli M, Bronner C, Mitschler A, Oudet P, Moras D.** Dimerization of Escherichia coli DNA-gyrase B provides a structural mechanism for activating the ATPase catalytic center. *J. Biol. Chem*, 2000, 275: 9468-9475.
17. **Nace Zidar, Sofia Montalvão, Žiga Hodnik, Dorota A. Nawrot, Aleš Žula, Janez Ilaš, Danijel Kikelj, Päivi Tammela in Lucija Peterlin Mašič.** Antimicrobial Activity of the Marine Alkaloids, Clathrocin and Oroidin, and Their Synthetic Analogues. *Mar. Drugs*, 2014, 12(2): 940-963.
18. **Barbara Forte, Beatrice Malgesini, Claudia Iutti, Francesca Quartieri, Alessandra Scolaro in Gianluca Papeo.** A Submarine Journey: The Pyrrole-Imidazole Alkaloids. *Mar. Drugs*, 2009, 7(4): 705-753.

19. **Dean M. Wilson, Monica Puyana, William Fenical in Joseph R. Pawlik.** Chemical Defense of the Caribbean Reef Sponge *Axinella corrugata* Against Predatory Fishes. *J. Chem. Ecol.*, 1999, 25(12): 2811-2823.
20. **Ulf Bickmeyer, Christoph Drechsler, Matthias Köck, Michael Assmann.** Brominated pyrrole alkaloids from marine *Agelas* sponges reduce depolarization-induced cellular calcium elevation. *Toxicon*, 2004, 44: 45-51.
21. **Žiga Hodnik, Tihomir Tomašić, Lucija Peterlin Mašič, Fiona Chan, Robert W. Kirby, David J. Madge, Danijel Kikelj.** Novel state-dependent voltage-gated sodium channel modulators, based on marine alkaloids from *Agelas* sponges. *Eur. J. Med. Chem.*, 2013, 70: 154-164.
22. **Nace Zidar, Žiga Jakopin, David J. Madge, Fiona Chan, Jan Tytgat, Steve Peigneur, Marija Sollner Dolenc, Tihomir Tomašić, Janez Ilaš, Lucija Peterlin Mašič, Danijel Kikelj.** Substituted 4-phenyl-2-aminoimidazoles and 4-phenyl-4,5-dihydro-2-aminoimidazoles as voltage-gated sodium channel modulators. *Eur. J. Med. Chem.*, 2014, 74(3): 23-30.
23. **Justin J. Richards, T. Eric Ballard, Robert W. Huigens III in Christian Melander.** Synthesis and Screening of an Oroidin Library against *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Chembiochem*, 2008, 9(8): 1267-1279.
24. **Žiga Hodnik, Joanna M. Łoś, Aleš Žula, Nace Zidar, Žiga Jakopin, Marcin Łoś, Marija Sollner Dolenc, Janez Ilaš, Grzegorz Węgrzyn, Lucija Peterlin Mašič, Danijel Kikelj.** Inhibition of biofilm formation by conformationally constrained indole-based analogues of the marine alkaloid oroidin. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2014, 24(11): 2530-2534.
25. **Balaram S. Takale, Neha V. Desai, Afsar Ali Siddiki, Hemchandra K. Chaudhari, Vikas N. Telvekar.** Synthesis and biological evaluation of pyrrole-2-carboxamide derivatives: oroidin analogues. *Med. Chem. Res.*, 2014, 23(3): 1387-1396.
26. **Lauren Dyson, Anthony D. Wrigth, Kelly A. Young, Jennette A. Sakoff, Adam McCluskey.** Synthesis and anticancer activity of focused compound libraries from the natural product lead, oroidin. *Bioorg. Med. Chem.*, 2014, 22: 1690-1699.

