

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

HELENA MACUT

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA NOVIH 4,5-DIBROMO-N-FENIL-1*H*-PIROL-2-KARBOKSAMIDNIH IN N-FENIL-1*H*-INDOL-2-KARBOKSAMIDNIH ZAVIRALCEV DNA GIRAZE B**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL 4,5-DIBROMO-N-PHENYL-1*H*-PYRROLE-2-CARBOXAMIDE IN N-PHENYL-1*H*-INDOLE-2-CARBOXAMIDE DNA GYRASE B INHIBITORS**

**MAGISTRSKA NALOGA**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2014

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Naceta Zidarja, mag. farm. Masno spektrometrične meritve so opravili na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani, encimske teste na fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, protibakterijske teste pa na Univerzi v Helsinkih in v podjetju Fidelta v Zagrebu.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Nacetu Zidarju in sodelavcem katedre za farmacevtsko kemijo za pomoč in pridobljeno znanje.

### **Izjava**

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

Helena Macut

Ljubljana, 2014

Predsednik komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Vid Mlakar, univ. dipl. mikrobiol.

**VSEBINA**

<b>POVZETEK .....</b>	<b>iv</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vi</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>viii</b>
<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. BAKTERIJSKE INFEKCIJE SKOZI ZGODOVINO .....	1
1.2. PROTIMIKROBNE UČINKOVINE .....	1
1.3. RAZVOJ REZISTENCE .....	3
1.3.1. Mehanizmi rezistence .....	3
1.4. UČINKOVINE Z DELOVANJEM NA DNA.....	4
1.4.1. Zgradba in vloga molekule DNA .....	4
1.4.2. Podvajanje molekule DNA .....	5
1.4.3. Bakterijske topoizomeraze .....	6
1.4.4. Strukturi DNA giraze in topoizomeraze IV .....	7
1.4.5. Vezavno mesto za ATP na DNA girazi B .....	8
1.5. ZAVIRALCI DNA GIRAZE.....	9
1.5.1. Zaviralci DNA giraze A .....	9
1.5.2. Zaviralci DNA giraze B .....	10
<b>2. NAČRT DELA.....</b>	<b>14</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE .....</b>	<b>17</b>
3.1. REAGENTI IN TOPILA .....	17
3.2. KROMATOGRAFSKE METODE .....	17
3.3. SPEKTROSKOPSKE METODE .....	17
3.4. DOLOČEVANJE TALIŠČA.....	18
3.5. RISANJE SPOJIN IN NOMENKLATURA .....	18
3.6. SIDRANJE SPOJIN V AKTIVNO MESTO DNA GIRAZE B.....	18

3.7. ENCIMSKI TESTI IN DOLOČANJE IC <sub>50</sub> .....	18
3.8. DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI.....	19
3.9. DOLOČANJE K <sub>D</sub> S POVRŠINSKO PLAZMONSKO RESONANCO (SPR) .....	19
<b>4. EKSPERIMENTALNI DEL .....</b>	<b>21</b>
4.1. REAKCIJSKE SHEME.....	21
4.2. SINTEZNI POSTOPKI IN ANALIZNI PODATKI .....	27
<b>5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>51</b>
5.1. KOMENTAR IZBRANIH SINTEZNIH POSTOPKOV .....	51
5.1.1. Sinteza amidne vezi s sklopitvenim reagentom TBTU .....	51
5.1.2. Sinteza amidne vezi s kislinskim kloridom .....	52
5.1.3. Poskus sinteze spojine 6c .....	52
5.1.4. Sinteza spojine 24; alkiliranje sterično bolj oviranega mesta.....	53
5.2. REZULTATI BIOLOŠKIH TESTIRANJ .....	55
5.2.1. Encimski testi .....	55
5.2.2. Površinska plazmonska resonanca (SPR).....	57
5.2.3. Protibakterijska aktivnost .....	62
5.3. ZAKLJUČEK .....	64
<b>6. LITERATURA .....</b>	<b>66</b>

## POVZETEK

Pomembnim odkritjem v boju proti infekcijskim boleznim v prejšnjem stoletju je sledil hiter razvoj bakterijske odpornosti, zaradi česar je postala potreba po razvoju novih protibakterijskih učinkovin zelo velika. Razvoj novih protibakterijskih učinkovin gre v smeri iskanja novih potencialnih tarč ali delovanja na znano tarčo po drugačnem mehanizmu.

DNA giraza je bakterijski encim, ki sodi v podskupino topoizomeraz tipa IIA, njegova glavna naloga pa je uvedba negativnega dodatnega zvitja v molekulo DNA, s čemer ima ključno vlogo v procesu podvajanja molekule DNA. DNA giraza je tetramerni encim, sestavljen iz dveh podenot imenovanih DNA giraza A (GyrA) in dveh podenot imenovanih DNA giraza B (GyrB). Podenota GyrA je odgovorna za cepitev in ponovno združitev molekule DNA, podenota GyrB pa veže molekulo ATP in preko njene hidrolize zagotavlja energijo za potek encimske reakcije.

S pomočjo racionalnega načrtovanja, ki je temeljilo na poznavanju kristalnih struktur kompleksov GyrB z že znanimi zaviralci in struktur v literaturi opisanih inhibitorjev, smo pripravili 23 novih, 4,5-dibromo-*N*-fenil-1-*H*-pirol-2-karboksamidnih in *N*-fenil-1-*H*-indol-2-karboksamidnih potencialnih zaviralcev DNA giraze B. Pripravljenim spojinam sta skupna pirolamidni ali indolamidni del, strukturno pa jih lahko razdelimo v štiri razrede: (i) spojine z benzen-1,4-diaminskim centralnim delom, (ii) spojine z 4-aminofenolnim centralnim delom, (iii) spojine s heterocikličnim substituentom na 4-amino benzenskem obroču in (iv) spojine z 4-aminobenzamidnim centralnim delom.

Vse spojine smo biološko ovrednotili na encimu DNA giraze iz bakterije *Escherichia coli*, najboljše izmed njih pa tudi na DNA girazo iz bakterije *Staphylococcus aureus* in na encimih topoizomeraze IV iz bakterij *E. coli* in *S. aureus*. Najbolj aktivnim spojinam iz vsake serije smo določili protibakterijsko delovanje na dveh grampozitivnih in dveh gramnegativnih bakterijskih sevih. Devet izmed testiranih spojin je izkazovalo zelo obetavne srednje inhibitorne koncentracije ( $IC_{50}$ ) na DNA girazo iz *E. coli* manjše od  $10 \mu\text{M}$ , od tega je bila najbolj aktivna spojina **39a** z  $IC_{50}$  vrednostjo  $360 \text{ nM}$ . Vezavno afiniteto dveh spojin do GyrB

smo dodatno ovrednotili s pomočjo biofizikalne tehnike površinske plazmonske rezonance. Rezultati pridobljeni tekom magistrskega dela in analiza odnosa med strukturo in delovanjem pomenijo pomemben prispevek k razvoju novih zaviralcev bakterijske DNA giraze B in širše k razvoju novih potencialnih protibakterijskih učinkovin.

## ABSTRACT

Due to increasing incidence of bacterial resistance to most available antibacterial drugs the need for novel antibacterials is of growing importance. Current research has focused on discovery of antibacterial agents that either affect a new target or act on an established validated target via novel mechanisms of action.

DNA gyrase is a bacterial type IIA topoisomerase whose main function is the introduction of negative supercoils into the circular DNA molecule. DNA gyrase is a heterotetrameric enzyme, consisting of two A subunits (DNA gyrase A or GyrA) and two B subunits (DNA gyrase B or GyrB). The GyrA subunit is responsible for breakage and reunion of the double DNA strand, while the GyrB subunit provides the energy required for negative supercoiling through hydrolysis of ATP.

Using a rational drug-discovery approach based on the information derived from the available co-crystal structures of GyrB with known inhibitors, we designed and synthesized a series of 23 novel 4,5-dibromo-*N*-phenyl-1-*H*-pyrrole-2-carboxamides and *N*-phenyl-1-*H*-indole-2-carboxamides as potential DNA gyrase B inhibitors. The prepared compounds share pyrrolamide or indolamide western parts and, based on the central part, can be divided into four different sets: (i) compounds with benzene-1,4-diamine central part, (ii) compounds containing a 4-aminophenol central core, (iii) compounds containing a 4-aminobenzene ring with heterocyclic substituents and (iv) compounds with 4-aminobenzamide central part.

All target compounds were biologically evaluated for their inhibitory activities on DNA gyrase from *Escherichia coli*. Most potent compounds were additionally tested on DNA gyrase from *Staphylococcus aureus* and on topoisomerase IV from *E. coli* and *S. aureus*. Antimicrobial activities of the most potent compounds of each series were evaluated against two Gram-positive and two Gram-negative bacterial strains. Nine of the tested compounds demonstrated very promising half maximal inhibitory concentrations ( $IC_{50} < 10 \mu\text{M}$ ) on DNA gyrase from *E. coli* with the most potent compound, **39a**, displaying an  $IC_{50}$  value of 360 nM.

The binding affinities of compounds **6a** and **18a** with GyrB were additionally evaluated by surface plasmone resonance experiments.

The results obtained during the present study, together with structure-activity relationship analyses, represent an important contribution to the development of novel DNA gyrase B inhibitors and furthermore to the development of novel potent antibacterial agents.

## SEZNAM OKRAJŠAV

Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	asparaginska kislina
ATP	adenozintrifosfat
IR- ATR	infrardeča spektroskopija- tehnika oslabljene popolne odbojnosti
CDCl <sub>3</sub>	devterirani kloroform
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	diklorometan
d	dublet
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	devterirani dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
GHKL	nadružina proteinov: DNA giraza B- Hsp90-histidin-serin protein kinaze- MutL
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
Et	etilna skupina
EtOH	etanol
G(–)	po Gramu negativna bakterija
G(+)	po Gramu pozitivna bakterija
Glu	glutaminska kislina
Gly	glicin
GyrA	podenota A DNA giraze
GyrB	podenota B DNA giraze
His	histidin
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
Hz	hertz
HR-MS	masna spektrometrija visoke ločljivosti

$IC_{50}$	srednja inhibitorna koncentracija
Ile	izolevcin
IR	infrardeča spektroskopija
$J$	sklopitvena konstanta
$K_d$	disociacijska konstanta
Lys	lizin
m	multiplet
M	molarnost (mol/L)
Me	metilna skupina
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MS	masna spektrometrija
MS-ESI	masna spektrometrija- »Electrospray« ionizacija
MRSA	proti meticilinu odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
ParC	podenota C topoizomeraze IV
ParE	podenota E topoizomeraze IV
Pd/C	zmes paladija v aktivnem oglju
ppm	delci na milijon ( $10^{-6}$ )
Pro	prolin
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
RA	rezidualna aktivnost (razmerje med aktivnostjo encima ob dodatku zaviralca in v njegovi odsotnosti, v odstotkih)
Rf	retencijski faktor
s	singlet
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
t	triplet
T	temperatura

TBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametilamonijev tetrafluoroborat
TFA	trifluoroocetna kislina
THF	tetrahidrofuran
Thr	treonin
TLC	tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
Tyr	tirozin
Val	valin
$\delta$	kemijski premik

## 1. UVOD

### 1.1. BAKTERIJSKE INFEKCIJE SKOZI ZGODOVINO

Infekcije spremljajo človeštvo že od samih začetkov in jim že od nekdaj namenjamo veliko pozornosti. S pojavom infekcij se je pojavila tudi nuja po nudenju pomoči obolelim ljudem, kar se je izkazalo za izredno težko nalogo tako zahvaljujoč akutni naravi večine infekcij kot tudi nepoznavanju njihovih povzročiteljev. Kljub temu, da so bakterije odkrili že pred 300 leti, so šele pred 150 leti uspeli raziskati njihovo vlogo pri okužbah, kar je postavilo temelj za sodobno kemoterapijo. (1, 2)

Prvi večji napredki v več desettisočletij trajajočem boju z mikroorganizmi so se začeli v 19. stoletju, ko sta francoski kemik Louis Pasteur in nemški mikrobiolog Robert Koch neodvisno drug od drugega začela na znanstven način iskati povzročitelje nalezljivih bolezni. Kljub temu se je obdobje moderne kemoterapije začelo šele z odkritjem sulfonamidov v 30-ih letih prejšnjega stoletja, za očeta moderne kemoterapije pa štejemo njihovega odkritelja, nemškega kemika Paula Ehrlicha. Zlata doba boja proti infekcijskim boleznim se je začela nekaj let pozneje, ko je škotski biolog Alexander Fleming odkril penicilin in tako sprožil razcvet sodobnega boja proti bakterijskim okužbam. Zadnja leta smo priča manjšemu številu znanstvenih odkritij na področju bakterijskih okužb, zaradi naraščajoče odpornosti bakterij pa je nuja po odkrivanju novih učinkovin večja kot kadarkoli prej. (2, 3)

### 1.2. PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

Izraz kemoterapija je v začetku 20. stoletja prvič uporabil Paul Ehrlich, in sicer za uničenje povzročiteljev okužbe z uporabo sintetičnih učinkovin. Kasneje so definicijo kemoterapevtikov razširili še na antibiotike, ki so metaboliti nekaterih vrst mikroorganizmov ali njihovi polsintezni derivati in preprečujejo rast ali povzročajo smrt drugih mikroorganizmov, ter na učinkovine, ki uničijo ali zavirajo rast rakavih celic. (2) Protibakterijske učinkovine lahko delimo glede na mehanizem njihovega delovanja, kemijsko strukturo ali spekter delovanja. Po učinkih na bakterije so lahko baktericidne (povzročijo smrt) ali bakteriostatične (preprečijo rast). (1, 3)

Pomembna lastnost protimikrobnih učinkovin je selektivna toksičnost, kar pomeni da delujejo zgolj na povzročitelja okužbe in ne na gostitelja. Poleg selektivne toksičnosti so za dober kemoterapevtik pomembne še naslednje lastnosti: širok obseg delovanja, dobre porazdelitvene lastnosti (dobro prodirajo v celico, medceličnino in likvor), šibka vezava na plazemske beljakovine, odsotnost oz. čim manjša pogostost neželenih učinkov, dovolj dolg razpolovni čas v plazmi in dovolj dobra biološka uporabnost pri peroralni aplikaciji. V večini primerov lahko naštete značilnosti dosežemo z optimizacijo s pomočjo farmacevtsko-kemijskih pristopov. (1, 2, 3)

Doseganje selektivne toksičnosti učinkovin temelji na poznavanju biokemijskih razlik med patogenom in gostiteljem. Biokemijske reakcije, ki so potencialne tarče delovanja kemoterapevtikov na molekularni ravni lahko razdelimo v tri razrede, in sicer (*i*) od ATP odvisna sinteza preprostih organskih spojin, ki služijo kot prekurzorji v nadaljnjih reakcijah, (*ii*) energijsko odvisna sinteza aminokislin, nukleotidov, amino sladkorjev, fosfolipidov, ogljikovih hidratov in rastnih faktorjev, ki jih celice potrebujejo za rast in preživetje in (*iii*) združevanje majhnih molekul v makromolekule (proteine, DNA, RNA, peptidoglikan in polisaharide).

Reakcije, ki sodijo v prvi razred so najmanj primerne tarče, saj so mehanizmi izkoriščanja energije v obliki ATP podobni pri bakterijskih in človeških celicah, poleg tega pa lahko bakterije izkoriščajo energijo tudi iz nesladkornih virov. Reakcije iz drugega razreda so nekoliko bolj primerne tarče, saj v bakterijskih celicah potekajo nekatere presnovne poti, ki jih človeške celice ne morejo uporabiti. Z vidika selektivne toksičnosti so najbolj obetavne tarče iz tretjega razreda, saj obstajajo bistvene razlike v biosintezi makromolekul med človeškimi in bakterijskimi celicami. V ta razred sodijo sinteza peptidoglikana, sinteza proteinov in sinteza nukleinskih kislin. Na sintezo nukleinskih kislin lahko vplivamo preko inhibicije sinteze nukleotidov, spremicanja lastnosti baznih parov, inhibicije DNA ali RNA polimeraze, inhibicije DNA giraze ali z neposrednim delovanjem na molekulo DNA. (2, 3, 4)

Glede na tarčo, ločimo štiri glavne mehanizme delovanja protimikrobnih učinkovin: (*i*) zaviranje sinteze celične stene ( $\beta$ -laktami, glikopeptidi, bacitracin, vankomicin), (*ii*) delovanje na sintezo znotrajceličnih beljakovin (aminoglikozidi, tetraciklini, makrolidi), (*iii*) vplivanje

na sintezo jedrnih kislin (sulfonamidi, trimetoprim, fluorokinoloni) in (iv) oviranje dejavnosti, ki so povezane s citoplazemsko membrano (amfotericin B, polimiksini) (1, 2)

### 1.3. RAZVOJ REZISTENCE

Bakterijska rezistenza predstavlja resen problem za zdravljenje infekcijskih bolezni, a obenem predstavlja tudi izziv in povečuje potrebo po razvoju novih protibakterijskih učinkovin. Za razvoj odpornosti obstaja več vzrokov, ki so povezani ali s pretirano in nepotrebno uporabo tovrstnih učinkovin ali pa z njihovim neustreznim jemanjem. (1)

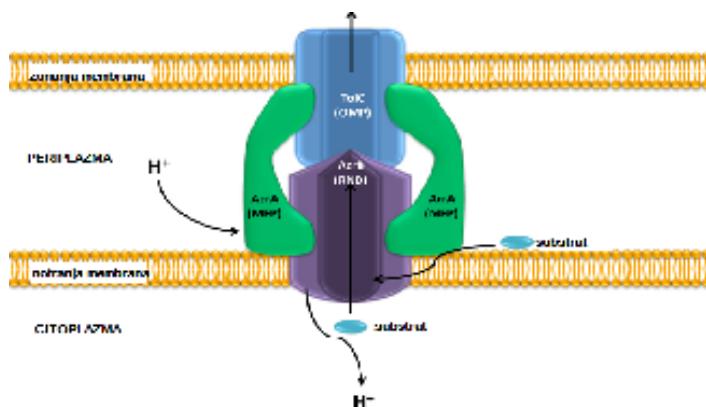
Bakterije so tekom evolucije razvile številne mehanizme, ki jim omogočajo preživetje v neugodnem okolju, med drugim tudi odpornost na nekatere antibiotike. Odpornost na določeno protimikrobnu učinkovino je lahko intrinzična, torej prisotna pred stikom s kemoterapeutikom, ali pridobljena, torej razvita po stiku z učinkovino. Lahko gre tudi za navzkrižno odpornost, torej za odpornost na več učinkovin hkrati. Verjetnost za mutacijo na točno določenem genu je v populaciji bakterij izredno nizka in znaša približno  $1:10^7$ . V primeru mutacije se le-ta prenese in izrazi tudi v hčerinski celici. Klub nizki verjetnost za mutacijo pa moramo upoštevati, da je v primeru infekcije število bakterij močno povečano in je posledično mutacija bolj verjetna, zlasti pri določenih vrstah bakterij v kombinaciji z določenimi zdravili. A vendar nekaj mutiranih bakterij v populaciji v večini primerov še ne pomeni, da je bakterijski sev razvil odpornost, saj protimikrobn zdravljenje močno zmanjša število patogenov. (1, 2)

#### 1.3.1. Mehanizmi rezistence

Odpornosti, ki nastane zaradi mutacij v bakterijskem genomu (inverzij, duplikacij, delecij) pravimo intrinzična rezistenza. Poleg mutacije lahko pride do spremembe genoma tudi zaradi prenosa genov med bakterijami ali znotraj bakterije, kar imenujemo pridobljena rezistenza. Poznamo tri mehanizme za medsebojno izmenjevanje genskega materiala med bakterijami, in sicer konjugacijo, pri kateri se plazmid (krajši krožni del DNA) prenese preko fizičnega stika med celicama skozi cevasto tvorbo imenovano pilus in je glavni mehanizem širjenja odpornosti, transdukcijo, ki predstavlja proces prenašanja dednega materiala prek bakteriofaga, in transformacijo, ki predstavlja vključitev proste DNA iz okolice in je klinično

manj pomembna, saj poteka zgolj pri redkih bakterijskih vrstah. Prenos genov lahko poteka tudi s transpozoni, ki omogočajo prenos genov za odpornost med plazmidi, med plazmidom in kromosomom in obratno. (1, 2)

Pridobljene spremembe v genomu se zahvaljujoč kratkemu generacijskemu času lahko izrazijo hitro. Odpornost se lahko razvije preko več biokemijskih mehanizmov, in sicer: (i) spremembe vezavnega mesta, ki pripelje do zmanjšane vezavne afinitete, (ii) zmanjšane akumulacije zdravilne učinkovine v bakteriji oz. aktivnega prečrpavanja iz bakterije s pomočjo izlivnih črpalk (slika 1), (iii) spremenjene prepustnosti bakterijske celične stene in (iv) razvoja alternativne presnovne poti in spremembe encimov. (2)



**Slika 1:** Izlivna črpalka AcrAB-TolC iz bakterije *E.coli* (prirejeno po 5).

#### 1.4. UČINKOVINE Z DELOVANJEM NA DNA

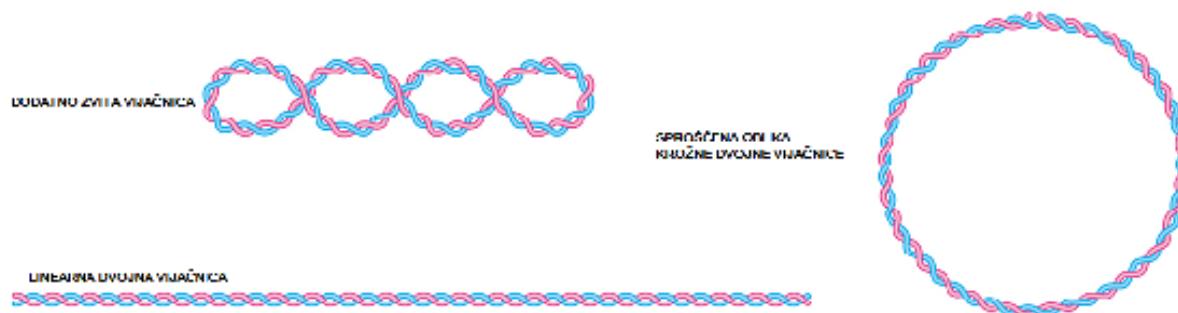
Razvoj učinkovin, ki bi delovale na še ne izkoriščeno tarčo ali bi preko drugačnega mehanizma delovale na že poznano tarčo, predstavlja velik izziv. Eden izmed možnih pristopov k zmanjševanju verjetnosti za pojav rezistence je tudi dualna inhibicija, tj. zaviranje dveh tarč hkrati. Ena izmed zelo zanimivih tarč za razvoj novih protibakterijskih učinkovin je DNA giraza, encim, ki je ključen za preživetje bakterij. (6, 7)

##### 1.4.1. Zgradba in vloga molekule DNA

Molekula DNA je biološka makromolekula, ki služi kot shramba genske informacije in jo pri evkariontskih celicah najdemo predvsem v kromosomih v celičnem jedru, prisotna pa je tudi v nekaterih organelih v citoplazmi (mitohondriji, kloroplasti, endoplazmatski retikulum,

Golgijev aparat idr.). Za razliko od evkarijontskih, prokarijontske celice nimajo jedra in vsebujejo eno samo krožno molekulo DNA, ki leži prosti v citoplazmi in vsebuje vse informacije, ki so potrebne za celično rast in razmnoževanje. Poleg glavne molekule DNA so v prokarijontskih celicah lahko prisotne še manjše krožne molekule DNA, imenovane plazmidi. (8)

DNA je pomembna zaradi svoje vloge pri shranjevanju, prenašanju in izražanju genske informacije. Molekulo sestavlja dve komplementarni polinukleotidni verigi zviti v dvojno vijačnico, ki je lahko linearna ali krožna. Krožno obliko najdemo pri bakterijah, nekaterih virusih, bakteriofagih, v mitohondriih in v kloroplastih. Krožna dvojna vijačnica je lahko prisotna v sproščeni obliki, ki nastane s povezovanjem obeh koncov linearne molekule, ali pa je zvita v novo konformacijo, ki jo imenujemo dodatno zvita DNA in je manj stabilna od sproščene (slika 2). Dodatno zvita oblika nastane, če se linearna molekula še enkrat zasuka okoli svoje osi tik preden se zapre. Pretvarjanje med oblikama DNA katalizirajo encimi iz skupine topoizomeraz. (8, 9)

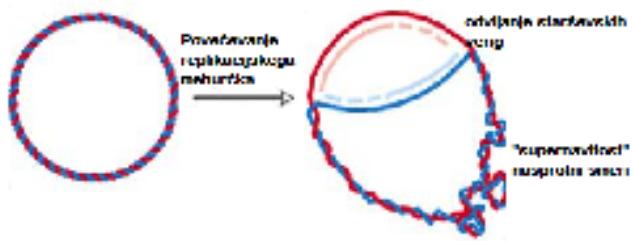


Slika 2: Linearna, sproščena in dodatno zvita DNA (prirejeno po 10).