27. **Thomas Lindel, Gregor Breckle, Matthias Hochgürtel, Christian Volk, Achim Grube, Matthias Köch.** Decomposition of oroidin in DMSO/TFA. *Tetrahedron Lett.*, 2004, 45(44): 8149-8152.
28. **Ann E. Eakin, Oluyinka Green, Neil Hales, Grant K. Walkup, Shanta Bist, Alok Singh, Ning Gao, Alex Breeze, Dave Timms, Beth Andrews, Maria Uria-Nickelsen, Kulie Demeritt, James T. Loch III, Ken Hull, April Blodgett, Ruth N. Illingworth, Bryan MacPherson, Hailhong Ni and Brian Sherer.** Pyrrolamide DNA Gyrase Inhibitors: Fragment-Based Nuclear Magnetic Resonance Screening To Identify Antibacterial Agents. *Antimicrob. Agents and Chemoter.*, 2012, 56(3): 1240-1246.
29. **Micheal Trzoss, Daniel C. Bensen, Xiaoming Li, Zhiyong Chen, Thanh Lam, Junhu Zhang, Christopher J. Creighton, Mark L. Cunningham, Bryan Kwan, Mark Stidham, Kirk Nelso, Vickie Brown-Driver, Amanda Castellano, Karen J. Shaw, Felice C. Lightstone, Sergio E. Wong, Toan B. Nguyen, John Finn, Leslie W. Tari.** Pyrrolopyrimidine inhibitors of DNA gyrase B (GyrB) and topoisomerase IV (ParE), Part II: Development of inhibitors with broad spectrum, Gram-negative antibacterial activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2013, 23(5): 1537-1543.
30. **Matjaž Brvar, Andrej Perdih, Miha Renko, Gregor Anderluh, Dušan Turk in Tom Solmajer.** Structure-Based Discovery of Substituted 4,5'-Bithiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors. *J. of Med. Chem.*, 2012, 55(14): 6413-6426.
31. **Anthony Maxwell, Nicholas P. Burton and Natasha O'Hagan.** High-throughput assays for DNA gyrase and other topoisomerases. *Nucl. Acid Res.* 2006, 36(15): e104.
32. **Carsten Schmuck, Volker Bickert, Michael Merschky, Lars Geiger, Daniel Rupprecht, Jürgen Dudaczek, Peter Wich, Thomas Rehm and Uwe Machon.** A Facile and Efficient Multi-Gram Synthesis of N-Protected 5-(Guanidinocarbonyl)-1H-pyrrole-2-carboxylic Acids. *Eur. J. Org. Chem.*, 2008, 2: 324-329.
33. **Alex W. White, Nicholas Carpenter, Jerome R.P. Lottin, Richard A. McClelland, Robert I. Nicholson.** Synthesis and evaluation of novel anti-proliferative pyrroloazepinone and indoloazepinone oximes derived from marine natural product hymenialdisine. *Eur. J. Med. Chem.*, 2012, 56: 246-253.

34. **Christian Melander, Justin J. Richards, Cynthia Bunders.** *Inhibition of bacterial biofilms with imidazole derivatives.* US 2008/0181923 A1 ZDA, datum patenta: 31. julij 2008.
35. **James A. Ponasik, Susan Conova, Denise Kinghorn, William A Kinney, Daniel Rittschof, Bruce Ganem.** Pseudoceratidine, A Marine Natural Product with Antifouling Activity: Synthetic and Biological Studies. *Tetrahedron*, 1998, 54(25): 6977-6986.
36. **Wang M-Z, Xu H, Liu T-W, Feng Q, Yu S-J, Wang S-H.** Design, synthesis and antifungal activities of novel pyrrole alkaloid analogs. *Eur. J. of Med.Chem.*, 2011, 46(5): 1463-72.
37. **Carsten Schmuck in Jürgen Dudaczek.** New guanidinium-based carboxylate receptors derived from 5-amino-pyrrole-2-carboxylate: synthesis and first binding studies. *Tetrahedron Lett.* 2005, 46: 7101-7105.
38. **Junyu Dong, Yan Wang, Qinjie Xiang, Xirui Lv, Wen Weng in Qingle Zeng.** Synthesis of Chiral Amino Acid Anilides by Ligand-Free Copper-Catalyzed Selective N-Arylation of Amino Acid Amides. *Adv. Synth. Catal.*, 2013, 355: 692-696.
39. **Carey, Francis A. in Sundberg, Richard J.** *Advanced Organic Chemistry Fifth Edition, Part B: Reactions and Synthesis.* New York : Springer, 2007. str. 1044. ISBN-13: 978-0-387-68350-8.
40. Konzultacija s prof. dr. Jurijem Svetetom.
41. **Andrew Novak, Luke D. Humphreys, Matthew D. Walker, Simon Woodward.** Amide bond formatiln using air-stable source of AlMe₃. *Tetrahedron Lett.*, 2006, 32(47): 5767-5769.
42. **Jeremy I. Levin, Edward Turos in Steven M. Weinreb,** An Alternative procedure for aluminium-mediated conversion of esters to amides. *Synth. Commun.*, 1982, 31(12): 989-993.