#### 1.4.2. Podvajanje molekule DNA

Molekula DNA je v celici močno zgoščena. Ko pride pri celični delitvi do podvajanja krožne bakterijske DNA, se komplementarni verigi DNA najprej ločita, pri čemer nastane t.i. replikacijski mehurček, nato pa vsaka od njiju služi kot matrica za izgradnjo nove komplementarne verige. Podvajanje poteka istočasno v obeh smereh. Odvijanje starševskih verig in s tem povečevanje replikacijskega mehurčka povzroči zgoščevanje zavojev in

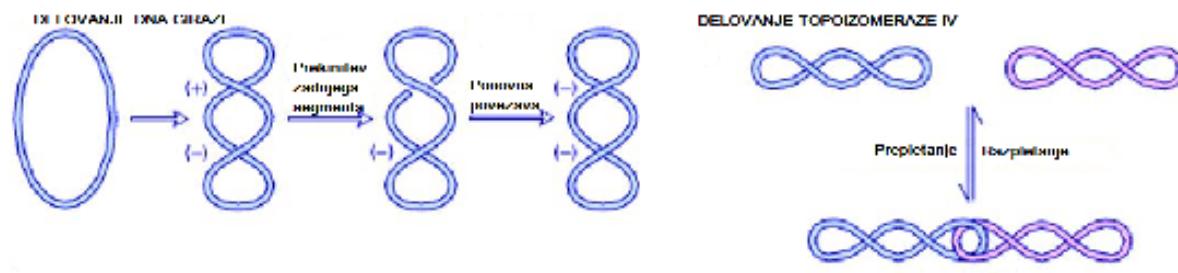
povečevanje napetosti v dvojnovijačni DNA, kar postopoma ustavi rast replikacijskega mehurčka (slika 3). Topoizomeraze relaksirajo napete odseke DNA v sproščeno konfiguracijo. Ko se replikacija zaključi in se replikacijski vilici srečata, topoizomeraze katalizirajo ločitev novonastalih hčerinskih dvojnih vijačnic. (8, 9)



Slika 3: Podvojevanje krožne bakterijske DNA in rast replikacijskega mehurčka (prirejeno po 11).

#### 1.4.3. Bakterijske topoizomeraze

Topoizomeraze so encimi, ki spreminja topološko stanje molekule DNA, kar je ključno v procesih podvajanja in popravljanja DNA. Delimo jih na topoizomeraze tipa I, ki katalizirajo cepitev le ene verige dvojnovijačne DNA in topoizomeraze tipa II, ki so odgovorne za cepitev obeh verig dvojne vijačnice DNA hkrati, pri tem pa porabljajo energijo, pridobljeno s hidrolizo molekule ATP. (9,12) Pri bakterijah najdemo dva encima iz podskupine IIA topoizomeraz II, in sicer DNA girazo, ki je odgovorna za uvedbo in odstranitev dodatnega zvitja molekule DNA med podvajanjem, in topoizomerazo IV, katere glavna funkcija je kataliza ločitve hčerinskih dvojnih vijačnic po končanem podvajaju. (slika 4). (12, 13)

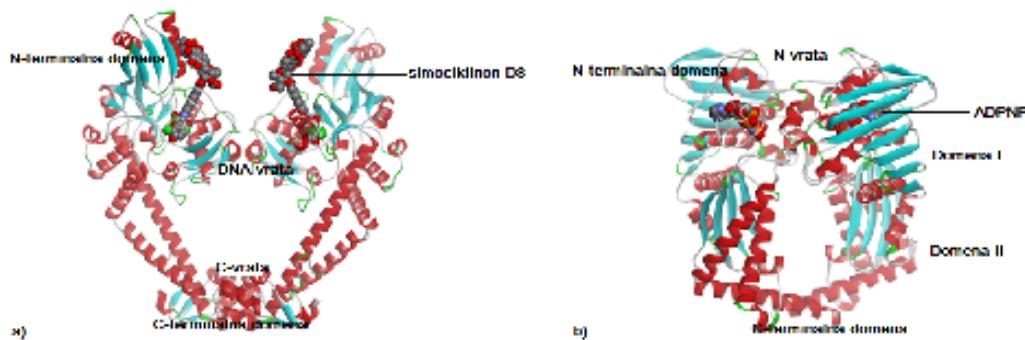


Slika 4: Funkciji DNA giraze in topoizomeraze IV (prirejeno po 11).

#### 1.4.4. Strukturi DNA giraze in topoizomeraze IV

DNA girazo zaradi strukturne sorodnosti uvrščamo v skupino proteinov GHKL (giraza, Hsp90, histidin kinaza, MutL). DNA giraza je tetramerni encim, sestavljen iz dveh podenot imenovanih DNA giraza A (GyrA) in dveh podenot imenovanih DNA giraza B (GyrB), ki skupaj tvorijo funkcionalni heterotetramer  $A_2B_2$ . Podenota GyrA je odgovorna za cepitev in ponovno združitev molekule DNA, GyrB pa veže molekulo ATP in preko njene hidrolize zagotavlja energijo potrebno za potek encimske reakcije. Tudi topoizomeraza IV, ki je strukturno in funkcionalno homologna DNA girazi, je heterotetramer ( $C_2E_2$ ), ki ga sestavljata dve podenoti imenovani ParC (homologni podenotam GyrA) in dve podenoti imenovani ParE (homologni podenotam GyrB). Podenoti GyrA in ParC na eni strani ter podenoti GyrB in ParE na drugi strani vsebujeta veliko stopnjo medsebojne podobnosti v aminokislinski sekvenci in veliko podobnosti v tridimenzionalni zgradbi aktivnega mesta. (6, 9, 12)

Čeprav kristalni strukturi celotne DNA giraze in topoizomeraze IV še nista razrešeni, so objavljene številne kristalne strukture posameznih podenot in manjših delov podenot obeh encimov. Znanih je več kristalnih struktur kompleksov podenote GyrA z njenimi zaviralci (slika 5a), kristalnih struktur kompleksov podenote GyrB z njenimi zaviralci in kristalnih struktur podenote GyrB v kompleksu z vezanim nehidrolizirajočim analogom ATP, ADPNP (slika 5b).



**Slika 5:** a) Podenota  $GyrA_2$  iz bakterije *E.coli* v kompleksu z inhibitorjem simociklinonom D8, b) Podenota  $GyrB_2$  iz bakterije *E.coli* v kompleksu z ADPNP (prirejeno po 12).

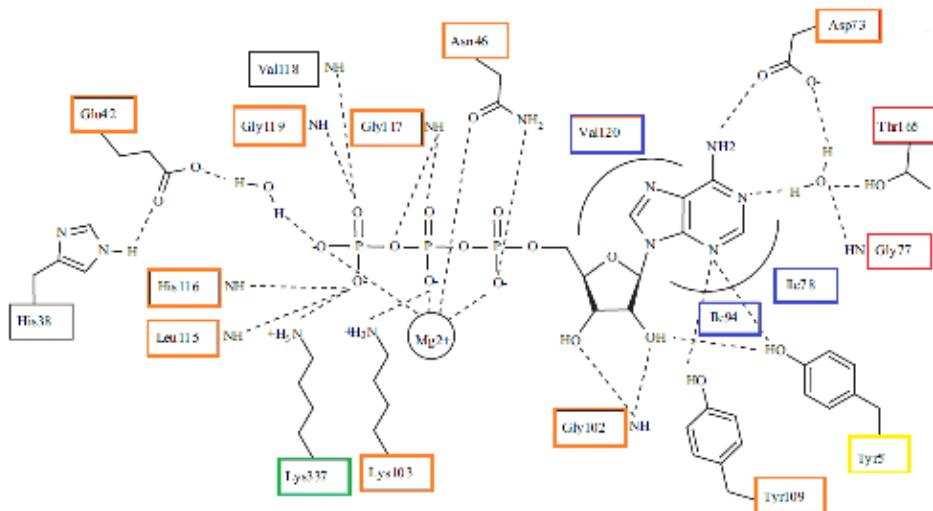
DNA giraza vsebuje tri vrata: N-vrata, C-vrata in DNA-vrata, ki se zaporedoma odpirajo in zapirajo in s tem omogočajo prehod posameznih faz katalitičnega cikla cepitve dvojnovijačne DNA. N-vrata ležijo na stiku med dvema podenotama GyrB, C-vrata pa nastanejo na stiku med N-terminalnima domenama dveh podenot GyrA. (12, 13)

#### **1.4.5. Vezavno mesto za ATP na DNA girazi B**

Dobro poznavanje vezavnega mesta za ATP na bakterijski DNA girazi B in izkoriščanje strukturnih razlik med vezavnimi mesti za ATP na DNA girazi in na številnih drugih bakterijskih in človeških encimih, ki vežejo ATP (npr. na humani protein kinazi), omogoča načrtovanje selektivnih zaviralcev, ki v terapevtskih odmerkih ne bodo zavirali sorodnih encimov. (14)

Podenota GyrB je sestavljena iz dveh domen, domene I in domene II (slika 5b). Vezavno mesto za ATP se nahaja na domeni I, ki jo sestavlja 8  $\beta$ -ravnin in 5  $\alpha$ -vijačnic, domena II pa je sestavljena iz 4  $\beta$ -ravnin in 4  $\alpha$ -vijačnic. Med obema domenama je 20 Å velik prostor, ki ga obdajajo pozitivno nabiti argininski ostanki. (13)

Natančna analiza kristalne strukture kompleksa GyrB-ADPNP (slika 6) je pokazala, da je molekula ATP v vezavnem mestu stabilizirana s številnimi vodikovimi vezmi z aminokislinskimi ostanki iz domene I (Glu42, Asn46, Asp73, Gly102, Lys103, Tyr109, Leu115, His116, Gly117, Gly119; oranžna barva), fosfatne skupne pa so s koordinacijsko vezjo povezane z  $Mg^{2+}$  ionom. Vodikove vezi se tvorijo neposredno ali posredno preko molekule kristalne vode. Aminokislinski ostanki Ile78, Ile94 in Val20 (modra barva) tvorijo hidrofobne interakcije z adeninskim in riboznim delom molekule ATP. Lys337 (zelena barva) iz domene II, ki je prav tako del ATP vezavnega mesta, tvori dodatno neposredno vodikovo vez z  $\gamma$ -fosfatno skupino molekule ATP. Posredno preko molekule kristalne vode kompleks dodatno stabilizirajo še vodikove vezi z Asp73, Gly77 in Thr165 (rdeča barva). Thr5' (rumena barva) tvori dve vodikovi vezi z 2-hidroksilno skupino na ribozi in s 3-N dušikom na adeninu, Ile10', pa stabilizira dimer preko hidrofobnih interakcij. (13)



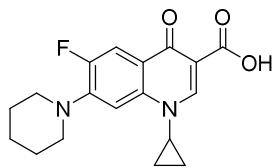
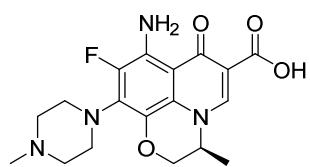
**Slika 6:** Shematski prikaz interakcij med molekulo ATP in GyrB. Aminokislinski ostanki, ki tvorijo vodikove vezi z molekulo ATP so označeni z oranžno barvo, AK ostanki, ki tvorijo hidrofobne interakcije z modro barvo, AK, ki tvori neposredno ionsko vez z  $\gamma$ -fosfatno skupino molekule ATP z zeleno barvo, AK ostanki, ki tvorijo posredne vodikove vezi preko kristalne molekule vode z rdečo barvo, stabilizacija z dvema vodikovima vezmema z ribozo in z 3-N dušikom na adeninu pa z rumeno barvo (prirejeno po 13).

## 1.5. ZAVIRALCI DNA GIRAZE

DNA giraza je odlična in dobro validirana tarča za razvoj novih protibakterijskih učinkovin, saj z njeno blokado zaustavimo razmnoževanje in povzročimo smrt bakterijskih celic. Ker jo najdemo izključno v bakterijskih celicah, je DNA giraza odlična tarča tudi z vidika doseganja selektivne toksičnosti. (12, 14)

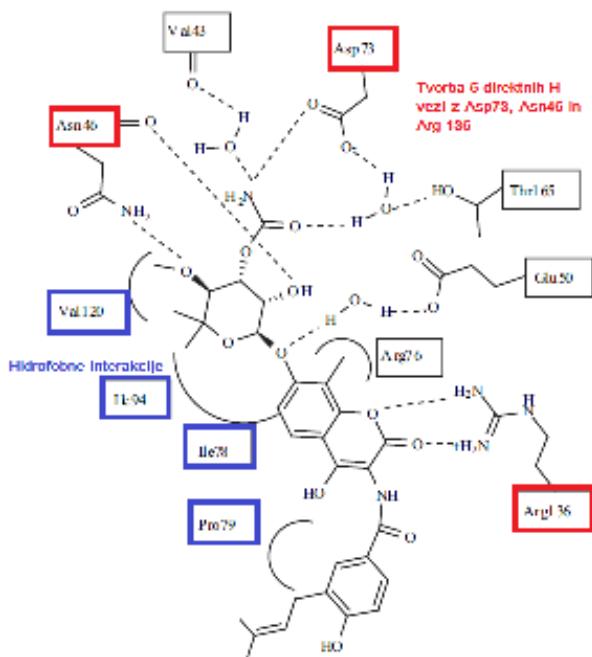
### 1.5.1. Zaviralci DNA giraze A

Čeprav je bilo do danes odkritih že veliko učinkovitih inhibitorjev DNA giraze in topoizomeraze IV, so trenutno v terapevtski uporabi zgolj fluorokinoloni (sliki 7 in 8), zaviralci podenote GyrA oz. ParC, ki so jih odkrili v zgodnjih 60-ih letih prejšnjega stoletja. Fluorokinoloni so skupina širokospektralnih kemoterapeutikov z delovanjem na G(+) in G(-) bakterije. Njihovo delovanje je baktericidno, ker s stabilizacijo kovalentnega kompleksa med molekulo DNA in podenoto GyrA/ParC preprečijo podvajanje celice in tako povzročijo njen smrt. Na žalost je zaradi številnih stranskih učinkov in toksičnosti njihova uporaba omejena, poleg tega pa njihovo učinkovitost omejuje tudi naraščajoča bakterijska odpornost. (12, 13)

**Slika 7:** Ciprofloxacin.**Slika 8:** Antofloxacin.

### 1.5.2. Zaviralci DNA giraze B

Kljub intenzivnim raziskavam na tem področju in številnim poznanim razredom inhibitorjev, trenutno v klinični rabi ni nobenega zaviralca DNA giraze B. DNA giraza B je kot tarča zanimiva tudi zato, ker je dokazano, da je verjetnost razvoja navzkrižne rezistence s fluorokinoloni zelo majhna. Najbolj znan razred naravnih, ATP-kompetitivnih zaviralcev podenote GyrB, so aminokumarini. Aminokumarina klorobiocin in novobiocin, ki nastajata v streptomicetah, se vežeta na GyrB tako, da delno prekrijeta vezavno mesto za ATP in s tem preprečita vezavo molekule ATP. Iz shematskega prikaza interakcij (slika 9), ki temelji na razrešeni kristalni strukturi kompleksa novobiocin-GyrB24 je razvidno, da se L-novioza v novobiocinu veže na vezavno mesto za adeninski fragment molekule ATP in tvori interakcije z Asp73, kumarinski obroč pa interagira z Arg136. Novobiocin skupaj tvori pet direktnih vodikovih vezi z aminokislinskimi ostanki Asn46, Asp73 in Arg136. Klorobiocin ima močnejšo afiniteto do GyrB kot novobiocin, saj 5-metylpirol-2-karboksilat tvori močnejše interakcije v hidrofobnem žepu (Val43, Ala47, Val71, Val167) kot karbamatna skupina novobiocina. Zaradi odličnega *in vivo* delovanja proti G(+) patogenom, so novobiocin v 60-ih letih uporabljali za zdravljenje infekcij z MRSA, a je bil zaradi prevelike toksičnosti pozneje umaknjen iz terapije. (12, 13)

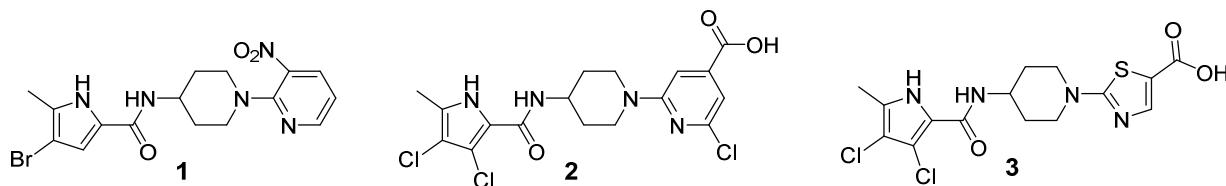


**Slika 9:** Shematski prikaz interakcij med novobiocinom in GyrB24. Aminokislinski ostanki, ki tvorijo neposredne vodikove vezi z novobiocinom, so prikazani z rdečo barvo, tisti, ki tvorijo posredne vodikove vezi s črno barvo, tisti, ki tvorijo hidrofobne interakcije pa z modro barvo (prirejeno po 13).

Zaradi stukturnih podobnosti vezavnih mest za ATP na podenotah GyrB in ParE obstaja možnost načrtovanja inhibitorjev, ki bi poleg zaviranja DNA giraze hkrati delovali še na topoizomerazo IV. Nekateri novejši razredi zaviralcev DNA giraze B izkazujejo visoko vezavno afiniteto do encima, dobro protibakterijsko učinkovitost, obenem pa imajo tudi obetavne fizikalno-kemijske in farmakokinetične lastnosti. Razvoj novejših razredov zaviralcev DNA giraze B je v prvih fazah pogosto temeljal na tehnikah virtualnega rešetanja visoke zmogljivosti (angl. high-throughput screening, HTS) in strukturno podprtrega virtualnega rešetanja (angl. virtual screening, VS) na osnovi liganda, kasneje pa na farmacevtsko-kemijski optimizaciji dobljenih zadetkov s pomočjo strukturno podprtrega načrtovanja (angl. structure-based design, SBD). Poznanih je več kristalnih struktur kompleksov zaviralec-encim, ki omogočajo boljše razumevanje pomembnejših interakcij v vezavnem mestu in služijo kot dobra osnova za nadaljnjo optimizacijo zadetkov. (13, 14) Kljub nekaterim zelo dobrom encimskim in protibakterijskim aktivnostim spojin iz novejših razredov zaviralcev DNA giraze B, trenutno nobena od teh spojin še ni v klinični uporabi, zato

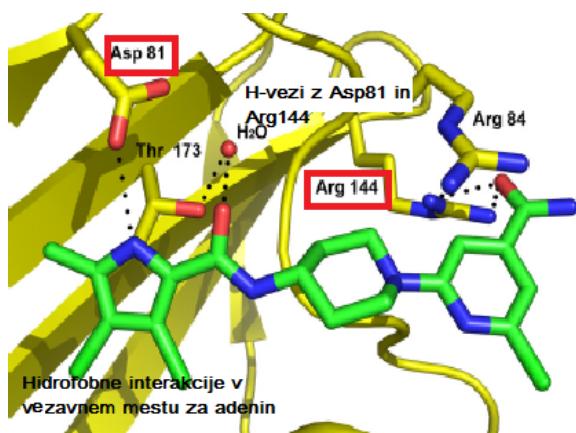
bodo v prihodnje potrebne nadaljnje raziskave, predvsem z namenom izboljšanja njihovih farmakokinetičnih lastosti in zmanjšanja toksičnosti. (12)

Ena izmed novejših in zelo obetavnih skupin zaviralcev GyrB, ki se delno veže na vezavno mesto za ATP, je pirolamidna skupina (slika 10), ki so jo odkrili v AstraZeneci z metodo rešetanja knjižnice fragmentov s pomočjo NMR spektroskopije (15). Čeprav spojine iz prve serije (spojina **1**, slika 10) niso imele dobre protibakterijske učinkovitosti, so s strukturno podprtto optimizacijo na podlagi kristalne strukture kompleksa med N-terminalnim koncem GyrB (GyrB24) iz bakterije *S. aureus* in spojino **1** uspeli sintetizirati derive, ki so izkazali izboljšano encimsko aktivnost ( $IC_{50}$  vrednost za spojino **3** na GyrB iz *E. coli* je 4 nM) in obetavno protibakterijsko aktivnost (MIK vrednost za spojino **3** na *S. aureus* je 2  $\mu$ g/mL). (15)



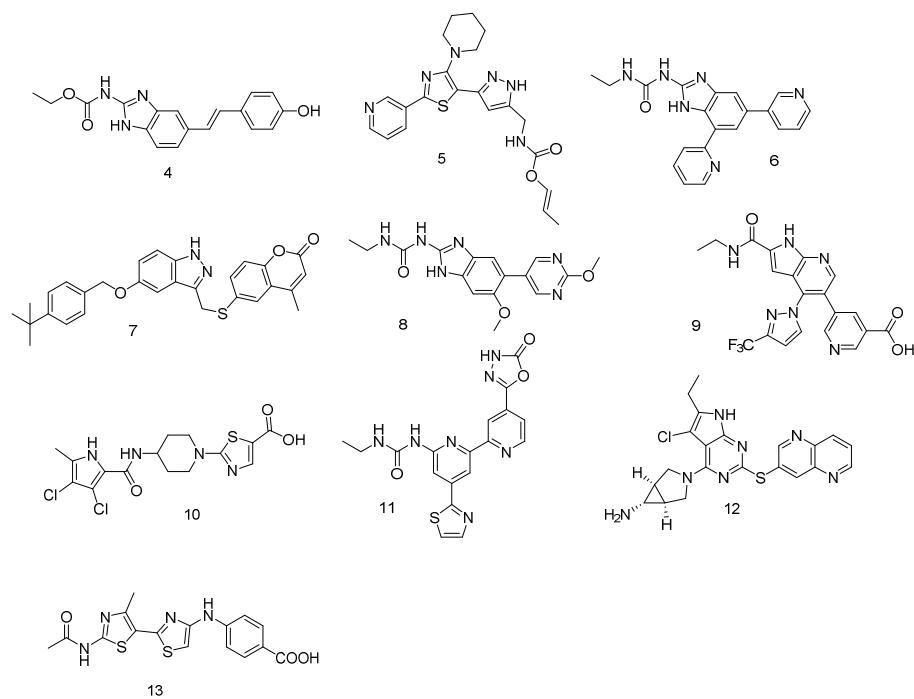
**Slika 10:** Predstavniki pirolamidnih zaviralcev DNA giraze B (prirejeno po 15).

Spojine iz pirolamidne serije se s pirolno skupino vežejo v žep, kamor se v primeru naravnega substrata, ATP, veže adeninska skupina, pri čemer se tvori vodikova vez med pirolnim dušikom in aminokislinskim ostankom Asp81 (Asp73 v primeru bakterije *E. coli*). Na podlagi razrešene kristalne strukture kompleksa med spojino **2** in GyrB24 (slika 11) so ugotovili tudi, da je uvedba 3,4-dikloro substituiranega pirola (spojini **2** in **3**) ugodna za povečanje encimske aktivnosti, saj se s tem povečajo hidrofobne interakcije v adeninskem vezavnem mestu, poleg tega pa elektron akceptorska klorova substituenta znižata pKa pirolne NH skupine in s tem povečata njeno afiniteto do tvorbe vodikove vezi z Asp81. Poleg tega so ugotovili, da uvedba karboksilne skupine na vzhodni del molekule omogoča tvorbo dodatne vodikove vezi z Arg144 (Arg136 v primeru bakterije *E. coli*). Opisana serija spojin je izkazala zelo dobro zaviralno aktivnost na G(+) bakterije (*S. aureus*, *S. pneumoniae* in *E. faecium*), aktivost na G(-) bakterije pa je bila nekoliko slabša. Razlog za to je lahko slabše prehajanje celične stene G(-) bakterij ali prisotnost izlivnih črpalk, kar dokazuje tudi dejstvo, da so bile učinkovine aktivne na sev G(-) bakterij brez izlivnih črpalk. Spojina **3** je bila zaradi dobre encimske aktivnosti in ugodnih fizikalno-kemijskih lastnosti izbrana za nadaljnjo optimizacijo. (6, 15, 16)



**Slika 11:** Prikaz kristalne strukture kompleksa med spojino 2 (slika 10) in GyrB24 iz bakterije *S. aureus*. Vodikove vezi so prikazane kot črne prekinjene črte (prijejeno po 15).

Na sliki 12 so prikazani predstavniki najpomembnejših razredov zaviralcev DNA giraze B, kot so: benzimidazol sečnine (12), pirazoltiazoli (12), imidazo[1,2-a]piridini (12), indazoli (13), aminobenzimidazoli (13), azaindoli (12), pirolamidi (15), piridil sečnine (17), pirolopirimidini (18) in 4,5'-bitiazoli (19).



**Slika 12:** Predstavniki najpomembnejših strukturnih razredov inhibitorjev DNA giraze B; 1: benzimidazol sečnina, 2: pirazoltiazol, 3: imidazo[1,2-a]piridin, 4: indazol, 5: aminobenzimidazol, 6: azaindol, 7: pirolamid, 8: piridil sečnina, 9: pirolopirimidin, 10: 4,5'-bitiazol.

## 2. NAČRT DELA

V okviru magistrske naloge bomo načrtovali in sintetizirali več serij novih, potencialnih zaviralcev DNA giraze B. Posluževali se bomo metod racionalnega načrtovanja, kot izhodišče pa nam bodo služile informacije o odnosu med strukturo in delovanjem, ki smo jih pridobili s študijem v literaturi opisanih zaviralcev DNA giraze B in informacije pridobljene s študijem zaviralcev, ki so jih predhodno pripravili na Fakulteti za farmacijo.

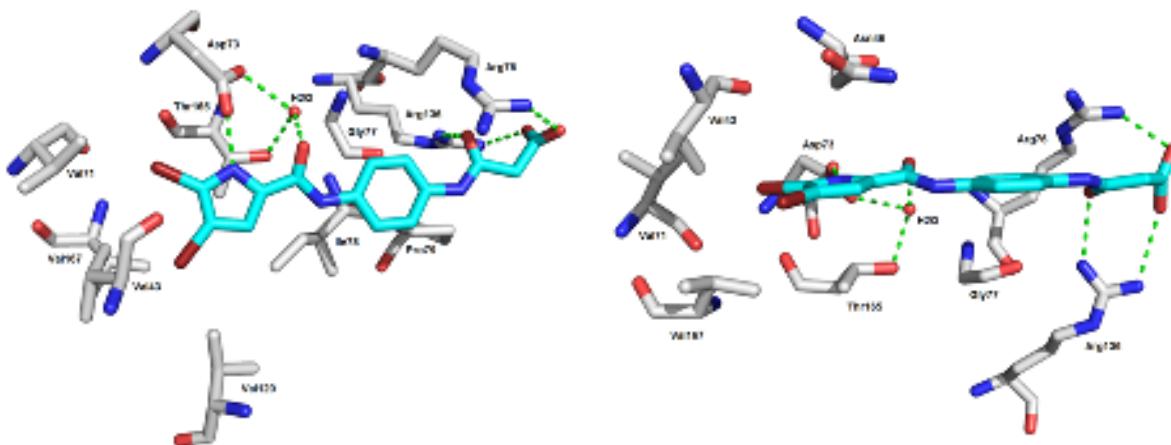
S preučevanjem kristalnih struktur kompleksov znanih zaviralcev GyrB v aktivnem mestu encima (12, 13, 15) smo ugotovili, da je za dobro zaviralno aktivnost zelo pomembna funkcionalna skupina, ki vsebuje zaporedno vezana donor in akceptor vodikove vezi in je sposobna tvoriti mrežo interakcij z Asp73 ter z dobro ohranljeno kristalno molekulo vode v aktivnem mestu (slika 13). Omenjen strukturni vzorec, tj. zaporedna donor in akceptor vodikove vezi, je značilen tudi za adeninski fragment naravnega substrata ATP. Dejstvo, da je vezavna afiniteta naravnega antibiotika klorobiocina večja od vezavne afinitete novobiocina nakazuje na pomen dodatnih hidrofobnih interakcije v adeninskem vezavnem žepu z aminokislinskimi ostanki Val43, Ala47, Val71, Val167, kar bomo poskušali upoštevati tudi pri načrtovanju naših zaviralcev. Problemu morebitne neselektivnosti, tj. delovanju naših spojin tudi na druge tarče, ki imajo vezavno mesto za ATP, se bomo poskušali izogniti z izkorisčanjem interakcij z aminokislinskimi ostanki, ki se nahajajo izven vezavnega mesta za ATP. Ena izmed takšnih potencialnih aminokislin je Arg136, ki je usmerjen proti zunanjemu delu encima, z dodatno vezjo z Arg136 pa bomo dosegli tudi boljšo zaviralno aktivnost.

V okviru magistrskega dela bomo pripravili več serij spojin, ki jim bosta skupen 4,5-dibromo-N-fenil-1*H*-pirol-2-karboksamidni oz. *N*-fenil-1*H*-indol-2-karboksamidni skelet, razlikovale pa se bodo glede na substituente na fenilnem obroču (slika 14). S pirolamidnim in indolamidnim delom bomo poskušali oponašati vezavo adenina v vezavno mesto, saj ta dva obroča, tako kot adenin, vsebujeta zaporedno vezana donor (obročna NH skupina) in akceptor (C=O skupina) H-vezi, kar predstavlja ključen strukturni element dobrih zaviralcev GyrB. Lipofilna bromova substituenta na mestih 4 in 5 pirologega obroča bosta v adeninskem vezavnem žepu tvorila dodatne hidrofobne interakcije, poleg tega pa bo substitucija pirolnega obroča z elektron akceptorskima skupinama povečala kislost pirolne NH skupine, s čimer se bo povečala jakost

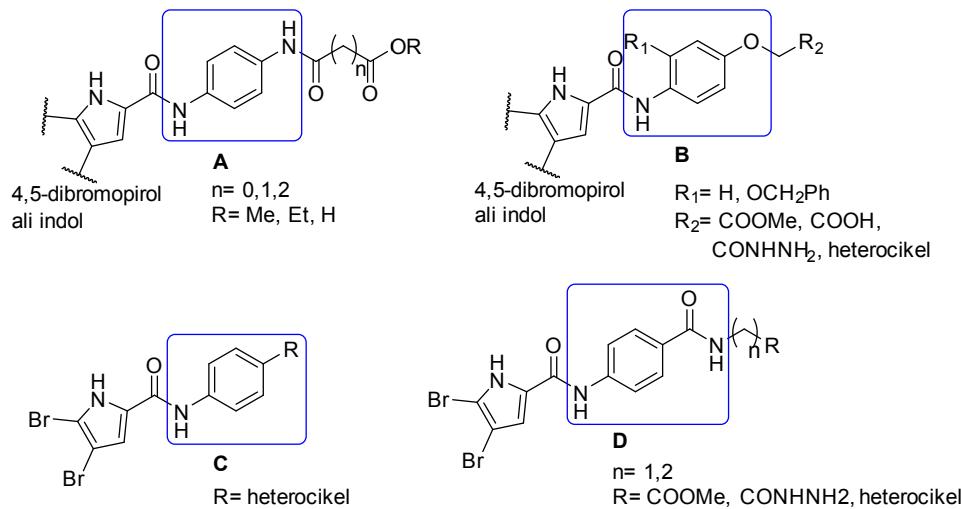
vodikove vezi z Asp73. Z uvedbo večjega indolamidnega substituenta bomo poskušali oceniti velikost hidrofobnega vezavnega žepa in ugotoviti, ali je taka substitucija ugodna za vezavo. Pirolamidnemu oz. indolamidnemu delu bo sledil fenilni obroč, ki ne bo tvoril dodatnih interakcij z aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu, ampak bo služil za pripenjanje substituentov z ustrezno prostorsko razporeditvijo funkcionalnih skupin. Na *para* mesto fenilnega obroča bomo uvedli skupine, ki bodo sposobne tvoriti interakcije z Arg76 ali Arg136, preverili bomo tudi, ali je dodatna substitucija na *ortho* mestu fenilnega obroča z lipofilno skupino ugodna za delovanje. Predvidevamo, da je za tvorbo ionske interakcije z Arg136 ključna kisla skupina, npr. COOH. To predpostavko bomo preizkusili tako, da bomo biološko ovrednotili in primerjali aktivnosti spojin s prosto karboksilno kislino, njihovih metilnih oz. etilnih estrov in spojin z mimetiki karboksilne kisline, kot sta tetrazol in 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol. Poskušali bomo ugotoviti tudi, ali prostorska usmeritev karboksilne skupine vezane na heterociklični obroč vpliva na biološko aktivnost ter optimalno dolžino distančnika med fenilnim obročem in kislo skupino. Vezavo načrtovanih spojin v aktivno mesto GyrB bomo ocenili s programom GOLD verzije 5.2. Slika 13 prikazuje vezavo spojine **6b** v aktivno mesto GyrB iz bakterije E.coli, z zeleno prekinjeno črto so prikazane interakcije, ki so ključne za zaviralno aktivnost.

Spojine, ki jih bomo sintetizirali v okviru magistrske naloge lahko glede na strukturne značilnosti razdelimo v štiri razrede: (i) spojine z benzen-1,4-diaminskim centralnim delom (**A**, slika 14), (ii) spojine z 4-aminofenolnim centralnim delom (**B**, slika 14), (iii) spojine s heterocikličnim substituentom na 4-amino benzenskem obroču (**C**, slika 14) in (iv) spojine z 4-aminobenzamidnim centralnim delom (**D**, slika 14).

Spojine bomo sintetizirali po običajnih kemijskih postopkih, ki jih bomo poskušali optimizirati. Za dokazovanje pravilnosti struktur in čistosti spojin se bomo posluževali uveljavljenih analiznih metod (jedrska magnetna resonanca, masna spektroskopija, infrardeča spektroskopija, tekočinska kromatografija visoke ločljivosti itd.). Spojine bomo biološko ovrednotili s pomočjo encimskih in biofizikalnih (površinska plazmonska resonanca) testov, najbolj obetavnim spojinam pa bomo določili tudi protibakterijsko aktivnost. Na podlagi rezultatov bioloških testov bomo analizirali odnos med strukturo in delovanjem (SAR).



**Slika 13.** S programom GOLD napovedana, najbolje ocenjena konformacija spojine **6b** (v sinje modrem) v vezavnem mestu GyrB iz bakterije *E. coli* (PDB koda: 4DUH) (19), prikazana v dveh orientacijah zasukanih za 90 stopinj. Spojina **6b** in pomembnejši aminokislinski ostanki v vezavnem mestu so prikazani kot palični modeli, v barvah, ki ustrezajo tipu atomov ( $C_{6b}$  v sinje modrem,  $C_{GyrB}$  v sivem, N v modrem, O v rdečem in Br v rjavem). Kristalne voda je prikazana kot rdeča krogla. Predpostavljene vodikove vezi med spojino **6b**, aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu in kristalno vodo so prikazane kot zelene prekinjene črte.



**Slika 14:** Štirje strukturni razredi načrtovanih 4,5-dibromo-*N*-fenil-1*H*-pirol-2-karboksamidnih in *N*-fenil-1*H*-indol-2-karboksamidnih ATP kompetitivnih zaviralcev GyrB.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. REAGENTI IN TOPILA

Uporabljali smo reagente in topila priozvajalcev Acros Organics, Sigma-Aldrich, Merck in Apollo Scientific.

#### 3.2. KROMATOGRAFSKE METODE

Tankoplastna kromatografija (TLC): Uporabljali smo plošče Merck Kieselgel 60 F<sub>254</sub> z 0.20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko ( $\lambda = 254$  nm) in orositvene reagente.

Kolonska kromatografija: uporabljali smo silikagel proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,063-0, 20 mm. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko ( $\lambda=254$  nm) in orositvene reagente.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC): HPLC kromatograme smo posneli na instrumentu Agilent Technologies HP 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Uporabili smo kolono Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 (4.6 mm  $\times$  150 mm), volumen injiciranja 10  $\mu\text{L}$  in pretok 1.0 mL/min. Kot mobilno fazo smo uporabili mešanico 0.1% vodno raztopino trifluoroocetne kisline (topilo A) in acetonitrila ali metanola (topilo B).

#### 3.3. SPEKTROSKOPSKE METODE

Infrardeča (IR) spektroskopija: IR spektre smo posneli na spektrofotometru Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

Jedrska magnetna resonanca (NMR): NMR spektre so posneli na spektrometu Brucker Avance III 400MHz s TMS kot internim standardom na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Kot topila smo uporabljali DMSO- $d_6$  in CDCl<sub>3</sub>. Spektre smo analizirali s pomočjo programa MestRec 4.7.0.0.

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

### 3.4. DOLOČEVANJE TALIŠČA

Tališča smo določili na mikroskopu Leica z ogrevalno mizico in so nekorigirana.

### 3.5. RISANJE SPOJIN IN NOMENKLATURA

Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabili program ChemBioDraw Ultra 13.0 proizvajalca CambridgeSoft.

### 3.6. SIDRANJE SPOJIN V AKTIVNO MESTO DNA GIRAZE B

Priprava proteinov in ligandov: Sidranje spojin v ATP-vezavne mesto GyrB smo izvedli na računalniku s štirimi dvojedrnimi procesorji Opteron, s 16 GB RAM-a in 1.2 TB trdega diska ter z osnovnim operacijskim sistemom Fedora 7 na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Tridimenzionalne modele spojin smo generirali in energetsko minimizirali s programom ChemBioOffice Ultra 13.0.

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

Sidranje spojin: Vsak ligand smo sidrali v 100 neodvisnih ponovitvah. Uporabili smo parametre GA, ki jih je predlagal program GOLD 5.2. Uporabili smo cenilno funkcijo GOLDscore. Najboljših deset rešitev sidranja smo vizualno pregledali, za dodatno analizo in predstavitev pa smo uporabili najbolje ocenjeno konformacijo. Grafični prikaz rezultatov sidranja nekaterih spojin smo pripravili s programom PyMOL 1.5 (DeLano Scientific).

### 3.7. ENCIMSKI TESTI IN DOLOČANJE IC<sub>50</sub>

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

Spojine so bile biološko ovrednotene tako, da jim je bila določena rezidualna aktivnost (RA), t.j. razmerje med aktivnostjo encima ob dodatku zaviralca in v njegovi odsotnosti pri 100 µM koncentraciji zaviralca, za bolj aktivne spojine (RA < 10%) pa tudi srednja zaviralna

koncentracija ( $IC_{50}$ ), t.j. koncentracija zaviralca, ki povzroči 50% inhibicijo encima. Vsem spojinam je bila določena aktivnost na encimu DNA giraze iz bakterije *E. coli*, bolj obetavnim spojinam iz vsake serije pa tudi aktivnost na encimu DNA giraze iz bakterije *S. aureus* in na encimih topoizomeraze IV iz bakterij *E. coli* ter *S. aureus*. Za testiranje so bile uporabljene mikrotitrskne plošče s streptavidinom in testni komplet proizvajalca Inspiralis. Vrednosti  $IC_{50}$  so bile izračunane s programom GraphPad Prism. (19)

### **3.8. DOLOČANJE PROTIBAKTERIJSKE AKTIVNOSTI**

Najbolj obetavnim spojinam, izbranim na podlagi rezultatov encimskih testov, so na Univerzi v Helsinkih na Finskem in v podjetju Fidelta v Zagrebu določili protibakterijsko aktivnost.

Za testiranje so uporabljali klinično nadzorovane seve *Enterococcus faecalis* (Gram-pozitiven, ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitiven, ATCC 25923), *Escherichia coli* (Gram-negativna, ATCC 25922; 3 sevi: wt,  $\Delta tolC$ ,  $\Delta impA$ ) in *Pseudomonas aeruginosa* (Gram-negativna; ATCC 27853). Bakterijske seve so gojili na Mueller Hinton II agarju (MHA, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) in na Mueller Hinton II tekočem gojišču (MHB, Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA). Protimikrobni testi so bili izvedeni z metodo mikrodilucije bujona v skladu s smernicami CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) in EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Protibakterijska aktivnost je bila določena s primerjavo absorbanc vzorcev (pri 0, 4, 24 h) in kontrol pri 620 nm in je izražena v odstotkih zaviranja rasti. Za pozitivno kontollo so na vsaki testni plošči uporabili referenčni antibiotik ciprofloksacin, MIK<sub>50</sub> za *E. coli* je <0.015 µg/mL, MIK<sub>90</sub> za *E. coli* je 0.016 µg/ml, za *S. aureus* 0.51 µg/ml, za *E. faecalis* 1 µg/ml in za *P. aeruginosa* 1 µg/ml. Spojine so bile testirane pri koncentraciji 50 µM. (20)

### **3.9. DOLOČANJE K<sub>D</sub> S POVRŠINSKO PLAZMONSKO RESONANCO (SPR)**

SPR meritve za spojini **6a** in **18a** je na Biotehniški fakulteti na refraktometru BiacoreX s senzorskim čipom CM5 (Biacore, GE Healthcare) opravil dr. Matjaž Brvar, mag. farm.

Meritve so bile izvedene v pufru HEPES (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0,005% polioksietilen sorbitan - P20). G24 protein je bil imobiliziran na senzorski čip CM5 kovalentno preko amino skupine, nato je sledila aktivacija karboksimetilnih skupin dekstrana s

35 µl NHS/EDC v razmerju 1:1 (7 min pulz). Po aktivaciji so injicirali ligand s koncentracijo 50 µg/ml (razredčen v 10 mM Na-acetatu, pH 4.5) v dveh kratkih pulzih in prišlo je do tvorbe elektrostatskih interakcij in kovalentnih vezi. Odziv je posledica kovalentno in nekovalentno vezanega liganda. Sledilo je spiranje nekovalentno vezanega liganda in deaktivacija nezreagiranih NHS estrov s 35 µl 1 M raztopine etanolaminijevega klorida (7 minutni pulz). Pri tem se je SPR signal povečal zaradi spremembe refraktivnega indeksa. Vzorci so bili raztopljeni v DMSO in pred vbrizganjem redčeni s pufrom. Injiciranje je potekalo pri hitrosti 30 µL/min in je trajalo 90 s. Zatem je bil dotok analita prekinjen, pretočno celico so 120 s spirali samo s pufrom in prišlo je do disociacije kompleksa.

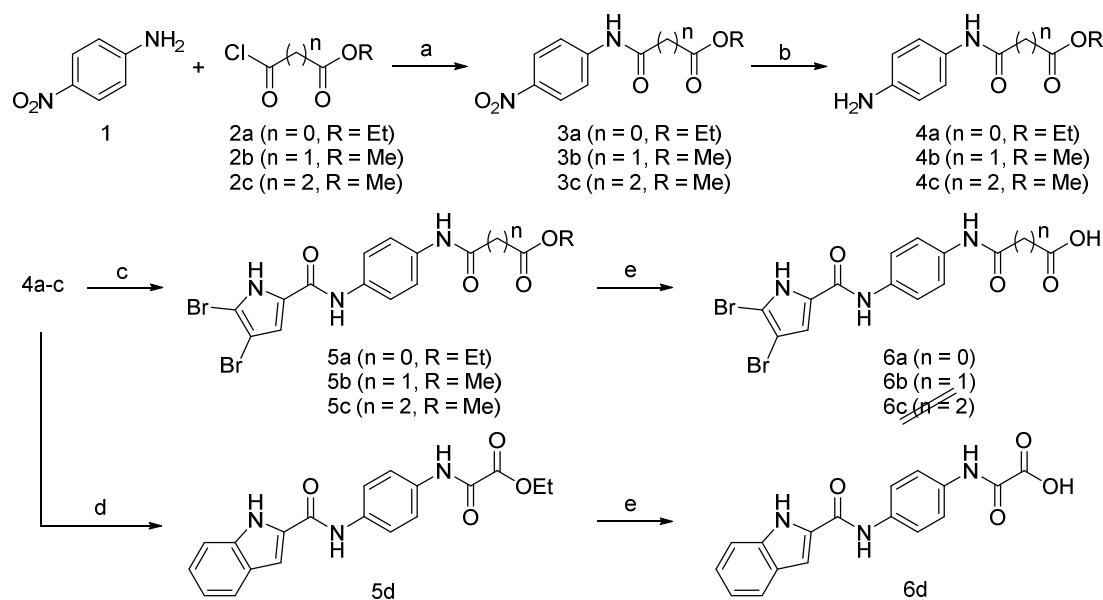
Obe spojini sta bili testirani pri vsaj 8 koncentracijah (odvisno od topnosti) v treh vzporednih titracijah. Nekaj koncentracij je bilo vbrizganih večkrat, da se je dokazala ponovljivost vezave. Rezultate meritve - senzorgrame so analizirali s programom BiaEval (Biacore, GE Healthcare). Ravnovesni vezavni odzivi so bili določeni 5 s pred koncem injiciranja, disociacijske konstante ( $K_d$ ) pa s prileganjem matematičnemu modelu. (19)

## 4. EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1. REAKCIJSKE SHEME

Na shemi 1 je predstavljena sinteza 4,5-dibromo-2-karboksamido-fenilamidov in indol-2-karboksamido-fenilamidov **6a-d**. V prvi stopnji smo na 4-nitroanilin (**1**) v prisotnosti kalijevega karbonata pripeli etil oksalil klorid (**2a**), metil malonil klorid (**2b**), ali metil sukcinil klorid (**2c**). Aromatske nitro skupine spojin **3a-c** smo s katalitskim hidrogeniranjem reducirali do amino skupin in nato na spojine **4a-c** s sklopitvenim reagentom TBTU pripeli 4,5-dibromopirol-2-karboksilno kislino ali indol-2-karboksilno kislino, da smo dobili spojne **5a-d**. V zadnji stopnji smo metilne oz. etilne estre spojin **5a-d** hidrolizirali do karboksilnih kislin v prisotnosti vodne raztopine litijevega hidroksida in dobili končne spojine **6a-b** in **6d**.

**Shema 1.** Sinteza spojin z benzen-1,4-diaminskim centralnim delom.

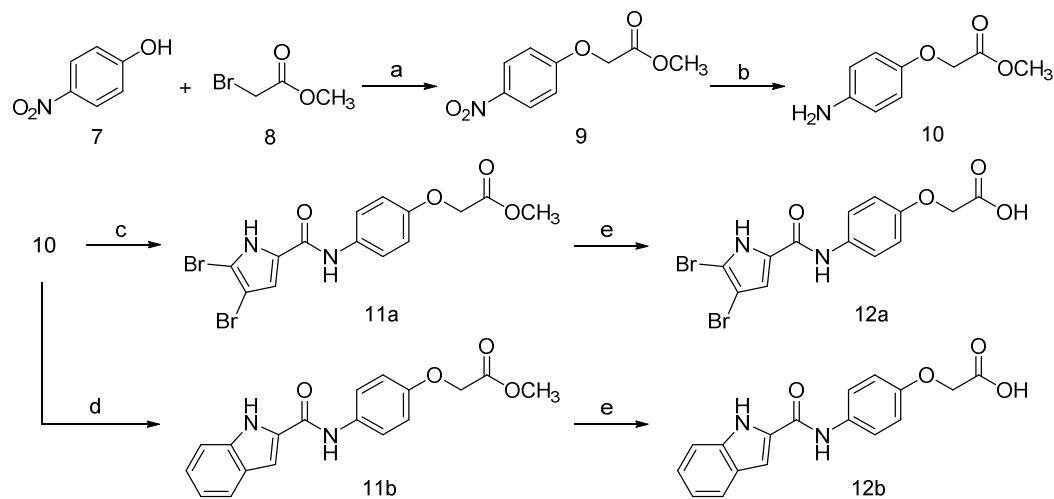


Reagenti in pogoji: (a)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , nato sobna T, 16 h; (b)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd/C}$ ,  $\text{THF}$ , sobna T, 3 h; (c) 4,5-Dibromo-pirol-2-karboksilna kislina, TBTU, *N*-metilmorfolin, DKM,  $50^\circ\text{C}$ , 16 h; (d) Indol-2-karboksilna kislina, TBTU, *N*-metilmorfolin, DKM,  $40^\circ\text{C}$ , 16 h; (e)  $\text{LiOH}$ , sobna T, 16 h.

Sinteza (2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)fenoksi)ocetne kisline (**12a**) in (2-(4-indol-2-karboksamido)fenoksi)ocetne kisline (**12b**) je prikazana na shemi 2. Najprej smo 4-nitrofenol (**7**) alkilirali z metil 2-bromoacetatom (**8**) v prisotnosti kalijevega karbonata, da smo dobili spojino **9**. V naslednji stopnji smo s katalitskim hidrogeniranjem reducirali

aromatsko nitro skupino spojine **9** do amino skupine (spojava **10**). Nato smo s sklopitvenim reagentom TBTU tvorili amid s 4,5-dibromopirol-2-karboksilno kislino oz. indol-2-karboksilno kislino, in tako dobili spojni **11a** in **11b**. Metilne estre spojin **11a-b** smo hidrolizirali do karboksilnih kislin v prisotnosti vodne raztopine litijevega hidroksida in dobili končni spojni **12a** in **12b**.

**Shema 2.** Sinteza spojin s 4-aminofenolnim centralnim delom.

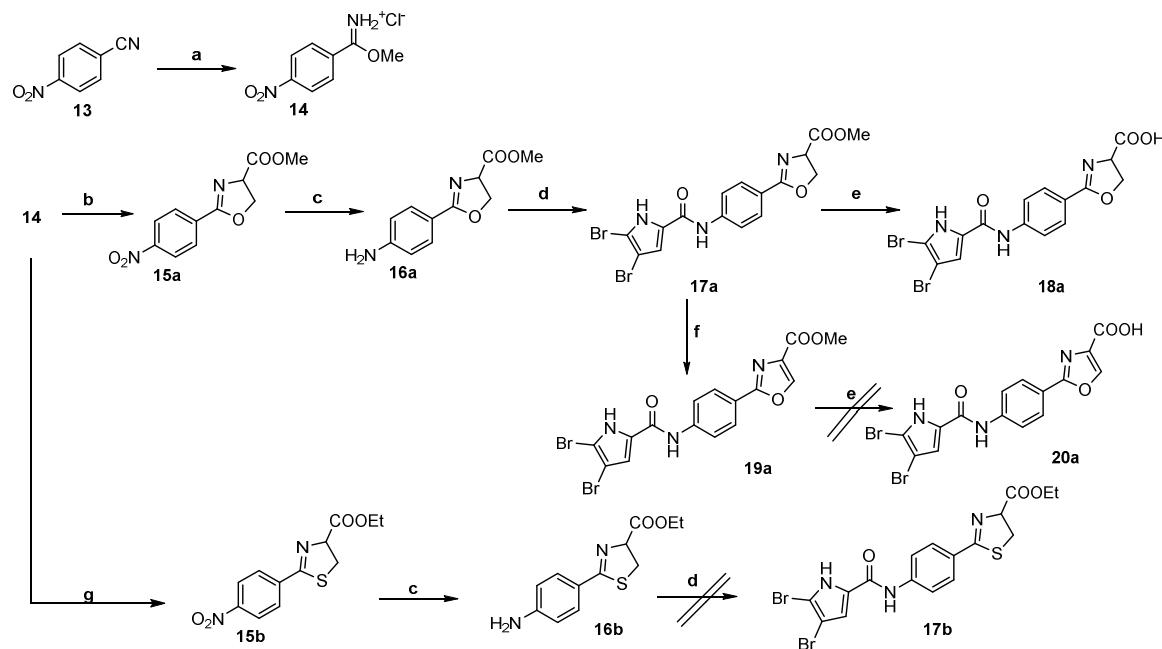


Reagenti in pogoji: (a)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , sobna T, 16 h; (b)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd/C}$ ,  $\text{THF}$ , sobna T, 3 h; (c) 4,5-Dibromo-pirol-2-karboksilna kislina, TBTU, N-metilmorfolin, DKM, 50 °C, 16 h; (d) Indol-2-karboksilna kislina, TBTU, N-metilmorfolin, DKM, 40 °C, 16 h; (e)  $\text{LiOH}$ , sobna T, 16 h.

Shema 3 prikazuje sintezo spojin s 4,5-dihidrooksazolnim in 4,5-dihidrotiazolnim heterocikličnim substituentom na 4-aminobenzenskem obroču. V prvi stopnji smo iz 4-nitrobenzonitrila (**13**) s prepihovanjem s  $\text{HCl}$  tvorili ustrezeno  $\text{HCl}$  sol iminoestra **14**, na katero smo zatem v prisotnosti trietilamina pripeli metilni ester L-serina ali etilni ester L-cisteina, da smo dobili spojini **15a** in **15b**. Aromatske nitro skupine spojin **15a** in **15b** smo s katalitskim hidrogeniranjem reducirali do amino skupin in na tako pripravljeni spojini **16a** in **16b** s sklopitvenim reagentom TBTU poskušali pripeti 4,5-dibromopirol-2-karboksilno kislino. Reakcijo smo uspešno izvedli v primeru spojine **16a** in tako dobili spojino **17a**, spojine **17b** pa nam ni uspelo sintetizirati. V končni stopnji smo metilni ester spojine **17a** hidrolizirali do karboksilne kisline v prisotnosti vodne raztopine litijevega hidroksida in dobili končno spojino **18a**. Iz spojine **17a** smo z oksidantom bromotiklorometanom v pristonosti katalizatorja DBU

pripravili še spojino **19a**. Metilno estrsko skupino spojine **19a** smo v nadaljevanju žeeli hidrolizirati, a nam zaradi majhne količine izhodne spojine produkta **20a** ni uspelo izolirati.

**Shema 3.** Sinteza spojin s 4,5-dihidrooksazolnim in 4,5-dihidrotiazolnim heterocikličnim substituentom na 4-aminobenzenskem obroču.

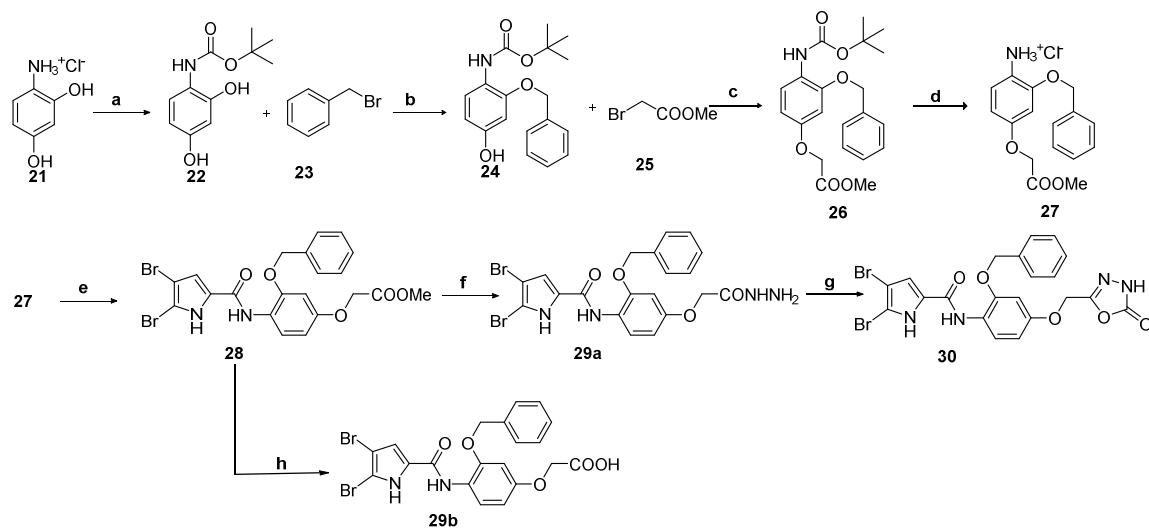


Reagenti in pogoji: (a)  $\text{HCl}_{(\text{g})}$ ,  $\text{MeOAc}:\text{MeOH}=10/1$ ,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 30 min, nato sobna T, 48 h; (b)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{HCl}$  sol metilnega estra L-serina, DKM, sobna T, 48 h; (c)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd/C}$ , THF, sobna T, 3 h; (d) 4,5-Dibromo-pirol-2-karboksilna kislina, TBTU, N-metilmorfolin, DKM,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 16 h; (e)  $\text{LiOH}$ , sobna T, 16 h; (f) DBU,  $\text{BrCCl}_3$ , DKM,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 16 h; (g)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{HCl}$  sol etilnega estra L-cisteina, DKM, sobna T, 48 h.

Sinteza spojin s 4-aminobenzenskim centralnim delom in dodatno substitucijo na *ortho* mestu je prikazana na shemi 4. V prvi stopnji smo prosto amino skupino  $\text{HCl}$  soli 4-aminoresorcinola (**21**) zaščitili z Boc anhidridom v prisotnosti trietylamina. Dobljeno spojino **22** smo alkilirali z benzilbromidom v prisotnosti kalijevega karbonata, da smo dobili spojino **24**. Slednjo smo pod enakimi pogoji alkilirali še z broamoacetatom, da smo dobili spojino **26**. Boc anhidridno zaščito amino skupine smo odstranili s prepihovanjem s  $\text{HCl}_{(\text{g})}$ , nato pa smo na dobljeno spojino **27** v prisotnosti sklopitvenega reagenta TBTU pripeli 4,5-dibromopirol-2-karboksilno kislino in tako dobili spojino **28**. Slednjo smo hidrolizirali do karboksilne kisline v prisotnosti vodne raztopine litijevega hidroksida in dobili končno spojino **29b**. V zadnjih dveh stopnjah smo iz spojine **28** z reakcijo s hidrazin monohidratom najprej pripravili spojino **29**, nato pa

smo z reagentom karbonildiimidazolom (CDI) tvorili 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolni obroč (spojina **30**).

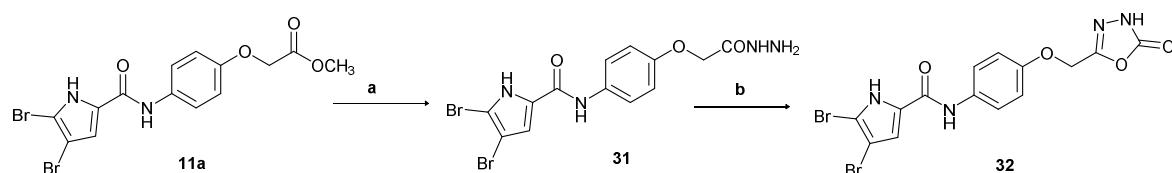
**Shema 4.** Sinteza spojin s 4-aminobenzenskim centralnim delom in dodatno substitucijo na mestu 2.



Reagenti in pogoji: (a)  $\text{Boc}_2\text{O}$ ,  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{MeOH}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , nato sobna T, 16 h; (b)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , nato sobna T, 16 h; (c)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C}$ , nato sobna T, (d)  $\text{HCl}_{(\text{g})}$ , dietileter,  $0\text{ }^\circ\text{C}$  30 min, nato sobna T 16 h; (e) 4,5-Dibromo-pirol-2-karboksilna kislina, TBTU, N-metilmorfolin, DKM,  $50\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 h; (f) hidrazin monohidrat, abs.  $\text{EtOH}$ ,  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 h; (g) CDI, dioksan,  $101\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 h; (h)  $\text{LiOH}$ ,  $\text{THF}$  sobna T, 16 h.

Na shemi 5 je predstavljena sinteza spojine **32**, analoga spojine **11a**, ki namesto proste karboksilne kisline vsebuje 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolni obroč. Spojino **32** smo pripravili iz spojine **11a** v dveh stopnjah; s hidrazin monohidratom smo najprej tvorili hidrazid **31** in ga nato z reagentom karbonildiimidazolom (CDI) pretvorili v spojino **32**.

**Shema 5.** Sinteza analoga spojine **11a** z 1,3,4-oksadiazolnim fragmentom.

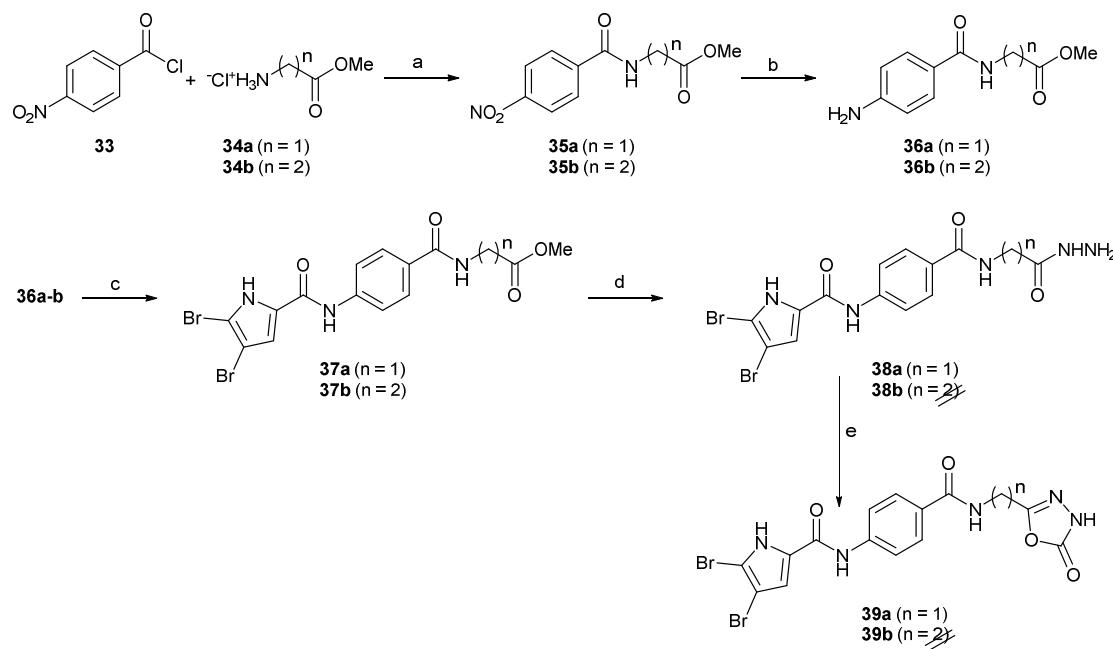


Reagenti in pogoji: (a) hidrazin monohidrat, abs.  $\text{EtOH}$ ,  $80\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 h; (b) CDI, dioksan,  $101\text{ }^\circ\text{C}$ , 16 h; (h)  $\text{LiOH}$ , sobna T, 16 h.

Shema 6 prikazuje sintezo 4,5-dibromopirol-benzamidov **37a-b** in njihovih analogov s 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolnim fragmentom. V prvi stopnji smo na 4-nitrobenzoil klorid (**33**) v prisotnosti kalijevega karbonata pripeli  $\text{HCl}$  sol glicina ali metilnega estra  $\beta$ -

alanina (**34a** ali **34b**) in tako dobili spojini **35a-b**. Po redukciji aromatskih nitro skupin smo na spojini **36a-b** preko amidne vezi pripeli 4,5-dibromopirol-2-karboksilno kislino v prisotnosti sklopitvenega reagenta TBTU in dobili spojni **37a-b**. V naslednji stopnji smo iz spojin **37a-b** z reakcijo s hidrazin monohidratom poskušali pripraviti hidrazida **38a-b**. Sintetizirati smo uspeli le spojino **38a**, na kateri smo v nadaljevanju v reakciji s karbomildiimidazolom (CDI) tvorili 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolni obroč in tako prišli do spojine **39a**.

**Shema 6.** Sinteza spojin z 4- aminobenzamidnim centralnim delom.

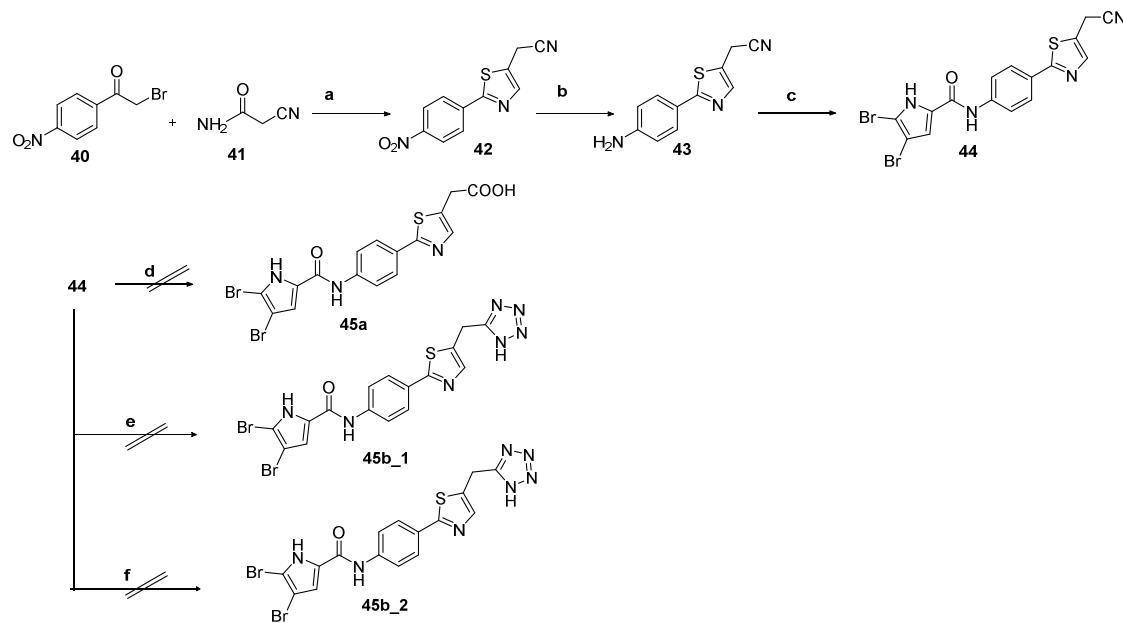


Reagenti in pogoji: (a)  $\text{K}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{CH}_3\text{CN}$ , sobna T, 16 h; (b)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd/C}$ ,  $\text{MeOH}$ , sobna T, 3 h; (c) 4,5-Dibromo-pirol-2-karboksilna kislina, TBTU, N-metilmorfolin, DKM, 50 °C, 16 h; (d) hidrazin monohidrat, abs. $\text{EtOH}$ , 80 °C, 16 h; (e) CDI, dioksan, 101 °C, 16 h.

Sinteza spojin s tiazolnim heterocikličnim substituentom na 4-aminobenzenskem obroču je prikazana na shemi 7. V prvi stopnji smo s pripenjanjem 2-cianotioacetamida (**41**) na 4-nitrofenacilbromid (**40**) tvorili tiazolni derivat **42**. Nitro skupino spojine **42** smo nato reducirali do amino skupine in tako dobili spojino **43**. S pripenjanjem 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karbonil klorida, ki smo ga predhodno pripravili iz 4,5-dibromo-1-*H*-pirol-2-karboksilne kisline in oksalil klorida, smo dobili amid **44**. Ciano skupino spojine **44** smo v nadaljevanju poskušali hidrolizirati z vodno raztopino natrijevega hidroksida do nastanka spojine **45a**, a reakcija ni bila uspešna. Poleg tega smo ciano skupino spojine **44** poskušali pretvoriti tudi v tetrazolni

obroč z natrijevim azidom v prisotnosti aluminijevega triklorida (**45b\_1**) in z natrijevim azidom v prisotnosti trietilamonijevega hidroklorida (**45b\_2**), a reakciji nista bili uspešni.

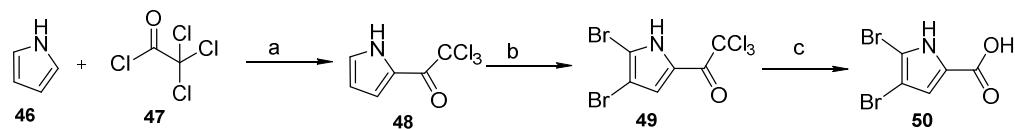
**Shema 7.** Sinteza spojin s tiazolnim heterocikličnim substituentom na 4-aminobenzenskem obroču.



Reagenti in pogoji: (a)  $\text{Et}_3\text{N}$ ,  $\text{EtOH}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , sobna T, 16h; (b)  $\text{H}_2$ ,  $\text{Pd/C}$ ,  $\text{THF}$ , sobna T, 3h; (c) 4,5-Dibromo-pirol-2-karboksilna kislina, oksalilklorid; DKM, piridin, sobna T, 16h; (d)  $\text{LiOH}$ , sobna T, 16h; (e)  $\text{AlCl}_3$ ,  $\text{NaN}_3$ ,  $\text{THF}$ ,  $50^\circ\text{C}$ , 48h; (f)  $\text{Et}_3\text{N}^*\text{HCl}$ ,  $\text{NaN}_3$ , toluen,  $80^\circ\text{C}$ , 48h.

Na shemi 8 je prikazana sinteza 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline (**50**). V prvi stopnji smo na pirol (**46**) v prisotnosti trietylamina pripeli trikloroacetilklorid (**47**) in dobili spojino **48**, iz katere smo z bromiranjem pod inertno atmosfero dobili spojino **49**. V zadnji stopnji smo triklorometilketonsko skupino spojine **49** pod bazičnimi pogoji hidrolizirali do proste karboksilne kisline in tako pripravili spojino **50**.

**Shema 8.** Sinteza 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilne kisline.



Reagenti in pogoji: (a) pirol,  $\text{Et}_3\text{N}$ , inertna atmosfera,  $\text{THF}$ ,  $0^\circ\text{C}$ , nato sobna T, 16h; (b)  $\text{Br}_2$ , inertna atmosfera,  $\text{CHCl}_3$ , sobna T, 16h; (c)  $\text{NaOH}$ ,  $\text{THF}$ , sobna T, 16h.

#### 4.2. SINTEZNI POSTOPKI IN ANALIZNI PODATKI

**Etil 2-((4-nitrofenil)amino)-2-oksoacetat (3a).** 4-Nitroanilin (1, 750 mg, 5.43 mmol) raztopimo v acetonitrilu (50 mL), dodamo kalijev karbonat (1.50 g, 10.87 mmol) in na s pomočjo kapalnika na ledeni kopeli počasi dokapavamo etiloksalilklorid (**2a**, 608 µL, 5.43 mmol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni temperaturi. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etil acetatu (100 mL). Organsko fazo spiramo z vodo (2×30 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (30 mL), sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ter uparimo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije, 82 %; rumeni kristali (1.060g); tališče: 143-145 °C (po literaturi: 144-145°C; (21)); Rf (diklorometan/metanol =20/1): 0.74; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 1.33(t, 3H, J=7.2Hz, CH<sub>3</sub>), 4.31- 4.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 8.04 (d, 2H, J=9.2Hz, Ar-H-2,6), 8.28 (d, 2H, J=9.2Hz, Ar-H-3,5), 11.34 (s, 1H, NH); IR (ATR) ν =3342, 3203, 3126, 3078, 1704, 1599, 1495, 1343, 1297, 1170, 858, 751 cm<sup>-1</sup>.

**Metil 3-((4-nitrofenil)amino)-3-oksopropanoat (3b).** 4-Nitroanilin (1, 0.750 g, 5.43 mmol) raztopimo v acetonitrilu (50 mL), dodamo kalijev karbonat (1.500 g, 10.87 mmol) in s pomočjo kapalnika na ledeni kopeli počasi dokapavamo metil-3-kloro-3-oksopropionat (**2b**, 0.58 mL, 5.43 mmol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni temperaturi. Potek reakcije spremljamo s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC). Dodamo še 291 µL **2b**, bučko opremimo s povratnim hladilnikom in na oljni kopeli 2 dni segrevamo pri temperaturi 40 °C. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etil acetatu (50 mL). Organsko fazo spiramo z vodo (2×20 mL), nasičeno raztopino NaCl (1×20 mL), sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparimo pod znižanim tlakom, nato pa spojino prelijemo z dietiletrom (10 mL). Nastalo suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietiletrom (2 × 5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije: 65%; rumeni kristali (0.846 g); tališče: 148-150 °C (po literaturi: 147-150 °C; (22)); Rf (etil acetat/ petroleter =1/2): 0.48; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) δ 3.57(s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.68 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.83 (d, 2H, J=8.8Hz, Ar-H-2,6), 7.24 (d, 2H, J=8.8Hz, Ar-H-3,5), 10.82 (s, 1H, NH); IR (ATR) ν = 3410, 3331, 3094, 2974, 2950, 1722, 1564, 1507, 1340, 1172, 1089, 751 cm<sup>-1</sup>.

**Metil 4-((4-nitrofenil)amino)-4-oksobutanoat (3c).** 4-Nitroanilin (1, 0.750 g, 5.43 mmol) raztopimo v acetonitrilu (50 mL), dodamo trietilamin (1.51 mL, 10.86 mmol) in s pomočjo

kapalnika na ledeni kopeli počasi dokapavamo metilsukcinilklorid (**2c**, 864 µL, 7.06 mmol). Bučko opremimo s povratnim hladilnikom in na oljni kopeli čez noč segrevamo pri temperaturi 50°C. Potek reakcije spremljamo s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC). Dodamo še 332 µL (2.71 mmol) **2c** in 755 µL (5.43 mmol) trietilamina ter pri enakih pogojih segrevamo še 2 dni. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etil acetatu (50 mL). Organsko fazo spiramo z vodo (3×20 mL), nasičeno raztopino NaCl (2×20 mL), sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparimo pod znižanim tlakom. Spojino očistimo s kristalizacijo iz mešanice metanola in diklorometana. Izkoristek reakcije: 46 %, rumeni kristali (0.630 g); tališče: 140 °C (po literaturi: 140-141 °C; (23)); Rf (etyl acetat/ petroleter =2/1): 0.41; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.61-2.65 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 2.68-2.72 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.83 (d, 2H, *J*=9.2Hz, Ar-H-2,6), 8.22 (d, 2H, *J*=9.2Hz, Ar-H-3,5), 10.64 (s, 1H, NH); IR (ATR) ν = 3344, 3265, 3179, 3126, 3091, 2956, 1694, 1543, 1503, 1336, 1159 cm<sup>-1</sup>.

**Splošni postopek A. Sinteza spojin **4a-4c**, **10**, **16a**, **16b**, **36a**, **36b**, **48** (spojino **4a** smo podali kot primer).** Spojino **3a** (1.00 g, 4.20 mmol) raztopimo v tetrahidrofuranu (50 mL), preprihamo z argonom in dodamo 10% zmes paladija v aktivnem oglju (Pd/C, 200mg). Po dodatku katalizatorja reakcijsko zmes 30 min preprihujemo z vodikom, nato pa na bučko namestimo balon z vodikom in mešamo 3 ure na sobni temperaturi. Potek reakcije spremljamo s tankoplastno kromatografijo (TLC). 10% zmes paladija v aktivnem oglju odfiltriramo in topilo uparimo pod znižanim tlakom.

**Etil 2-((4-aminofenil)amino)-2-oksoacetat (**4a**).** Izkoristek reakcije, 92 %; temnozeleni kristali (0.800 g); tališče: 110-112 °C (po literaturi 110-113 °C; (24)); Rf (diklorometan/metanol =10/1): 0.51; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.30(t, 3H, *J*=7.2Hz, CH<sub>3</sub>), 4.25- 4.31 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.06 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.52 (d, 2H, *J*=8.8Hz, Ar-H-2,6), 7.37 (d, 2H, *J*=8.8Hz, Ar-H-3,5), 10.39 (s, 1H, NH); IR (ATR) ν = 3476, 3317, 3348, 3217, 2981, 2931, 1728, 1672, 1516, 1282, 1177, 824 cm<sup>-1</sup>.

**Metil 3-((4-aminofenil)amino)-3-oksopropanoat (**4b**).** (25) Produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: etil acetat/petroleter= 2/1). Izkoristek reakcije, 58 %; rjavo olje (450 mg); Rf (etyl acetat/petroleter= 2/1): 0.33; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.37(s, 2H, CH<sub>2</sub>, signal se prekriva s signalom za vodo), 3.64 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.91 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.50 (d, 2H, *J*=8.8Hz,

Ar-H-3,5), 7.20 (d, 2H, J=8.8Hz, Ar-H-2,6), 9.76 (s, 1H, NH) (po literaturi (25)) ; IR (ATR)  $\nu$  = 3309, 3136, 3044, 2953, 1732, 1652, 1512, 1431, 1242, 829 cm<sup>-1</sup>.

**Metil 4-((4-aminofenil)amino)-4-oksobutanoat (4c).** (25) Delamo po splošnem postopku A, le da kot topilo uporabimo 96% etanol (50 mL). Izkoristek reakcije: 87 %; rjava trdna snov (420 mg); tališče: 75-77 °C; Rf (diklorometan/metanol= 20/1): 0.22; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  2.54-2.60 (m, 3H, CH<sub>3</sub>, signal se prekriva s signalom za DMSO-*d*<sub>5</sub>), 4.83 (m, 4H, 2 × CH<sub>2</sub>), 4.83 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.48 (d, 2H, J=8.8Hz, Ar-H-3,5), 7.20 (d, 2H, J=8.8Hz, Ar-H-2,6), 9.55 (s, 1H, NH) (po literaturi (25)); IR (ATR)  $\nu$  = 3417, 3297, 3040, 2955, 1730, 1648, 1514, 1160, 823 cm<sup>-1</sup>.

**Splošni postopek B. Sinteza spojin 5a-c, 11a, 17a-b, 28, 37a-b (spojino 5a smo podali kot primer).** 4,5-Dibromo-pirol-2-karboksilno kislino (205 mg, 0,76 mmol), TBTU (267 mg, 0,83 mmol) in *N*-metilmorfolin (229 μL, 2,08 mmol) raztopimo v diklorometanu (20 mL) in mešamo 30 min. Dodamo **4a** (144 mg, 0.69 mmol), bučko opremimo s povratnim hladilnikom in na oljni kopeli segrevamo čez noč na temperaturi 50 °C. Potek reakcije spremljamo s tankoplastno kromatografijo. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etil acetatu (20 mL). Organsko fazo spiramo z vodo (2×10 mL), nasičeno raztopino NaCl (2×10 mL), sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparimo pod znižanim tlakom.

**Etil 2-((4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)fenil)amino)-2-oksoacetat (5a).** Surovi produkt prelijemo z metanolom (10 mL), nastalo suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z metanolom (2 × 5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije, 62 %; sivi kristali (197 mg); tališče: >300 °C; Rf (diklorometan/metanol= 20/1): 0.74; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.32 (t, 3H, J= 7.2Hz, CH<sub>3</sub>), 4.31 (q, 2H, <sup>3</sup>J= 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.24 (d, 1H, J=2.4Hz, pirol-CH), 7.67-7.73 (m, 4H, Ar-H-2,3,5,6), 9.89 (s, 1H, NH), 10.78 (s, 1H, NH), 12.88(s, 1H, pirol-NH); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  13.84 (CH<sub>3</sub>), 62.33(CH<sub>2</sub>), 98.11, 105.86, 113.72, 120.21, 120.84, 127.85, 132.99, 135.45, 155.24, 157.18, 160.73; IR (ATR)  $\nu$  = 3366, 3303, 3105, 2984, 1691, 1644, 1556, 1519, 1413, 1371, 1320, 1219, 1185, 819 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z* (%) = 455.9 ([M-H]<sup>-</sup>). HRMS za C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>: izračunan 455.9195; izmerjen 455.9193; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5 μm C18 (4.6 mm × 150 mm);

mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10 µL; retencijski čas: 10.560 min (95.7% pri 280 nm).

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

Delamo po splošnem postopku A, le da reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni temperaturi in produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/methanol= 10/1). Izkoristek reakcije: 15 %; rumeni kristali (38 mg); tališče: 220-222 °C; Rf (diklorometan/metanol= 20/1): 0.35;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  3.47 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 3.66 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.22 (d, 1H, J=2.8Hz, pirol-CH), 7.54 (d, 2H, J=9.2Hz, Ar-H), 7.64 (d, 2H, J=9.2Hz, Ar-H), 9.84 (s, 1H, NH), 10.18 (s, 1H, NH), 12.91(s, 1H, pirol-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  43.36 (CH<sub>2</sub>), 51.95 (CH<sub>3</sub>), 98.08, 105.71, 113.60, 119.41, 120.43, 127.93, 134.38, 134.45, 157.11, 163.69, 168.17; IR (ATR)  $\nu$  = 3497, 3304, 3154, 3082, 2957, 2895, 1731, 1645, 1618, 1528, 1403, 1348, 1235, 1169, 967, 828 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 455.9 ([M-H]<sup>-</sup>). HRMS za C<sub>15</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>: izračunan 455.9195; izmerjen 455.9191; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5 µm C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 10–90% MeOH v TFA (0.1%) v 20 min, 90% MeOH do 25 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10 µL; retencijski čas: 18.744 min (99.0% pri 280 nm).

**Metil 4-((4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)fenil)amino)-4-oksobutanoat (5c).**

Surovi produkt prelijemo z dietiletrom (5 mL), nastalo suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietiletrom (2 × 5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije, 51%; rjavi kristali (122 mg); tališče: 255-258 °C; Rf (etyl acetat/petroleter= 1/1): 0.28;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  2.60 (s, 4H, 2×CH<sub>2</sub>), 3.61 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.21 (s, 1H, pirol-H), 7.54 (d, 2H, J=8.8Hz, Ar-H), 7.61 (d, 2H, J=8.8Hz, Ar-H), 9.81 (s, 1H, NH), 9.98 (s, 1H, NH), 12.88, (s, 1H, 1'-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  28.46 (CH<sub>2</sub>), 30.71 (CH<sub>2</sub>), 51.34 (CH<sub>3</sub>), 98.06, 105.63, 113.53, 119.20, 120.40, 127.97, 133.87, 134.95, 157.06, 169.48, 172.87; IR (ATR)  $\nu$  = 3328, 3114, 2947, 1712, 1638, 1557, 1541, 1408, 1327, 1208, 1150, 1102, 983, 823, 751 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 469.9 ([M-H]<sup>-</sup>). HRMS za C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>: izračunan 469.9343; izmerjen 469.9342; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5 µm C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10 µL; retencijski čas: 9.357 min (98.7% pri 280 nm).

**Spolšni postopek C. Sinteza spojin 5d in 11b (spojino 5d smo podali kot primer).** Indol-2-karboksilno kislino (128 mg, 0,79 mmol), TBTU (278 mg, 0,87 mmol) in *N*-metilmorfolin (238 ml, 2,16 mmol) raztopimo v diklorometanu (20 mL) in mešamo 30 min. Dodamo **4a** (150 mg, 0,83 mmol), bučko opremimo s povratnim hladilnikom in na oljni kopeli na temperaturi 40 °C segrevamo čez noč. Potek reakcije spremljamo s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC). Topilo uparimo pod znižanim tlakom, preostanek prelijemo z vodo, oborino odfiltriramo in 2 uri sušimo v sušilniku na temperaturi 50 °C. Surov produkt prelijemo z dietiletrom (10 mL), nastalo suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietiletrom (2 × 5 mL) in posušimo.

**Etil 2-((4-(1*H*-indol-2-karboksamido)fenil)amino)-2-oksoacetat (5d).** Izkoristek reakcije: 75%, sivi kristali (190 mg); tališče: 286-286 °C; Rf (diklorometan/metanol =20/1): 0.50; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.33 (t, 3H, J=7.2Hz, CH<sub>3</sub>), 4.32 (q, 2H, J= 7.2 Hz, CH<sub>2</sub>), 7.06-7.10 (m, 1H, indol-H-5/6), 7.21-7.25 (m, 1H, indol-H-5/6), 7.42 (d, 1H, J= 1.2Hz, indol-H-3), 7.74 (d, 1H, J= 8.4 Hz, indol-H-4/7), 7.69 (d, 2H, J=8.4 Hz, indol-H-4/7), 7.73-7.81 (m, 4H, Ar-H), 10.26 (s, 1H, NH), 10.80 (s, 1H, NH), 11.76(s, 1H, 1'-NH); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 13.85 (CH<sub>3</sub>), 62.34 (CH<sub>2</sub>), 103.78, 112.36, 119, 89, 120.39, 120.84, 121.71, 123.75, 126.99, 131.40, 133.05, 135.62, 136.78, 155.26, 159.58, 160.74; IR (ATR) ν = 3470, 3373, 3338, 3323, 1688, 1643, 1526, 1410, 1292, 1242, 1182, 1024, 823, 738 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z* (%) = 352.1 ([M-H]<sup>+</sup>). HRMS za C<sub>19</sub>H<sub>18</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: izračunan 352.1297; izmerjen 352.1288; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5 μm C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μL; retencijski čas: 10.034 min (97.8% pri 280 nm).

**Spolšni postopek D. Sinteza spojin 6a-d, 12a-b, 18a, 20a, 31, 50a (spojino 6b smo podali kot primer).** 5b (20 mg, 0.04 mmol) raztopimo v tetrahidrofurancu (20 mL), dodamo 45 μL 2M LiOH (0,06 mmol) in mešamo čez noč pri sobni temperaturi. Potek reakcije spremljamo s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC). Reakcijsko zmes nakisamo do pH=3, topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etil acetatu (10 mL). Organsko fazo spiramo z vodo (3×10 mL), nasičeno raztopino NaCl (2×10 mL), sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparimo pod znižanim tlakom.

**(2-((4,5-Dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)fenil)amino)-2-oksoacetna kislina (6a).** Delamo po splošnem postopku D, le da ne izvajamo ekstrakcije, ampak izpadlo oborino odfiltriramo in posušimo. Izkoristek reakcije, 57%; sivi kristali (70 mg); tališče >300 °C; Rf (diklorometan/metanol/ocetna kislina =20/1/0,01): 0.04;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  7.25(d, 1H,  $J= 2.8\text{Hz}$ , pirol-CH) 7.66-7.75 (m, 4H, Ar-H-2,3,5,6), 9.83 (s, 1H, NH), 10.71 (s, 1H, NH), 12.92(s, 1H, pirol-NH), 14.10 (s, 1H, COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  98.10, 105.83, 113.69, 120.20, 120.64, 127.87, 133.23, 135.26, 156.57, 157.17, 162.17; IR (ATR)  $\nu =$  3423, 3249, 1754, 1665, 1561, 1515, 1414, 1333, 1311, 1224, 1164, 976, 83, 739  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 427.9 ([M-H] $^-$ ). HRMS za  $\text{C}_{13}\text{H}_8\text{N}_3\text{O}_4\text{Br}_2$ : izračunan 427.8882; izmerjen 427.8870; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 (4.6 mm  $\times$  150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10  $\mu\text{L}$ ; retencijski čas: 7.574 min (99.0% at 280 nm).

**3-((4-(4,5-Dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)fenil)amino)-3-oksopropanojska kislina (6b).** Izkoristek reakcije, 72 %; beli kristali (14 mg); tališče: 280-282°C; Rf (diklorometan/metanol/ocetna kislina =10/1/0,01): 0.26;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  3.36 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ , signal se prekriva s signalom za vodo), 7.21 (s, 1H, pirol-CH), 7.55 (d, 2H,  $J=8.8\text{Hz}$ , Ar-H), 7.64 (d, 2H,  $J=8.8\text{Hz}$ , Ar-H), 9.84 (s, 1H, NH), 10.13 (s, 1H, NH), 12.65 (s, 1H, COOH), 12.90(s, 1H, pirol-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  43.87 ( $\text{CH}_2$ ), 98.07, 105.70, 113.58, 119.34, 120.42, 127.95, 134.25, 134.63, 157.10, 164.31, 169.31; IR (ATR)  $\nu =$  3379, 3291, 3169, 3113, 2973, 2614, 2517, 1707, 1562, 1516, 1415, 1241, 1212, 826  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 441.9 ([M-H] $^-$ ). HRMS za  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_3\text{O}_4\text{Br}_2$ : izračunan 441.9038; izmerjen 441.9029; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 (4.6 mm  $\times$  150 mm); mobilna faza: 10–90% MeOH v TFA (0.1%) v 20 min, 90% MeOH do 25 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10  $\mu\text{L}$ ; retencijski čas: 17.965 min (98.1% at 280 nm).

**Poskus sinteze metil 4-((4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)fenil)amino)-4-oksoobutanojske kisline (6c).** Reakcijo izvajamo v skladu s splošnim postopkom D. Suhi preostanek po ekstrakciji analiziramo s pomočjo  $^1\text{H}$ -NMR in ugotovimo, da pri reakciji ni nastal želen produkt.

**(2-((4-(1*H*-indol-2-karboksamido)fenil)amino)-2-oksoacetna kislina) (6d).** Delamo po splošnem postopku D, le da ne izvajamo ekstrakcije, ampak izpadlo oborino odfiltriramo in posušimo. Izkoristek reakcije, 66%; sivi kristali (64 mg); tališče: >300 °C; Rf (diklorometan/metanol/ocetna kislina =20/1/0,01): 0.04; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 7.06-7.10 (m, 1H, indol-H-5/6), 7.21-7.25 (m, 1H, indol-H-5/6), 7.42 (d, 1H, *J*= 1.6Hz, Ar-H-3), 7.47 (d, 1H, *J*= 8.0 Hz, indol-H-4/7), 7.68 (d, 2H, *J*=8.0 Hz, indol-H-4/7), 7.77(s, 4H, Ar-H), 10.25 (s, 1H, NH), 10.73 (s, 1H, NH), 11.76 (s, 1H, 1'-NH), 14.03 (s, 1H, COOH); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 103.75, 112.35, 119.89, 120.38, 120.65, 121.71, 123.74, 126.99, 131.41, 133.28, 135.45, 136.77, 156.54, 159.57, 162.18; IR (ATR) ν = 3399, 3339, 3306, 3176, 3112, 1685, 1650, 1541, 1312, 1235, 830, 741 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z* (%) = 322.1 ([M-H]<sup>-</sup>). HRMS za C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: izračunan 322.0828; izmerjen 322.0819; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5 μm C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μL; retencijski čas: 6.932 min (98.0% at 280 nm).

**Metil 2-(4-nitrofenoksi)acetat (9).** 4-Nitrofenol (7, 1.50 g, 11.0 mmol) raztopimo v acetonitrilu (50 mL), dodamo kalijev karbonat (1.52 g, 11.0 mmol) in s pomočjo kapalnika počasi dokapavamo metilbromoacetat (8, 1.045 mL, 11.0 mmol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni temperaturi. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etil acetatu (100 mL). Organsko fazo spiramo z vodo (2×20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (20 mL), sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparimo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije, 80 %; beli kristali (2.115 g); tališče: 98-100 °C (po literaturi: 98-99 °C, (26)); Rf (diklorometan/metanol=10/1), 0.84; <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.72(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.02 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.12 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz, Ar-H-2, 6), 8.21 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz, Ar-H-3,5); IR (ATR) ν = 3402, 3313, 3116, 2956, 1756, 1722, 1610, 1592, 1498, 1436, 1330, 1198, 1173, 1110, 1000, 856, 752 cm<sup>-1</sup>.

**Metil 2-(4-aminofenoksi)acetat (10).** Delamo po splošnem postopku A. Izkoristek reakcije, 96%; rumeno olje (1.734 g); tališče: 215-217°C (po literaturi: 216-218°C; (27)); Rf (diklorometan/metanol=10/1): 0.29; <sup>1</sup>H-NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>): δ 3.68(s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.60 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.68 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.49-6.51(m, 2H, Ar-H-2,6), 6.65 (d, 2H, *J* = 9.2 Hz, Ar-H-3, 5); IR(ATR) ν = 3456, 3434, 3359, 3046, 2953, 2922, 2856, 1748, 1509, 1440, 1214, 826cm<sup>-1</sup>.

**Metil 2-(4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)fenoksi)acetat (11a).** Delamo po splošnem postopku B. Izkoristek reakcije, 46%; svetlorjavi kristali (165 mg); tališče: 190-192 °C; Rf (etyl acetat/ petroleter= 1/2), 0.42; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.78 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.92- 6.94 (m, 2H, Ar-H-2,6), 7.19 (s, 1H, pirol-CH), 7.60 (d, 2H, J=9.2Hz, Ar-H-3,5), 9.77 (s, 1H, NH), 12.88 (s, 1H, pirol-NH); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 51.77 (CH<sub>3</sub>), 64.71 (CH<sub>2</sub>), 98.03, 105.55, 113.44, 114.55, 121.49, 127.97, 132.38, 153.67, 157.07, 169.29; IR (ATR) ν = 3388, 3300, 3204, 2955, 2852, 1757, 1730, 1650, 1553, 1525, 1509, 1417, 1389, 1223, 1177, 1078, 973, 820, 750 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z* (%) = 428.9 ([M-H]<sup>+</sup>). HRMS za C<sub>14</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>: izračunan 428.9086; izmerjen 428.9088; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5 μm C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 10–90% MeOH v TFA (0.1%) v 20 min, 90% MeOH do 25 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μL; retencijski čas: 19.554 min (98.6% at 280 nm).

**Metil 2-(4-(1H-indol-2-karboksamido)fenoksi)acetat (11b).** Delamo po splošnem postopku C. Izkoristek reakcije, 81%; rumeni kristali (218 mg); tališče: 205-207 °C; Rf (etyl acetat/ petroleter=2/1): 0.58; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.71 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.79 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.96 (d, 2H, J=9.2Hz, Ar-H-2,6), 7.05-7.09 (m, 1H, indol-H-5/6), 7.20-7.23 (m, 1H, indol-H-5/6), 7.38 (d, 1H, J= 1.6Hz, indol-H-3), 7.46 (d, 1H, J= 8 Hz, indol-H-4/7), 7.67 (d, 1H, J=8Hz, Ar-H-4/7), 7.71 (d, 2H, J=9.2Hz, Ar-H-3,5), 10.14 (s, 1H, NH), 11.73(s, 1H, NH); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 51.78 (CH<sub>3</sub>), 64.73 (CH<sub>2</sub>), 103.47, 112.33, 114.54, 119.84, 121.66, 123.61, 127.02, 131.55, 132.58, 136.70, 153.72, 159.43, 169.31. 2 signala pri aromatskih signalih se prekrijeta, zato se enega izmed signalov ne vidi; IR (ATR) ν = 3409, 3334, 3053, 2950, 2909, 2851, 1768, 1637, 1544, 1517, 1435, 1314, 1202, 1089, 996, 818, 752 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z* (%) = 325.1 ([M-H]<sup>+</sup>). HRMS za C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: izračunan 325.1188; izmerjen 325.1184; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5 μm C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μL; retencijski čas: 10.398 min (98.5% at 280 nm).

**2-(4-(4,5-Dibromo-1H-pirol-2-karboksiamido)fenoksi)ocetna kislina (12a).** Delamo po splošnem postopku D. Izkoristek reakcije, 90%; rjavi kristali (90 mg); tališče: 242-244 °C; Rf(diklorometan/metanol/ocetna kislina =20/1/0,01): 0.04; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.65 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.91 (d, 2H, J= 9.2Hz, Ar-H-2,6), 7.19 (d, 1H, J= 2.4Hz, pirol-CH), 7.59 (d,

2H, J=9.2Hz, Ar-H-3,5), 9.77 (s, 1H, NH), 12.87 (s, 1H, pirol-NH/COOH), 12.88 (s, 1H, pirol-NH/COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  64.60 (CH<sub>2</sub>), 98.02, 105.51, 113.42, 114.45, 121.49, 128.00, 132.17, 153.85, 157.05, 170.25; IR (ATR)  $\nu$  = 3408, 3139, 3108, 2936, 2538, 1708, 1626, 1600, 1514, 1417, 1311, 1250, 1208, 1174, 1074, 975, 820, 803, 754 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 414.9 ([M-H]<sup>+</sup>). HRMS za C<sub>13</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>: izračunan 414.8929; izmerjen 414.8921; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 (4.6 mm  $\times$  150 mm); mobilna faza: 10–90% MeOH v TFA (0.1%) v 20 min, 90% MeOH do 25 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10  $\mu\text{L}$ ; retencijski čas: 18.676 min (96.6% at 280 nm).

**2-(4-(1*H*-indol-2-karboksamido)fenoksi)ocetna kislina (**12b**).** Delamo po splošnem postopku D, le da kot topilo uporabimo metanol (20 mL). Izkoristek reakcije, 88 %; beli kristali (132 mg); tališče: 248-250 °C; Rf (diklorometan/metanol/ocetna kislina=10/1/0,01): 0.04;  $^1\text{H}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  4.67 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.94 (d, 2H, J=7.2Hz, Ar-H-2,6), 7.05-7.09 (m, 1H, indol-H-5/6), 7.20-7.24 (m, 1H, indol-H-5/6), 7.38 (d, 1H, J= 1.2Hz, indol-H-4/7), 7.46 (d, 1H, J= 8 Hz, indol-H-4/7), 7.70 (d, 2H, J=2Hz, Ar-H-2,6), 10.14 (s, 1H, NH), 11.73(s, 1H, indol-NH/COOH), 13.02 (s, 1H, indol-NH/COOH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  64.61 (CH<sub>2</sub>), 103.44, 112.33, 114.44, 119.84, 121.64, 121.66, 123.60, 127.02, 131.57, 132.36, 136.69, 153.09, 154.41, 170.27; IR (ATR)  $\nu$  = 3399, 3347, 3052, 2912, 2574, 1732, 1650, 1540, 1514, 1439, 1407, 1304, 1243, 1223, 1080, 820, 742 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 311.1 ([M-H]<sup>+</sup>). HRMS za C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>: izračunan 311.1032; izmerjen 311.1034; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 (4.6 mm  $\times$  150 mm); mobilna faza: 10–90% MeOH v TFA (0.1%) v 20 min, 90% MeOH do 25 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10  $\mu\text{L}$ ; retencijski čas: 17.481 min (95.6% at 254 nm).

**4-Nitrometilbenzilimidat hidroklorid (**14**).** 4-Nitrobenzonitril (**13**, 500 mg, 3,38 mmol) raztopimo v mešanici metil acetata (20 mL) in metanola (2 mL), na ledeni kopeli 30 minut prepihujemo s HCl<sub>(g)</sub>, bučko zamašimo in pustimo mešati 48 ur pri temperaturi 4°C. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in spojino prelijemo z dietiletrom (10 mL), nastalo suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietiletrom (2  $\times$  5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije, 74%, beli kristali (540 mg); Rf (diklorometan/metanol =50/1): 0.45; Spojino brez nadaljnega čiščenja uporabimo v naslednji stopnji.

**Splošni postopek E. Sinteza spojin 15a-b (spojino 15a smo podali kot primer).** Spojino 14 (200 mg, 0.92 mmol) raztopimo v diklorometanu (50 mL), dokapavamo trietilamin (148 $\mu$ L, 1.06 mmol) in mešamo 30 min. Dodamo HCl sol metilnega estra L-serina (182 mg, 1.17 mmol) in reakcijsko zmes mešamo čez vikend pri sobni temperaturi. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: etil acetat/petroleter= 1/2).

**Metil 2-(4-nitrofenil)-4,5-dihidrooksazol-4-karboksilat (15a).** Izkoristek reakcije, 88%; svetlorumeni kristali (204 mg); tališče: 105-107°C; Rf (etyl acetat/petroleter= 1/2): 0.19;  $^1$ H NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  3.73 (s, 1H, CH<sub>3</sub>), 4.64-4.73 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.05-5.10 (m, 1H, CH-4), 8.14 (d, 2H, J=8.8Hz, Ar-H-2,6), 8.34 (d, 2H, J=8.8Hz, Ar-H-3,5) (po literaturi: (29);  $^{13}$ C NMR (100MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  52.36, 68.26, 70.30, 123.95, 129.47, 132.21, 149.43, 163.32, 171.02; IR (ATR)  $\nu$  = 3399, 3319, 3110, 2957, 1751, 1651, 1598, 1519, 1409, 1340, 1310, 1210, 1065, 1010, 956, 937, 860, 852, 697 cm<sup>-1</sup>.

**Etil 2-(4-nitrofenil)-4,5-dihidrotiazol-4-karboksilat (15b).** Delamo po splošnem postopku E, le da namesto HCl soli metilnega estra L-serina dodamo HCl sol etilnega estra L-cisteina (430 mg, 2.43 mmol). Izkoristek reakcije, 68%; svetlorumeni kristali (280 mg); tališče 225-228 °C (po literaturi: 224-227 °C (28)); Rf (etyl acetat/petroleter= 1/2,5): 0.26;  $^1$ H NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  1.26 (t, 3H, J=6.8Hz, CH<sub>3</sub>), 3.70-3.88 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.19-4.24 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.49 (t, 1H, J=9.6Hz, CH-4), 8.06 (d, 2H, J=8.8Hz, Ar-H-2,6), 8.35 (d, 2H, J=8.8Hz, Ar-H-3,5); IR (ATR)  $\nu$  = 3140, 3111, 2989, 2943, 2903, 1740, 1718, 1599, 1513, 1456, 1335, 1318, 1199, 1084, 1024, 996, 849, 754, 633 cm<sup>-1</sup>.

**Metil 2-(4-aminofenil)-4,5-dihidrooksazol-4-karboksilat (16a).** Delamo po splošnem postopku A, le da kot topilo uporabimo 96% etanol (20 mL). Izkoristek reakcije, 94%; oranžni kristali (145 mg); tališče: 120-123 °C; Rf (diklorometan/metanol= 20/1), 0.65;  $^1$ H NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  3.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.45-4.52 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.81-4.86 (m, 1H, CH-4), 5.83 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.56 (d, 2H, J= 9.2Hz, Ar-H-3,5), 7.54 (d, 2H, J= 9.2Hz, Ar-H-2,6);  $^{13}$ C NMR (100MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  52.08 (CH<sub>3</sub>), 67.82, 68.99, 112.85, 112.99, 129.61, 152.25, 165.21, 171.97; IR (ATR)  $\nu$  = 3494, 3391, 3348, 1724, 1606, 1518, 1359, 1213, 1174,

1092, 974cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 221.1 ([M-H]<sup>+</sup>). HRMS za C<sub>11</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: izračunan 221.0926; izmerjen 221.0922.

**Etil 2-(4-aminofenil)-4,5-dihidrotiazol-4-karboksilat (16b).** Delamo po splošnem postopku A, le da kot topilo uporabimo 96% etanol (20 mL) in surov produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: etil acetat/petroleter= 1/2). Izkoristek reakcije, 65%; oranžno olje (140 mg); R<sub>f</sub> (etyl acetat/petroleter= 1/2): 0,10; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.25 (t, 3H, *J*=7.2Hz, CH<sub>3</sub>), 3.51-3.71 (m, 2H, 5-H), 4.16-4.21 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.28 (t, 1H, *J*=8.4Hz, 4-H), 6.85 (d, 2H, *J*=8.4Hz, Ar-H-3,5), 7.62 (d, 2H, *J*=8.4Hz, Ar-H-2,6), 8.62 (s, 1H, H<sub>A</sub> iz NH<sub>2</sub>), 8.88 (s, 1H, H<sub>B</sub> iz NH<sub>2</sub>); IR (ATR)  $\nu$  = 3228, 2980, 2934, 1724, 1603, 1508, 1459, 1368, 1209, 1094, 1021, 834cm<sup>-1</sup>.

**Metil-2-(4-(4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)fenil)-4,5-dihidrooksazol-4-karboksilat (17a).** Delamo po splošnem postopku B, le da reakcijsko zmes segrevamo čez vikend. Izkoristek reakcije, 38 %; rumeni kristali (96 mg); tališče: 135-136°C; R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol= 20/1): 0.52; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  3.72 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.54-4.63 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.93-4.94 (m, 1H, CH-4), 7.29 (s, 1H, pirol-CH), 7.86-7.87 (m, 4H, Ar-H-2,3,5,6), 10.10 (s, 1H, NH), 13.00 (s, 1H, pirol-NH); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  52.36 (CH<sub>3</sub>), 98.79, 107.10, 114.84, 120.37, 121.18, 127.70, 128.09, 133.86, 142.20, 145.93, 157.96, 161.68, 161.84; IR (ATR)  $\nu$  = 3111, 3047, 2954, 2869, 1735, 1653, 1632, 1597, 1535, 1510, 1415, 1372, 1336, 1299, 1244, 1177, 1103, 972, 838, 740, 681 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 467.9 ([M-H]<sup>-</sup>). HRMS za C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>: izračunan 467.9195; izmerjen 467.9185; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5 μm C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 10–90% MeOH v TFA (0.1%) v 20 min, 90% MeOH do 25 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μL; retencijski čas: 18.133 min (95.7% at 280 nm).

**Poskus sinteze etil 2-(4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)fenil)-4,5-dihidrotiazol-4-karboksilata (17b).** Delamo po splošnem postopku B, produkt poskušamo očistiti s kolonsko kromatografijo (MF: etil acetat/petroleter= 1/2). Zbiramo posamezne frakcije in jih analiziramo s pomočjo <sup>1</sup>H-NMR.

**2-(4-(4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)fenil)-4,5-dihidrooksazol-4-karboksilna kislina NHM63 (18a).** Delamo po splošnem postopku D, le da kot topilo uporabimo metanol

(10 mL). Izkoristek reakcije, 51%; rumeni kristali (18 mg); tališče: 188-191 °C; Rf (diklorometan/metanol/ocetna kislina= 20/1/0,01): 0.04;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  4.51-4.60 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.82-4.86 (m, 1H, CH-4), 7.29 (s, 1H, pirol-CH), 7.86-7.89 (m, 4H, Ar-H), 10.09 (s, 1H, NH), 13.00 (s, 1H, pirol-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  68.33, 69.65, 98.23, 106.60, 114.31, 119.26, 121.42, 127.68, 128.84, 142.06, 157.49, 163.93, 172.54; IR (ATR)  $\nu$  = 3112, 2969, 1719, 1646, 1594, 1518, 1386, 1332, 1252, 1180, 1127, 973, 848, 744, 689 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 453.9 ([M-H]<sup>-</sup>). HRMS za C<sub>15</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>: izračunan 453.9038; izmerjen 453.9032; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 10–90% MeOH v TFA (0.1%) v 20 min, 90% MeOH do 25 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10  $\mu\text{L}$ ; retencijski čas: 17.524 min (98.5% at 280 nm).

**(Metil 2-(4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)fenil)oksazol-4-karboksilat) (19a).** Spojino **17a** (63 mg, 0.13 mmol) raztopimo v brezvodnem diklorometanu (10 mL) in dodamo 1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-en (DBU, 60  $\mu\text{L}$ , 0.40 mmol). Bučko postavimo na ledeno kopel in ob mešanju dokapavamo bromotriklorometan (40  $\mu\text{L}$ , 0.40 mmol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni temperaturi. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v diklorometanu (20 mL). Organsko fazo spiramo z vodo (2×10 mL), nasičeno raztopino NaCl (10 mL), sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparimo pod znižanim tlakom. Surov produkt prelijemo z metanolom (10 mL), stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z metanolom (2 × 5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije, 22%; svetlorjavi kristali (14 mg); tališče: 230-231 °C; Rf (diklorometan/metanol= 20/1): 0.40;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  3.85 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.30 (s, 1H, pirol-H), 7.94-8.00 (m, 4H, Ar-H-2,3,5,6), 8.95 (s, 1H, CH-5), 10.13 (s, 1H, NH), 13.02 (s, 1H, pirol-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  52.36 (CH<sub>3</sub>), 98.79, 107.11, 114.84, 120.37, 121.18, 127.70, 128.09, 133.86, 142.20, 154.93, 157.96, 161.68, 161.80; IR (ATR)  $\nu$  = 3396, 3213, 3127, 2953, 1727, 1661, 1602, 1519, 1498, 1415, 1324, 1251, 1142, 1120, 944, 838, 738 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 465.9 ([M-H]<sup>-</sup>). HRMS za C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>: izračunan 465.9038; izmerjen 465.9040; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10  $\mu\text{L}$ ; retencijski čas: 11.915 min (96.8% pri 280 nm).

**Poskus sinteze metil 2-(4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)fenil)oksazol-4-karboksilne kisline (20a).** Delamo po splošnem postopku D, le da kot topilo uporabimo mešanico metanola (5 mL) in tetrahidrofurana (5 mL). Potek reakcije spremljamo s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC) in suhi preostanek po ekstrakciji analiziramo s pomočjo  $^1\text{H-NMR}$ .

**terc-Butil (2,4-dihidroksifenil)karbamat (22).** HCl sol 4-aminoresorcinola (**21**, 2.75 g, 17.09 mmol) in trietilamin (2.61 mL, 18.71 mmol) raztopimo v metanolu (100 mL) in na ledeni kopeli dokapavamo raztopino Boc anhidrida (5.57 g, 25.5 mmol) v metanolu (5 mL). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni temperaturi, uparimo topilo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etil acetatu (100 mL). Organsko fazo spiramo z vodo (2×30 mL), 10% raztopino citronske kisline (2×30 mL), nasičeno raztopino NaCl (2×30 mL), sušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in uparimo pod znižanim tlakom. Produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol= 20/1). Izkoristek reakcije, 68 %; temnomodro olje (2.51 g); R<sub>f</sub> (diklorometan/metanol= 20/1): 0.16;  $^1\text{H NMR}$  (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  1.43 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>), 6.14-6.17 (m, 1H, Ar-H-5), 6.30 (d, 1H, *J*=2.8Hz, Ar-H-3), 7.14 (d, 1H, *J*=8.4Hz, Ar-H-6), 7.66 (s, 1H, NH), 9.04 (s, 1H, OH), 9.40 (s, 1H, OH);  $^{13}\text{C NMR}$  (100MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  28.11 (3×CH<sub>3</sub>), 78.46, 102.71, 105.57, 117.58, 123.88, 149.74, 153.59, 154.45; IR (ATR)  $\nu$  = 3307, 2979, 2934, 1680, 1609, 1523, 1452, 1368, 1284, 1246, 1152, 1112, 1054, 971, 841, 802, 732 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z* (%) = 224.1 ([M-H]<sup>-</sup>). HRMS za C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>4</sub>: izračunan 224.0923; izmerjen 224.0922.

**Splošni postopek F. Sintesa spojin **24** in **26** (spojino **24** smo podali kot primer).** Spojino **22** (2.500 g, 11.9 mmol) raztopimo v acetonitrilu (100 mL), dodamo kalijev karbonat (3.285 g, 23.70 mmol) in s pomočjo kapalnika na ledeni kopeli počasi dokapavamo benzilbromid (**23**, 1.412 mL, 11.92 mmol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni temperaturi, uparimo topilo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etil acetatu (100 mL). Organsko fazo spiramo z vodo (3×20 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2×20 mL), nasičeno raztopino NaCl (20 mL), sušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in uparimo pod znižanim tlakom. Spojino čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/etil acetat= 20/1).

**terc-Butil (2-(benziloksi)-4-hidroksifenil)karbamat (24).** Izkoristek reakcije, 36%; beli kristali (1.304 g); tališče: 135-136 °C; Rf (diklorometan/etil acetat= 20/1): 0.20; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.42 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>), 5.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.28-6.31 (m, 1H, Ar-H-5), 6.30 (d, 1H, *J*=2.8 Hz, Ar-H-3), 7.16 (d, 1H, *J*= 8.8Hz, Ar-H-6), 7.33-7.40 (m, 3H, Ar-H-3'4',5'), 7.47-7.49 (m, 2H, Ar-H-2',6'), 7.83 (s, 1H, NH), 9.29 (s, 1H, OH); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 28.12 (3×CH<sub>3</sub>), 69.30 (CH<sub>2</sub>), 78.29, 100.68, 106.43, 118.69, 125.44, 127.37, 127.69, 128.28, 137.10, 151.99, 153.68, 155.14; IR (ATR) ν = 3358, 3289, 3032, 2979, 1680, 1597, 1524, 1507, 1457, 1363, 1281, 1242, 1177, 1153, 1107, 1013, 974, 832, 702, 628 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z* (%) = 314.1 ([M-H]<sup>+</sup>). HRMS za C<sub>18</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>4</sub>: izračunan 314.1392; izmerjen 314.1401.

**(Metil 2-(3-(benziloksi)-4-((terc-butoksikarbonil)amino)fenoksi)acetat) (26).** Delamo po splošnem postopku F, le da raztopini spojine **22** (500 mg, 1.63 mmol) dokapavamo metilbromoacetat (**25**, 155 μL, 1.63 mmol). Izkoristek reakcije: 99%; rumeni kristali (610 mg); tališče: 101-103 °C; Rf (diklorometan/metanol= 20/1), 0.79; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 1.43 (s, 9H, 3×CH<sub>3</sub>), 3.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.75 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.13 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.30-6.46 (m, 1H, Ar-H-5), 6.68 (d, 1H, *J*=2.4 Hz, Ar-H-3), 7.31-7.41 (m, 4H, Ar-H-6, 3'4',5'), 7.50-7.51 (m, 2H, Ar-H-2',6'), 7.96 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 28.09 (3×CH<sub>3</sub>), 51.75 (CH<sub>3</sub>), 64.60 (CH<sub>2</sub>), 69.59 (CH<sub>2</sub>), 78.60, 100.82, 104.93, 121.10, 124.67, 127.50, 127.78, 128.32, 136.91, 151.54, 153.46, 155.06, 169.18; IR (ATR) ν = 3431, 3061, 3033, 2981, 2957, 1753, 1718, 1617, 1521, 1485, 1429, 1364, 1243, 1165, 1127, 1009, 826, 773, 701 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z* (%) = 388.2 ([M-H]<sup>+</sup>). HRMS za C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>NO<sub>6</sub>: izračunan 388.1760; izmerjen 388.1767.

**2-(Benziloksi)-4-(2-metoksi-2-oksoetoksi)benzenaminijev klorid (27).** Spojino **26** (0.550 g, 1.45 mmol) raztopimo v dietiletru (20 mL), na ledeni kopeli 40 minut prepihujemo s HCl<sub>(g)</sub>, bučko zamašimo in mešamo čez noč pri sobni temperaturi. Izpadle kristale odfiltriramo, speremo z hladim dietiletrom (2×10 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije, 42%; beli kristali (185 mg); tališče: 199-200 °C; Rf (etil acetat/petroleter= 1/1), 0.55; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 3.69 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.84 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.25 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.58-6.60 (m, 1H, Ar-H-5), 6.87 (d, 1H, *J*=2.4 Hz, Ar-H-3), 7.40-7.44 (m, 4H, Ar-H-6, 3'4',5'), 7.57-7.59 (m, 2H, Ar-H-2',6'), 7.91 (s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 51.84 (CH<sub>3</sub>), 64.77 (CH<sub>2</sub>),

69.94 (CH<sub>2</sub>), 101.38, 105.70, 114.11, 124.49, 127.67, 127.99, 128.38, 136.16, 152.16, 158.08, 168.88; IR (ATR)  $\nu$  = 2846, 2623, 2588, 1744, 1633, 1506, 1448, 1304, 1234, 1200, 1165, 1067, 997, 834, 751 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 288.1 ([M-H]<sup>+</sup>). HRMS za C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>NO<sub>4</sub>: izračunan 288.1236; izmerjen 288.1241.

**Metil 2-(3-(benziloksi)-4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)fenoksi)acetat (28).**

Delamo po splošnem postopku B. Surovi produkt čistimo s prelivanjem z dietiletrom (10 mL), nastalo suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietiletrom (2 × 5 mL) in posušimo. Izkoristek reakcije, 60%; rjavi kristali (115 mg); tališče: 168-169 °C; Rf (etyl acetat/petroleter= 1/1): 0.56; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  4.06 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.79 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.18 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.50-6.53 (m, 1H, Ar-H-5), 6.72 (d, 1H, *J*=2.4 Hz, Ar-H-3), 7.31 (s, 1H, Ar-H-6), 7.31-7.38 (m, 4H, Ar-H, pirol-H), 7.47 (d, 2H, *J*= 8Hz, Ar-H), 9.21 (s, 1H, NH), 12.89 (s, 1H, pirol-NH); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  51.79 (CH<sub>3</sub>), 64.72 (CH<sub>2</sub>), 69.52 (CH<sub>2</sub>), 98.00, 101.12, 105.13.113.36.119.98, 127.04, 127.67, 128.01, 128.32, 128.49, 137.00, 152.68, 156.11, 157.63, 169.13; ; IR (ATR)  $\nu$  = 3420, 3191, 3031, 2952, 2858, 1746, 1730, 1656, 1527, 1551, 1427, 1395, 1212, 1167, 1131, 1006, 972, 825, 742 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 535.0 ([M-H]<sup>+</sup>). HRMS za C<sub>21</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Br<sub>2</sub>: izračunan 534.9504; izmerjen 534.9514; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5 μm C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μL; retencijski čas: 14.643 min (95.8% pri 280 nm).

**Splošni postopek G. Sinteza spojin **29a**, **31**, **38a**, **38b** (spojina **29a** je podana kot primer).**

Spojino **28** (53 mg, 0.11 mmol) in hidrazin monohidrat (54μL, 1.11 mmol) raztopimo v absolutnem etanolu (5 mL). Bučko opremimo s povratnim hladilnikom in na oljni kopeli segrevamo čez noč pri temperaturi 80°C. Topilo uparimo pod znižanim tlakom, preostanek prelijemo z absolutnim etanolom (10 mL), nastalo oborino odfiltriramo in posušimo.

**N-(2-(Benziloksi)-4-(2-hidrazinil-2-oksoetoksi)fenil)-4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamid (**29a**).** Izkoristek reakcije: 74%; beli kristali (43 mg); tališče: 197-199 °C; Rf (diklorometan/metanol= 20/1): 0.21; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  4.35 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 4.48 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.16 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.54-6.57 (m, 1H, Ar-H-5), 6.78 (d, 1H, *J*=2.4 Hz, Ar-H-3), 7.11 (s, 1H, Ar-H-6), 7.29-7.38 (m, 4H, Ar-H- 3'4',5', pirol-CH), 7.48 (d, 1H, *J*= 7.2Hz, Ar-

H-2',6'), 9.21 (s, 1H, NH), 9.35 (s, 1H, NH), 12.90 (s, 1H, pirol-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  66.48 (CH<sub>2</sub>), 69.54 (CH<sub>2</sub>), 98.01, 101.32, 105.35, 113.35, 119.86, 126.94, 127.10, 127.71, 128.01, 128.34, 128.50, 136.94, 152.67, 156.39, 157.64, 166.55; IR (ATR)  $\nu$  = 3429, 3326, 3105, 3065, 3029, 2913, 2861, 2805, 2675, 1682, 1656, 1556, 1532, 1425, 1294, 1221, 1177, 1066, 1023, 838, 735 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 535.0 ([M-H]<sup>-</sup>). HRMS za C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>Br<sub>2</sub>: izračunan 534.9617; izmerjen 534.9626; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10  $\mu\text{L}$ ; retencijski čas: 9.472 min (95.2% pri 280 nm).

**Metil 2-(3-(benziloksi)-4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)fenoksi)ocetna kislina (29b).** Delamo po splošnem postopku D. Izkoristek reakcije, 47%; sivi kristali (25 mg); tališče: 203-204 °C; R<sub>f</sub> (etil acetat/petroleter/ocetna kislina= 1/1/0.01): 0,04;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  4.67 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.79 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.48-6.51 (m, 1H, Ar-H-5), 6.72 (s, 1H, Ar-H-3), 7.11 (s, 1H, Ar-H-6), 7.31-7.38 (m, 4H, 3×Ar-H, pirol-CH), 7.47 (d, 1H, J= 8Hz, Ar-H-2,6), 9.21 (s, 1H, NH), 12.90 (s, 1H, pirol-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  64.63 (CH<sub>2</sub>), 69.55 (CH<sub>2</sub>), 98.01, 101.18, 104.96, 105.28, 113.34, 119.78, 126.92, 127.08, 127.68, 128.02, 128.33, 137.00, 152.72, 156.31, 157.62, 170.09 (COOH); IR (ATR)  $\nu$  = 3419, 3210, 3116, 2914, 1742, 1639, 1615, 1523, 1547, 1490, 1421, 1384, 1289, 1268, 1210, 1180, 1135, 1018, 826, 755, 738 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 521.0 ([M-H]<sup>-</sup>). HRMS za C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>Br<sub>2</sub>: izračunan 520.9348; izmerjen 520.9336; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10  $\mu\text{L}$ ; retencijski čas: 12.390 min (95.7% pri 280 nm).

**Splošni postopek H. Sinteza spojin 30, 32 in 39a (spojina 32 je podana kot primer).** Spojino 31 (150 mg, 0.35 mmol) in karbonildiimidazol (CDI, 85 mg, 0.52 mmol) suspendiramo v dioksanu (15 mL), bučko opremimo s povratnim hladilnikom in na oljni kopeli segrevamo čez noč pri temperaturi 101°C, pri čemer nastane bistra raztopina. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in oljast preostanek čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: diklorometan/metanol=20/1).

**N-(2-(benziloksi)-4-((5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-il)metoksi)fenil)-4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamid (30).** Delamo po splošnem postopku H, le da produkt še enkrat čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: etil acetat/petroleter= 1/1). Izkoristek reakcije, 22%; beli kristali (10 mg); tališče: 215-217 °C; Rf (diklorometan/metanol= 20/1): 0,11; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 5.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.18 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.65-6.68 (m, 1H, Ar-H-5), 6.83 (d, 1H, *J*=2.4 Hz, Ar-H-3), 7.11 (s, 1H, pirol-CH), 7.31-7.48 (m, 6H, Ar-H), 9.22 (s, 1H, NH), 12.54 (s, 1H, NH), 12.90 (s, 1H, pirol-NH); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 59.74 (CH<sub>2</sub>), 60.68 (CH<sub>2</sub>), 98.03, 101.51, 105.37, 105.59, 113.39, 120.49, 126.86, 127.13, 127.72, 127.96, 128.33, 136.88, 152.63, 152.78, 154.57, 155.73, 157.58; IR (ATR) ν = 3420, 3297, 3213, 2962, 2931, 2854, 1800, 1664, 1551, 1530, 1497, 1431, 1288, 1212, 1171, 1132, 1039, 936, 743 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z* (%) = 560.9 ([M-H]<sup>-</sup>); HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5 μm C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μL; retencijski čas: 13.070 min (95.4% pri 280 nm).

**4,5-Dibromo-N-(4-(2-hidrazinil-2-oksoetoksi)fenil)-1H-pirol-2-karboksamid (31).** Delamo po splošnem postopku G. Izkoristek reakcije: 84 %; beli kristali (565 mg); tališče: 257-259°C; Rf (diklorometan/metanol= 20/1): 0.12; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.37 (t, 2H, *J*=5.2Hz, NH<sub>2</sub>), 4.47 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 6.95 (d, 2H, *J*=9.2Hz, Ar-H), 7.19 (s, 1H, pirol-CH), 7.59 (d, 2H, *J*=9.2Hz, Ar-H), 9.34 (s, 1H, NH), 9.77 (s, 1H, NH), 12.87 (s, 1H, pirol-NH); <sup>13</sup>C NMR (100MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 66.46 (CH<sub>2</sub>), 98.02, 105.54, 113.43, 114.70, 121.46, 12.99, 132.28, 153.93, 157.07, 166.67; IR (ATR) ν = 3436, 3303, 3119, 3072, 2950, 2861, 2687, 1649, 1605, 1512, 1419, 1391, 1224, 1075, 831 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z* (%) = 429.0 ([M-H]<sup>-</sup>). HRMS za C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>N<sub>4</sub>O<sub>3</sub>Br<sub>2</sub>: izračunan 428.9198; izmerjen 428.9201; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5 μm C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μL; retencijski čas: 5.843 min (96.4% pri 280 nm).

**4,5-Dibromo-N-(4-((5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-il)metoksi)fenil)-1H-pirol-2-karboksamid (32).** Delamo po splošnem postopku H. Izkoristek reakcije, 45%; beli kristali (71 mg); tališče 260-262 °C; Rf (diklorometan/metanol= 20/1): 0,17; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 5.04 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.04 (d, 2H, *J*=8.8Hz, Ar-H), 7.20 (s, 1H, pirol-CH), 7.63 (d,

2H,  $J=8.8\text{Hz}$ , Ar-H), 9.80 (s, 1H, NH), 12.53 (s, 1H, NH), 12.89 (s, 1H, pirol-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  60.69 ( $\text{CH}_2$ ), 98.05, 105.63, 113.50, 115.12, 121.44, 127.94, 132.94, 152.92, 153.28, 154.60, 157.10; IR (ATR)  $\nu$  = 3344, 3205, 1775, 1745, 1641, 1605, 1553, 1524, 1508, 1414, 1385, 1334, 1299, 1222, 1171, 1093, 939, 820, 742, 656; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 455.0 ([M-H] $^-$ ). HRMS za  $\text{C}_{14}\text{H}_{9}\text{N}_4\text{O}_4\text{Br}_2$ : izračunan 454.8991; izmerjen 454.8980; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 (4.6 mm  $\times$  150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10  $\mu\text{L}$ ; retencijski čas: 9.517 min (98.1% pri 280 nm).

**Metil (4-nitrobenzoil)-glicinat (35a).** HCl sol metilnega estra glicina (**34**, 677 mg, 5.39 mmol) raztopimo v acetonitrilu (50 mL), dodamo kalijev karbonat (2.23 g, 16.17 mmol) in na ledeni kopeli dodamo 4-nitrobenzoilklorid (**33**, 1.00 g, 5.39 mmol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni temperaturi, uparimo topilo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etil acetatu (100 mL). Organsko fazo spiramo z vodo (2 $\times$ 20 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (20 mL), sušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ter uparimo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije, 72%; rumeni kristali (929 mg); Rf (diklorometan/metanol =20/1): 0.40; spojino uporabimo v naslednji stopnji brez nadaljnjega čiščenja.

**Metil 3-(4-nitrobenzamido)-propanoat (35b).** 3-Metoksi-3-oksopropan-1-aminijev klorid (**34b**, 752 mg, 5.39 mmol) raztopimo v acetonitrilu (50 mL), dodamo kalijev karbonat (2.23 g, 16.17 mmol) in na ledeni kopeli dodamo 4-nitrobenzoilklorid (**33**, 1.00 g, 5.39 mmol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni temperaturi, uparimo topilo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etil acetatu (100 mL). Organsko fazo spiramo z vodo (2 $\times$ 20 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (20 mL), sušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ter uparimo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije, 68%; rumeni kristali (917 mg); Rf (diklorometan/metanol =20/1): 0.42; spojino uporabimo v naslednji stopnji brez nadaljnjega čiščenja.

**Metil (4-aminobenzoil)-glicinat (36a).** (30) Delamo po splošnem postopku A. Izkoristek reakcije, 99%; beli kristali (796 mg); tališče: 129–131 °C (po literaturi 130–131 °C, (29)); Rf (diklorometan/metanol = 20/1), 0.20;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  3.64 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.93 (d, 2H,  $J= 5.6\text{ Hz}$ ,  $\text{CH}_2$ ), 5.68 (s, 2H,  $\text{NH}_2$ ), 6.55 (d, 2H,  $J= 8.4\text{Hz}$ , Ar-H), 7.58 (d, 2H,  $J= 8.4\text{Hz}$ , Ar-H), 12.53 (s, 1H, NH), 12.89 (s, 1H, pirol-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (DMSO- $d_6$ )  $\delta$  60.69 ( $\text{CH}_2$ ), 98.05, 105.63, 113.50, 115.12, 121.44, 127.94, 132.94, 152.92, 153.28, 154.60, 157.10; IR (ATR)  $\nu$  = 3344, 3205, 1775, 1745, 1641, 1605, 1553, 1524, 1508, 1414, 1385, 1334, 1299, 1222, 1171, 1093, 939, 820, 742, 656; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 455.0 ([M-H] $^-$ ). HRMS za  $\text{C}_{14}\text{H}_{9}\text{N}_4\text{O}_4\text{Br}_2$ : izračunan 454.8991; izmerjen 454.8980; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 (4.6 mm  $\times$  150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10  $\mu\text{L}$ ; retencijski čas: 9.517 min (98.1% pri 280 nm).

8.4Hz, Ar-H), 8.46 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  41.87 ( $\text{CH}_2$ ), 52.74 ( $\text{CH}_3$ ), 123.90, 128.35, 139.15, 149.80, 165.45 (C=O), 170.20 (C=O). (30)

**Metil 3-(4-aminobenzamido)-propanoat (36b).** (30) Delamo po splošnem postopku A. Izkoristek reakcije, 99%; rumeni kristali (794 mg); tališče: mp >300 °C (po literaturi 320 °C, (29)); Rf (diklorometan/metanol= 20/1), 0.23;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  2.51 (t, 2H,  $J$ =1.6 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.44 (q, 2H,  $J$ = 6.8 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 3.60 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 5.62 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.53 (d, 2H,  $J$ = 8.8Hz, Ar-H), 7.54 (d, 2H,  $J$ = 8.8Hz, Ar-H), 8.09 (s, 1H, NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  33.40 ( $\text{CH}_2$ ), 35.55 ( $\text{CH}_2$ ), 52.04 ( $\text{CH}_3$ ), 123.84, 128.19, 139.90, 149.63, 165.25 (C=O), 173.41 (C=O); IR (ATR)  $\nu$  = 3346, 3231, 3032, 2952, 1722, 1601, 1541, 1503, 1437, 1177, 1076, 842, 768  $\text{cm}^{-1}$ . (30)

**Metil (4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzoil)glicinat (37a).** (30) Delamo po splošnem postopku B. Surovi produkt čistimo s prelivanjem z dietiletrom (20 mL), nastalo suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietiletrom (4 × 5 mL) in posušimo. Suhi preostanek prekristaliziramo iz metanola (50 mL). Izkoristek reakcije, 20%; rumeni kristali (132 mg); tališče >300 °C; Rf (etil acetat/petroleter= 2/1): 0.18;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  3.67 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.01 (d, 2H,  $J$ = 5.6 Hz,  $\text{CH}_2$ ), 7.28 (s, 1H, pirol-CH), 7.81-7.89 (m, 4H, Ar-H), 8.88 (s, 1H, NH), 10.07 (s, 1H, NH), 12.98 (s, 1H, pirol-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  51.77 ( $\text{CH}_3$ ), 64.71 ( $\text{CH}_2$ ), 64.90, 98.03, 105.55, 113.44, 114.55, 121.49, 127.97, 132.38, 153.67, 157.07, 169.29 (32); IR (ATR)  $\nu$  = 3609, 3386, 3274, 3118, 2952, 1722, 1631, 1527, 1496, 1410, 1315, 1217, 1182, 1160, 971, 850, 766  $\text{cm}^{-1}$ ; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 459.9 (50), 457.9 (100), 455.9 ([M-H]<sup>-</sup>, 40). HRMS za  $\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{Br}_2\text{N}_3\text{O}_4$ : izračunan 455.9195; izmerjen 455.9190 (32); HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 10–90% MeOH v TFA (0.1%) v 20 min, 90% MeOH do 25 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10  $\mu\text{L}$ ; retencijski čas: 18.549 min (96.6% pri 280 nm) (30).

**Metil (4-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)benzoil)propanoat (37b).** (30) Delamo po splošnem postopku B. Surovi produkt čistimo s prelivanjem z dietiletrom (20 mL), nastalo suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietiletrom (4 × 5 mL) in posušimo. Suhi preostanek prekristaliziramo iz metanola (50 mL). Izkoristek reakcije, 18.3%; sivi kristali (117 mg); tališče >300 °C; Rf (etil acetat/petroleter= 2/1): 0.38;  $^1\text{H}$  NMR

(400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 2.51 (t, 2H, *J*=2.0 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.49 (q, 2H, *J*= 5.6 Hz, CH<sub>2</sub>), 3.62 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 7.27 (s, 1H, pirol-H), 7.78-7.84 (m, 4H, Ar-H), 8.48 (s, 1H, NH), 10.03 (s, 1H, NH), 12.97 (s, 1H, pirol-NH); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 33.59 (CH<sub>2</sub>), 35.43 (CH<sub>2</sub>), 51.38 (CH<sub>3</sub>), 98.24, 106.38, 114.15, 118.94, 127.64, 127.94, 128.91, 141.45, 157.39 (C=O), 165.74 (C=O), 171.77 (C=O) (32); IR (ATR) ν = 3399, 3120, 3269, 3100, 2952, 2843, 1706, 1641, 1590, 1515, 1407, 1330, 1254, 1220, 1178, 1159, 1102, 975, 821, 752 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z* (%) = 473.9 (50), 472.0 (100), 469.9 ([M-H]<sup>-</sup>, 40). HRMS za C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>: izračunan 469.9351; izmerjen 469.9359 (32); HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5 μm C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 10–90% MeOH v TFA (0.1%) v 20 min, 90% MeOH do 25 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μL; retencijski čas: 19.123 min (98.6% pri 280 nm) (30).

#### **4,5-Dibromo-N-(4-((2-hidrazinil-2-oksoetil)karbamoil)fenil)-1*H*-pirol-2-karboksamid (38a).**

Delamo po splošnem postopku G. Izkoristek reakcije: 26%; beli kristali (25 mg); tališče: 265-266°C; Rf (etilacetat/petroleter= 2/1): 0.38; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.83 (d, 2H, *J*=6.0Hz, CH<sub>2</sub>), 4.26 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.28 (s, 1H, pirol-CH), 7.79- 7.89 (m, 4H, Ar-H), 8.61- 8.64 (m, 1H, NH), 9.13 (s, 1H, NH), 12.97 (s, 1H, pirol-NH); <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 56.01(CH<sub>2</sub>), 98.26, 106.39, 114.17, 118.91, 127.65, 128.17, 128.66, 141.52, 157.41, 165.92, 168.43; IR (ATR) ν = 3293, 3210, 3108, 1634, 1592, 1513, 1406, 1388, 1329, 1289, 1247, 185, 1139, 1063, 998, 970, 931, 883, 829, 805, 754, 649 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI) *m/z* (%) = 455.9 ([M-H]<sup>-</sup>). HRMS za C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>3</sub>: izračunan 455.9307; izmerjen 455.9298; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5 μm C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10 μL; retencijski čas: 5.012 min (95.7% pri 280 nm).

**Poskus sinteze 4,5-Dibromo-N-(4-((3-hidrazinil-3-oksopropil)karbamoil)fenil)-1*H*-pirol-2-karboksamida (38b).** Delamo po splošnem postopku E. Potek reakcije spremljamo s TLC, reakcijsko zmes uparimo in analiziramo s pomočjo <sup>1</sup>H NMR.

#### **4,5-Dibromo-N-(4-(((5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazol-2-il)metil)karbamoil)fenil)-1*H*-pirol-2-karboksamid (39a).**

Delamo po splošnem postopku H. Izkoristek reakcije, 22. %; beli kristali (25 mg); tališče: 261-263°C; Rf (etilacetat/petroleter= 4/1): 0,35; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.37 (d, 2H, *J*=5.2Hz, CH<sub>2</sub>), 7.28 (s, 1H, pirol-CH), 7.81- 7.88 (m, 4H, Ar-H),

8.97- 9.00 (m, 1H, NH), 10.07 (s, 1H, NH), 12.25 (s, 1H, NH), 12.97 (s, 1H, pirol-NH);  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  35.06, 98.27, 106.46, 114.23, 119.03, 127.60, 127.95, 128.18, 141.89, 154.48, 154.85, 157.42, 165.93; IR (ATR)  $\nu$  = 2231, 1761, 1639, 1593, 1544, 1519, 1410, 1388, 1322, 1246, 1224, 1186, 1093, 933, 848, 768, 647 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 481.9 ([M-H]<sup>+</sup>). HRMS za C<sub>15</sub>H<sub>11</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>: izračunan 481.9100, izmerjen 481.9110; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5  $\mu\text{m}$  C18 (4.6 mm  $\times$  150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10  $\mu\text{L}$ ; retencijski čas: 7.578 min (98.0% pri 280 nm).

**2-(2-(4-Nitrofenil)tiazol-5-il)acetonitril (**42**).** 4-Nitrofenacilbromid (**40**, 1.00g, 4.10 mmol), 2-cianotioacetamid (**41**, 410 mg, 4.10 mmol) in trietilamin (1.14 mL, 8.20 mmol) raztopimo v etanolu (100 mL) ter mešamo čez noč pri sobni temperaturi. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etil acetatu (30 mL). Organsko fazo spiramo z vodo (2 $\times$ 20 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (20 mL), sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparimo pod znižanim tlakom. Preostanek čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: etil acetat/ petroleter= 1/3); Izkoristek reakcije: 93 %; oranžni kristali; tališče: 146-147 °C; R<sub>f</sub> (etyl acetat/ petroleter= 1/3): 0.20;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  4.69 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 8.24 (d, 2H,  $J$ = 9.2Hz, Ar-H-2,6), 8.34 (d, 2H,  $J$ =9.2Hz, Ar-H-3,5), 8.51 (s, 1H, Tiazol-H); IR (ATR)  $\nu$  = 3197, 3122, 2959, 2941, 1595, 1508, 1337, 1320, 1106, 1060, 855, 844, 745 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 246.0 ([M-H]<sup>+</sup>). HRMS za C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>3</sub>O<sub>2</sub>: izračunan 246.0337; izmerjen 246.0334.

**2-(2-(4-Aminofenil)tiazol-5-il)acetonitril NHM **66b** (**43**).** Delamo po splošnem postopku A. Produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: etil acetat/petroleter= 1/2); Izkoristek reakcije: 37 %, rjavi kristali (214 mg); tališče: 126-127 °C; R<sub>f</sub> (etyl acetat/ petroleter= 1/2): 0.16;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz, DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  4.58 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 5.34 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 8.61 (d, 2H,  $J$ = 8.4 Hz, Ar-H-3,5), 7.62 (d, 2H,  $J$ =8.4Hz, Ar-H-2,6), 7.70 (s, 1H, tiazol-H);  $^{13}\text{C}$  NMR (100MHz, DMSO-d<sub>6</sub>) 21.35 (CH<sub>2</sub>), 110.07, 111.20, 114.42, 122.29, 127.06, 147.96, 155.17, 158.08; IR (ATR)  $\nu$  = 3439, 3352, 3212, 3111, 2936, 2906, 2260, 1615, 1532, 1493, 1410, 1286, 1131, 835, 750 cm<sup>-1</sup>; MS (ESI)  $m/z$  (%) = 216.1 ([M-H]<sup>+</sup>). HRMS za C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>S: izračunan 216.0595; izmerjen 216.0589.

**4,5-Dibromo-N-(4-(5-(cianometil)tiazol-2-il)fenil)-1H-pirol-2-karboksamid (44).** Spojino **50** (281 mg, 1,05 mmol) raztopimo v brezvodnem diklorometanu (20mL), dodamo oksalil klorid (2M raztopina v diklorometanu, 790 µL, 1,57 mmol) in reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni temperaturi. Topilo uparimo pod znižanim tlakom, preostanek raztopimo v mešanici brezvodnega diklorometana (5 mL) in piridina (5mL) ter dodamo **43** (150 mg, 0,70 mmol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni temperaturi, uparimo topilo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etil acetatu (50 mL). Organsko fazo spiramo z 1M HCl (4×20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (20 mL), sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparimo pod znižanim tlakom. Preostanek prelijemo z dietiletrom (10 mL), nastalo suspenzijo stresamo na ultrazvoku, oborino odnučamo, speremo z dietiletrom (2× 5mL) in posušimo. Izkoristek reakcije; 62 %, rjavi kristali (200 mg); tališče: 263-265 °C; Rf (etil acetat/ petroleter= 1/1): 0.51; <sup>1</sup>H NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 4.64 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.27 (s, 1H, Pyr-H), 7.82 (d, 2H, *J*= 8.8 Hz, Ar-H), 7.94 (d, 2H, *J*= 8.8Hz, Ar-H), 8.05 (s, 1H, 4''-H), 9.98 (s, 1H, NH), 12.95 (s, 1H, NH); <sup>13</sup>C NMR (DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 21.54 (CH<sub>2</sub>), 98.19, 106.08, 113.91, 114.38, 117.06, 119.99, 126.44, 127.83, 128.80, 138.87, 154.08, 157.27, 158.82; IR (ATR) ν = 3371, 3191, 3133, 1656, 1599, 1530, 1550, 1414, 1333, 1251, 746; MS (ESI) *m/z* (%) = 462.9 ([M-H]<sup>+</sup>). HRMS za C<sub>16</sub>H<sub>10</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>OS: izračunan 462.8864; izmerjen 462.8856; HPLC: Kolona Phenomenex Luna 5 µm C18 (4.6 mm × 150 mm); mobilna faza: 30–90% acetonitrila v TFA (0.1%) v 16 min, 90% acetonitrila do 20 min; pretok 1.0 mL/min; volumen injiciranja: 10 µL; retencijski čas: 12.227 min (95.3% pri 280 nm).

**Poskus sinteze NHM 74 2-(2-(4-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)fenil)tiazol-5-il)ocetne kisline (45a).** Delamo po splošnem postopku D, le da kot topilo uporabimo 96% etanol (5 mL), bučko opremimo s povratnim hladilnikom in na oljni kopeli segrevamo čez vikend pri temperaturi 60°C. Potek reakcije spremljamo s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC). Suhi preostanek po ekstrakciji analiziramo s pomočjo <sup>1</sup>H NMR.

**Poskus sinteze N-(4-(5-((1H-tetrazol-5-il)metil)tiazol-2-il)fenil)-4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamida (45b 1).** Spojino **44** (20 mg, 0.04 mmol), aluminijev triklorid (6.0 mg, 0.05 mmol) in natrijev azid (7.8 mg, 0.12 mmol) raztopimo v brezvodnem tetrahidrofurantu (2mL). Bučko opremimo s povratnim hladilnikom in na oljni kopeli segrevamo čez vikend pri temperaturi 50°C. Potek reakcije spremljamo s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC).

**Poskus sinteze *N*-(4-((1*H*-tetrazol-5-il)metil)tiazol-2-il)fenil)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamida (**45b 2**). Spojino **44** (20 mg, 0.04 mmol), trietilamonijev hidroklorid (9.0 mg, 0.06 mmol) in natrijev azid (4.0 mg, 0.12 mmol) suspendiramo v toluenu (2mL). Bučko opremimo s povratnim hladilnikom in na oljni kopeli segrevamo čez vikend pri temperaturi 80°C. Potek reakcije spremljamo s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC).**

**2,2,2-Trikloro-1-(1*H*-pirol-2-il)etan-1-on (**48**).** Pirol (**46**, 15.51 mL, 0.22 mol) in trietilamin (37.4 mL, 0.27 mol) raztopimo v tetrahidrofuranu, prepihamo z argonom in na ledeni kopeli dokapavamo trikloroacetilklorid (**47**, 37.64 ml, 0.34 mol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni temperaturi. Reakcijo ustavimo z dodatkom nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> (10 mL), mešamo 10 minut, uparimo topilo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v etil acetatu (100 mL). Organsko fazo spiramo z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (3×30 mL), nasičeno raztopino NaCl (2×30 mL), sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparimo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije: 65%; sivi kristali (31.257g); tališče: 73-75 °C (po literaturi: 73-75 °C, (31)); <sup>1</sup>H NMR (400MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ 6.36-6.39 (m, 1H, Ar-H-4), 7.32-7.37 (m, 2H, Ar-H-3,5), 12.46 (s, 1H, NH).

**2,2,2-Trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etan-1-on (**49**).** Spojino **48** (2.49g, 11.72 mmol) suspendiramo v kloroformu (80 mL), prepihamo z argonom in na ledeni kopeli počasi dokapavamo brom (1.33 mL, 25.78 mmol). Reakcijsko zmes mešamo čez noč pri sobni temperaturi, uparimo topilo pod znižanim tlakom preostanku dodamo vodo (50 mL) in vodno fazo ekstrahiramo z diklorometanom (3×20 mL). Združene organske faze spiramo z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (3×20mL), nasičeno raztopino NaCl (2×20 mL), sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in uparimo pod znižanim tlakom. Preostanek čistimo s kristalizacijo iz heksana. Izkoristek reakcije: 90%; sivorjavi kristali (3.917 g); R<sub>f</sub> (etyl acetat/petroleter=1/1), 0.48; <sup>1</sup>H NMR (400MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7.29 (s, 1H, Ar-H-3), 9.53 (s, 1H, NH); IR (ATR) ν= 3285, 3133, 1654, 1402, 1365, 1222, 1158, 1132, 981, 839, 683 cm<sup>-1</sup>.

**4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilna kislina (**50**).** Spojino **49** (2.200 g, 5.94 mmol) raztopimo v tetrahidrofuranu (50 mL), dodamo 2 M NaOH (14.86 mL, 29.71 mmol) in mešamo čez noč pri sobni temperaturi. Reakcijsko zmes nakisamo do pH=3 z 1M HCl in topilo uparimo pod znižanim tlakom. Preostanku dodamo etil acetat (100 mL), organsko fazo

spiramo z vodo ( $3 \times 20\text{mL}$ ) in nasičeno raztopino NaCl ( $2 \times 20\text{ mL}$ ), sušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in uparimo pod znižanim tlakom. Izkoristek reakcije: 91 %; temnovijolični kristali (1.45 mg); Rf (diklorometan/ocetna kislina=1/0,01): 0.22;  $^1\text{H}$  NMR (400MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  6.84 (s, 1H, Ar-H-3), 12.81 (s, 1H, NH/COOH), 12.98 (s, 1H, NH/COOH).

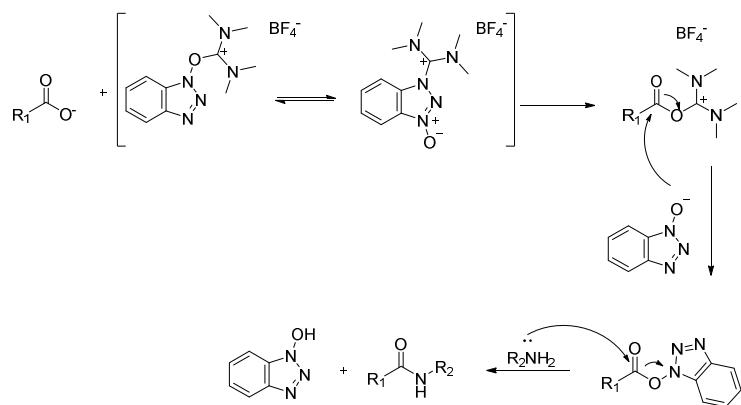
## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. KOMENTAR IZBRANIH SINTEZNIH POSTOPKOV

#### 5.1.1. Sinteza amidne vezi s sklopitvenim reagentom TBTU (spojine **5a-d**, **11a-b**, **17a-b**, **28**, **37a-b**)

Ker karboksilne skupine pod običajnimi pogoji ne reagirajo kot elektrofili ( $\text{OH}^-$ - skupina je slabo izstopajoča skupina), smo sintezo amidne vezi izvedli s pomočjo sklopitvenega reagenta TBTU (2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronijev tetrafluoroborat), s katerim smo aktivirali 4,5-dibromo-pirol-2-karboksilno oz. 2-indolkarboksilno kislino. V reakciji med karboksilno in amino skupino najprej poteče adicija amina na karbonilni C-atom, ki ji sledi eliminacija vode, zato reakcija poteka po  $\text{S}_{\text{N}}2$  mehanizmu nukleofilne substitucije. Prednost uporabe sklopitvenega reagenta pred drugimi metodami tvorbe amidne vezi (npr. reakcija s kislinskim kloridom) je selektivna aktivacija kisline v nekaj minutah, zato lahko dodamo amin direktno v zmes aktivirane karboksilne kisline in sklopitvenega reagenta.

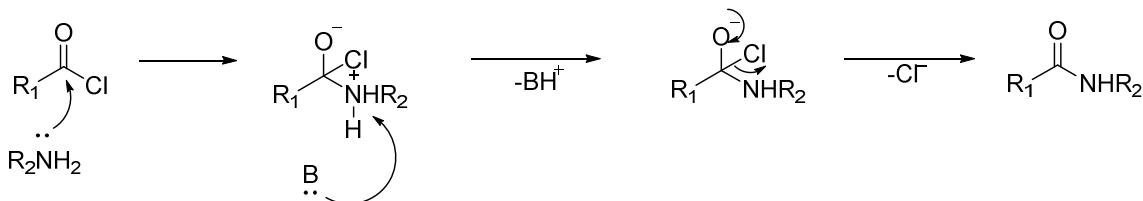
TBTU aktivira COOH skupino tako, da v prvi stopnji z elektrofilnim delom molekule tvori aktivirani ester z ionizirano  $\text{COO}^-$  skupino. Do ionizacije karboksilne skupine pride zaradi dodatka baze, v našem primeru *N*-metilmorfolina. V naslednji stopnji reakcije pride do nukleofilnega napada benzotriazol-1-olatnega iona, pri čemer kot stranski produkt izstopi tetrametilsečnina. V zadnji stopnji pride do nukelofilne adicije amina na karbonilni C-atom in do izstopa 1-hidroksibenzotriazola. Mehanizem reakcije je prikazan na sliki 15. (32, 33, 34)



Slika 15: Mehanizem reakcije tvorbe amidne vezi s pomočjo sklopitvenega reagenta TBTU (prirejeno po 34).

### 5.1.2. Sinteza amidne vezi s kislinskim kloridom (spojina **44**)

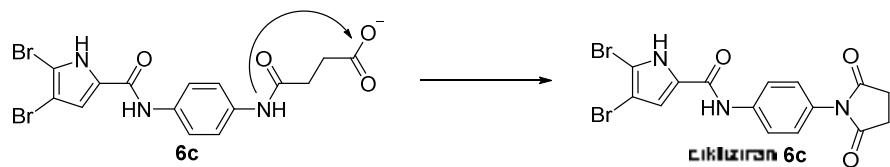
Kljub temu, da smo v večini primerov uspešno in z dovolj visokimi izkoristki tvorili amidno vez v reakcijah s sklopitvenim reagentom TBTU, pa spojine **44** na ta način nismo uspeli sintetizirati. V primeru sinteze spojine **44**, smo 4,5-dibromo-pirol-2-karboksilno kislino najprej pretvorili v kislinski klorid z oksaliklordinom in tako povečali elektrofilnost karbonilne skupine, saj smo s tem uvedli dobro izstopajočo skupino. Ker se pri reakciji sprošča  $\text{HCl}$ , je potrebno v reakcijsko zmes dodati bazo. Ugotovili smo, da reakcija najbolje poteče v zmesi diklorometana in piridina (1:1), kjer ima piridin hkrati vlogo baze in sotopila. Reakcija poteka po mehanizmu  $\text{S}_{\text{N}}2$  nukleofilne substitucije preko tetraedričnega intermediata, ki je prikazan na Sliki 16. (33)



Slika 16: Mehanizem nukleofilne substitucije s tvorbo tetraedričnega intermediata (prirejeno po 33).

### 5.1.3. Poskus sinteze spojine **6c**

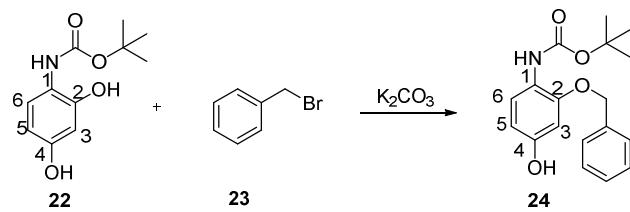
Iz spojine **5c**, ki vsebuje metilno estrsko skupino, smo želeli spojino **6c** s prosto karboksilno kislino pripraviti z običajno alkalno hidrolizo estra. V prvem poskusu smo reakcijo izvedli po Splošnem postopku D, a smo po analizi  $^1\text{H}$  NMR spektra ugotovili, da je prišlo do intramolekularne tvorbe amidne vezi med amidnim dušikom in terminalno karboksilno skupino (Slika 17). V drugem poskusu smo, ker je karbonilna skupina soli slabši elektrofil od karbonilne skupine proste kisline, produkt poskušali izolirati v obliki soli, a je tudi v tem primeru prišlo do ciklizacije. Na koncu smo produkt poskušali pripraviti še po alternativni poti preko tvorbe sililnega estra, ampak tudi ta reakcija ni bila uspešna.



Slika 17: Ciklizacija spojine **6c**.

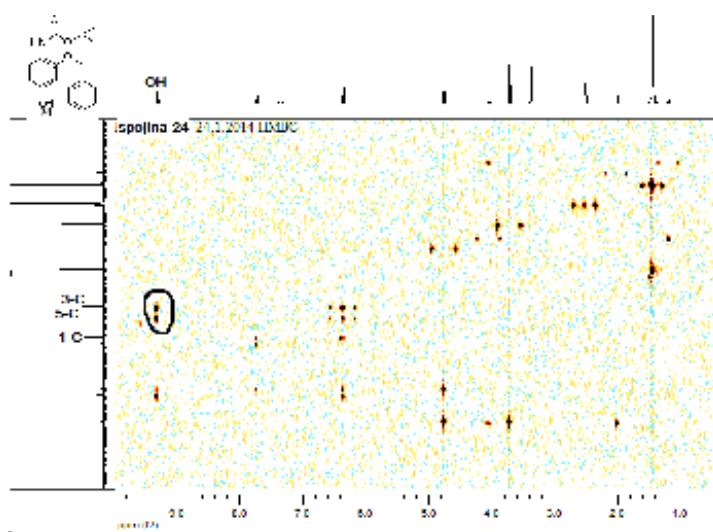
### 5.1.4. Sinteza spojine **24**; alkiliranje sterično bolj oviranega mesta

Zaradi steričnih ovir, ki jih predstavlja z Boc karbamatom zaščitena aminska skupina spojine **22** (slika 18) smo predpostavili, da bo pri reakciji spojine **22** z benzil bromidom prvočno prišlo do alkiliranja sterično manj ovirane hidroksilne skupine na mestu 4. Da bi nedvoumno potrdili nastanek želenega produkta, smo očiščen produkt analizirali s pomočjo 2-D NMR eksperimentov  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC (Heteronuclear single-quantum correlation spectroscopy) in  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC (Heteronuclear multiple-bond correlation spectroscopy). V HSQC spektru vidimo sklopite med jedri  $^1\text{H}$  in  $^{13}\text{C}$  vezanimi preko ene vezi, v HMBC spektru pa sklopite med jedri  $^1\text{H}$  in  $^{13}\text{C}$ , ki so lahko oddaljena od 2 do 4 vezi. (35) Z natančno analizo HSQC in HMBC spektrov spojine **24** smo ugotovili, da se kot prva ne alkilira OH skupina na mestu 4, temveč sterično bolj ovirana OH skupina na mestu 2. Reakcija alkiliranja sterično bolj ovirane hidroksilne skupine je prikazana na sliki 18.



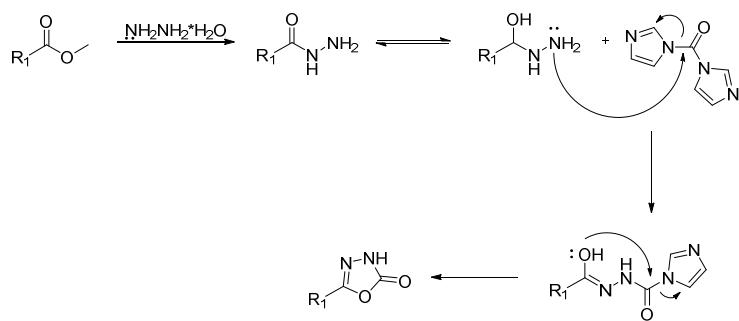
**Slika 18:** Alkiliranje sterično bolj ovirane OH-skupine.

Na to, ali je pri reakciji prišlo do benziliranja OH skupine na mestu 2 ali OH skupine na mestu 4 smo sklepali iz signalov, ki so na HMBC spektru spojine **24** obkroženi s črno (Slika 19). Jedri atomov 3-C in 5-C se sklapljata z jedrom vodika iz OH skupine, kar je mogoče le, če je prosta OH skupina na mestu 4. Če bi bila prosta OH skupina na mestu 2, ne bi videli sklopite z jedrom 5-C, saj so med njima več kot 4 vezi. Prav tako ne vidimo sklopite z jedrom 1-C, ki bi jo videli, če bi bila prosta 2-OH skupina, sklopite s 4-OH pa ne vidimo, ker je razdalja med jedroma prevelika.

Slika 19: HMBC spekter spojine 24.

### 5.1.5. Tvorba 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolnega obroča (spojine 30, 32 in 39a)

Pri tvorbi 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolnega obroča smo v prvi stopnji izhajali iz metilnega estra karboksilne kisline, ki smo ga s hidrazin monohidratom pretvorili v hidrazid po mehanizmu nukleofilne substitucije. V naslednji stopnji smo izvedli reakcijo med hidrazidom in 1,1'-karbonildiimidazolom (CDI). Pri tej reakciji pride najprej do nukleofilnega napada NH<sub>2</sub> skupine hidrazida na karbonilno skupino CDI in izstopa imidazola. Zaradi laktam-laktim tautomerije in nastanka nukleofilne OH skupine pa nato pride do novega nukleofilnega napada, tokrat laktimske OH skupine na karbonilno skupino preostanka molekule CDI in do ciklizacije ter izstopa drugega imidazola. Mehanizem reakcije je prikazan na sliki 20. (32, 36)



Slika 20: Mehanizem tvorbe 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolnega obroča.

## 5.2. REZULTATI BIOLOŠKIH TESTIRANJ

### 5.2.1. Encimski testi

Testiranih je bilo 23 končnih spojin, ki smo jih na podlagi strukturnih značilnosti razdelili v štiri razrede. Vse spojine so bile testirane na encim DNA girazo iz bakterije *Escherichia coli*, pri čemer smo manj aktivnim spojinam določili zgolj rezidualno aktivnost (RA), tj. razmerje med aktivnostjo encima ob dodatku zaviralca in v njegovi odsotnosti, bolj aktivnim pa tudi  $IC_{50}$  vrednost, tj. koncentracijo zaviralca, ki zmanjša aktivnost encima za 50%. Najbolj aktivnim spojinam iz vsake serije smo določili tudi aktivnosti na DNA girazo iz bakterije *Staphylococcus aureus* in aktivnosti na encima topoizomeraza IV (topo IV) iz bakterij *E. coli* in *S. aureus*. Rezultati encimskih testov so prikazani v preglednicah I-IV.

Iz rezultatov, ki so prikazani v preglednicah I in II je razvidno, da so spojine, ki vsebujejo v svoji strukturi 4,5-dibromo-pirolamidni fragment bolj aktivne od spojin z indolamidnim fragmentom (primerjava spojin **5a** in **5d**, **6a** in **6d** ter **12a** in **12b**). Razlika v aktivnosti je najverjetneje posledica dejstva, da je indolamidna skupina večja in se zato slabše prilega hidrofobnemu vezavnemu žepu v vezavnem mestu za ATP, posledično pa težje pride do interakcije Asp73 z indolno NH skupino. Rezultati encimskih testov potrjujejo našo domnevo, da so spojine s prosto karboksilno kislino bolj aktivne od njihovih analogov, ki vsebujejo metilne in etilne estrske skupine, saj le prosta karboksilna kislina lahko tvori ionske interakcije z Arg136. Pričakovano so hidrazidi (preglednici II in IV, spojine **29a**, **31**, **38a**) zaradi nezmožnosti tvorbe ionske interakcije z Arg136 manj aktivni, kar je razvidno iz primerjave spojin **29a** ( $RA = 104\%$ ) in **29b** ( $IC_{50} = 10.1 \mu M$ ) ter spojin **31** ( $RA = 97\%$ ) in **12a** ( $IC_{50} = 1.4 \mu M$ ). Bioizosterna zamenjava karboksilne kisline s 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolnim obročem je pri spojinah **30** in **32** povzročila padec aktivnosti (preglednica II), pri spojini **39a** pa porast aktivnosti (preglednica IV). Ne glede na encimsko aktivnost predvidevamo, da bi lahko taka substitucija povečala protibakterijsko aktivnost spojin, saj bi zaradi manjše kislosti 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolne skupine, takšne spojine predvidoma lažje prehajale bakterijsko celično steno.

Ugotovili smo tudi, da razdalja med fenilnim obročem in COOH skupino, ki je daljša od treh C atomov povzroči padec aktivnosti spojin, kar se kaže v primerjavi spojine **5b** ( $IC_{50} = 2.09 \mu M$ ) s tri C atome dolgim distančnikom in spojine **5c** ( $RA = 65\%$ ) s štiri C atome dolgim

distančnikom. Iz primerjave aktivnosti spojine **12a** ( $IC_{50} = 1.4 \mu M$ ) in njenega analoga **29b** ( $IC_{50} = 10.1 \mu M$ ) smo ugotovili, da uvedba dodatnega benziloksi substituenta na mesto 2 fenilnega obroča povzroči padec encimske aktivnosti, ker predvidoma ta ne tvori dodatnih interakcij v vezavnem mestu, ali pa se zaradi njegove velikosti spojina ne prilega več optimalno svojemu vezavnemu mestu. Iz serije spojin s heterocikličnim substituentom na mestu 4 fenilnega obroča (preglednica III) smo ugotovili, da je uvedba heterocikličnega obroča v splošnem ugodna za aktivnost spojin. Najbolj aktivna spojina iz te serije je spojina **18a** s 4-(S)-karboksi-4,5-dihidrooksazolnim substituentom ( $IC_{50} = 5.03 \mu M$ ). Iz primerjave aktivnosti spojin **17a** ( $IC_{50} = 40 \mu M$ ) in **19a** ( $IC_{50} = 55.7 \mu M$ ) lahko sklepamo, da na zaviralno aktivnost vpliva tudi prostorska usmeritev karboksilne skupine vezane na heterociklični obroč, saj oksidacija oksazolnega obroča (spojava **19a**) in s tem planarna usmeritev COOH skupine glede na aromatski obroč povzroči padec aktivnosti.

V primerjavi z zavirnimi aktivnostmi na DNA girazo iz bakterije *E. coli* so bile aktivnosti testiranih spojin na encimih DNA giraze iz *S. aureus*, topo IV iz *E. coli* in topoIV iz *S. aureus* bistveno nižje (preglednice I- IV). Izjema je spojina **6a** (RA = 41%), ki je izkazala relativno dobro inhibicijo encima DNA giraze iz *S. aureus* in ji bo določena še vrednost  $IC_{50}$ . Slabšo aktivnost spojin na DNA girazo iz bakterije *S. aureus* v primerjavi z DNA girazo iz bakterije *E. coli* si lahko razlagamo s pomočjo analize tridimenzionalnih struktur adeninskih vezavnih žepov obeh encimov. Pri GyrB iz *S. aureus* je hidrofobni vezavni žep za adenin manjši, saj je aminokislina metionin zamenjana z levcinom, dva valina pa sta zamenjana z večjima izolevcinoma. Čeprav se 4,5-dibromopirolna skupina v adeninski vezavni žep GyrB iz *E. coli* veže optimalno, predpostavljam, da je prevelika za vezavo v adeninski vezavni žep GyrB iz *S. aureus*. Za doseganje boljših zavirnih aktivnosti na bakterijo *S. aureus* bi bilo zato v nadaljnjih raziskavah smiselno, namesto 4,5-dibromopirolnega obroča v molekulo uvesti skupine s sterično manjšimi substituenti.

### 5.2.2. Površinska plazmonska resonanca (SPR)

Za dve izmed spojin, ki sta izkazovali obetavne zaviralne aktivnosti na DNA girazo B iz *E. coli* (**6a**:  $IC_{50} = 4.19 \mu M$  in **18a**:  $IC_{50} = 5.03 \mu M$ ) smo izvedli tudi biofizikalne meritve s tehniko površinske plazmonske resonance (SPR). SPR je biofizikalna tehnika, ki se uporablja za merjenje medmolekulskih interakcij med biomolekulami, pri čemer je ena od (makro)molekul, ki vstopata v interakcijo, imobilizirana na površino tanke plasti kovine, ki predstavlja del t. i. senzorja. Metoda omogoča ugotavljanje specifičnosti interakcij v realnem času med molekulami, pri čemer gre lahko za interakcije med dvema proteinoma, dvema molekulama DNA, molekulo DNA in proteinom, lipidom in proteinom ali pa med makromolekulo (navadno proteinom) in nemakromolekulskim ligandom. SPR lahko uporabljamo za ravnotežno analizo in določanje afinitetnih konstant, določanje kinetike asociacije in disociacije ter določanje koncentracije analita v vzorcu. (37) Rezultati meritev SPR so prikazani na grafih 1 in 2. Iz krivulj, ki prikazujejo odvisnost med odzivom in koncentracijo smo izračunali disociacijske konstante  $K_d$ , izmerjene vrednosti pa so bile v skladu s predhodno določenimi encimskimi aktivnostmi (**6a**:  $K_d = 2.73 \mu M$ , **18a**:  $K_d = 1.67 \mu M$ ).

**Preglednica I.** Zavirale aktivnosti na DNA girazo B in topoizomerazo IV za 4,5-dibromo-N-fenil-1*H*-pirol-2-karboksamide in *N*-fenil-1*H*-indol-2-karboksamide z benzen-1,4-diaminskim centralnim delom.

Spojina	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	n	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup> oz. RA (%) <sup>b</sup>			
				<i>E. coli</i> giraza	<i>S. aureus</i> giraza	<i>E. coli</i> topo IV	<i>S. aureus</i> topo IV
<b>5a</b>	4,5-dibromo-pirol-2-il	Et	0	68%	n.d. <sup>c</sup>	n.d.	n.d.
<b>5b</b>	4,5-dibromo-pirol-2-il	Me	1	2.09 $\mu$ M	75%	96%	104%
<b>5c</b>	4,5-dibromo-pirol-2-il	Me	2	65%	n.d.	n.d.	n.d.
<b>5d</b>	Indol-2-il	Et	0	100%	n.d.	n.d.	n.d.
<b>6a</b>	4,5-dibromo-pirol-2-il	H	0	4.19 $\mu$ M Kd = 2.73 $\mu$ M <sup>d</sup>	41%	81%	85%
<b>6b</b>	4,5-dibromo-pirol-2-il	H	1	0.568 $\mu$ M	119%	70%	95%
<b>6d</b>	Indol-2-il	H	0	26.0 $\mu$ M	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>a</sup> Koncentracija spojine, ki zmanjša aktivnost encima za 50%  
<sup>b</sup> Rezidualna aktivnost encima pri koncentraciji spojine 100 $\mu$ M  
<sup>c</sup> Ni določeno  
<sup>d</sup> Disociacijska konstanta, določena s površinsko plazmonsko resonanco

**Preglednica II.** Zaviralne aktivnosti za DNA girazo B in topoizomerazo IV pri 4,5-dibromo-N-fenil-1*H*-pirol-2-karboksamidih in *N*-fenil-1*H*-indol-2-karboksamidih s 4-aminofenolnim centralnim delom.

Spojina	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	R <sup>3</sup>	IC <sub>50</sub> ( $\mu$ M) <sup>a</sup> oz. RA (%) <sup>b</sup>			
				<i>E. coli</i> giraza	<i>S. aureus</i> giraza	<i>E. coli</i> topo IV	<i>S. aureus</i> topo IV
<b>11a</b>	4,5-dibromo-pirol-2-il	COOMe	H	88 $\mu$ M	n.d. <sup>c</sup>	n.d.	n.d.
<b>11b</b>	Indol-2-il	COOMe	H	71%	n.d.	n.d.	n.d.
<b>12a</b>	4,5-dibromo-pirol-2-il	COOH	H	1.40 $\mu$ M	149%	88%	100%
<b>12b</b>	Indol-2-il	COOH	H	47 $\mu$ M	79%	101%	91%
<b>28</b>	4,5-dibromo-pirol-2-il	COOMe	OCH <sub>2</sub> Ph	93%	n.d.	n.d.	n.d.
<b>29a</b>	4,5-dibromo-pirol-2-il	CONHNH <sub>2</sub>	OCH <sub>2</sub> Ph	104%	n.d.	n.d.	n.d.
<b>29b</b>	4,5-dibromo-pirol-2-il	COOH	OCH <sub>2</sub> Ph	10.10 $\mu$ M	n.d.	n.d.	n.d.
<b>30</b>	4,5-dibromo-pirol-2-il		OCH <sub>2</sub> Ph	56%	n.d.	n.d.	n.d.
<b>31</b>	4,5-dibromo-pirol-2-il	CONHNH <sub>2</sub>	H	97%	n.d.	n.d.	n.d.
<b>32</b>	4,5-dibromo-pirol-2-il		H	8.59 $\mu$ M	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>a</sup> Koncentracija spojine, ki zmanjša aktivnost encima za 50%

<sup>b</sup> Rezidualna aktivnost encima pri koncentraciji spojine 100  $\mu$ M

<sup>c</sup> Ni določeno

**Preglednica III.** Zaviralne aktivnosti za DNA girazo B in topoizomerazo IV pri 4,5-dibromo-N-fenil-1*H*-pirol-2-karboksamidih s heterocikličnim substituentom.

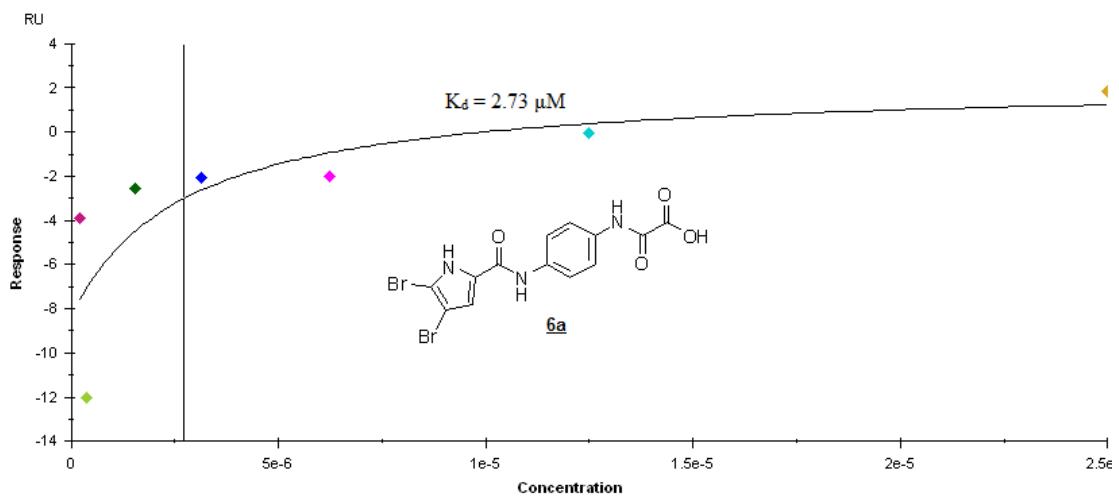
Spojina	R	IC <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup> oz. RA (%) <sup>b</sup>			
		<i>E. coli</i> giraza	<i>S. aureus</i> giraza	<i>E. coli</i> topo IV	<i>S. aureus</i> topo IV
<b>17a</b>		40 µM	n.d.	n.d.	n.d.
<b>18a</b>		5.03 µM Kd = 1,67 µM <sup>d</sup>	n.d.	105%	98%
<b>19a</b>		55.7 µM	n.d.	n.d.	n.d.
<b>49</b>		27%	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>a</sup> Koncentracija spojine, ki zmanjša aktivnost encima za 50%  
<sup>b</sup> Rezidualna aktivnost encima pri koncentraciji spojine 100µM  
<sup>c</sup> Ni določeno  
<sup>d</sup> Disociacijska konstanta, dolečena s površinsko plazmonske resonanco

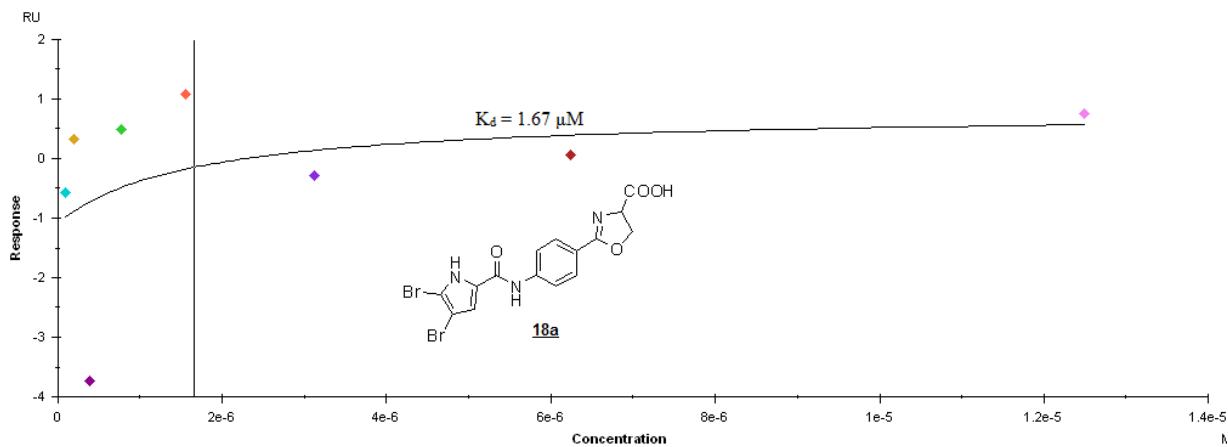
**Preglednica IV.** Zaviralne aktivnosti za DNA girazo B in topoizomerazo IV pri 4,5-dibromo-N-fenil-1*H*-pirol-2-karboksamidih s 4-aminobenzamidnim centralnim delom.

Spojina	R	IC <sub>50</sub> (µM) <sup>a</sup> or RA (%) <sup>b</sup>			
		<i>E. coli</i> giraza	<i>S. aureus</i> giraza	<i>E. coli</i> topo IV	<i>S. aureus</i> topo IV
<b>38a</b>	CONHNH <sub>2</sub>	3.20 µM	n.d.	n.d.	n.d.
<b>39a</b>		0.360 µM	n.d.	n.d.	n.d.

<sup>a</sup> Koncentracija spojine, ki zmanjša aktivnost encima za 50%  
<sup>b</sup> Rezidualna aktivnost encima pri koncentraciji spojine 100µM  
<sup>c</sup> Ni določeno



**Graf 1:** Rezultati SPR meritev za spojino **6a** s prikazano izračunano vrednostjo  $K_d$ ;  $R_{max} = 10.56$ , offset = -8.282,  $Chi^2 = 11.3$ .



**Graf 2:** Rezultati SPR meritev za spojino **18a** s prikazano izračunano vrednostjo  $K_d$ ;  $R_{max} = 1.86$ , offset = -1.080,  $Chi^2 = 2.71$ .

### 5.2.3. Protibakterijska aktivnost

Protibakterijska aktivnost je bila določena na dveh po Gramu pozitivnih (*E. faecalis*, ATCC 29212 in *S. aureus*, ATCC 25923) in na dveh po Gramu negativnih (*E. coli*, ATCC 25922 in *P. aeruginosa*, ATCC 27853) bakterijskih sevih na Univerzi v Helsinkih na Finskem. Nekatere spojine so bile dodatno mikrobiološko ovrednotene v podjetju Fidelta v Zagrebu na dveh sevih bakterije *E. coli*, t.j. sevu  $\Delta tolC$  z mutiranim genom za TolC, ki je zaradi odsotnosti izlivnih črpalk bolj dovzeten za antibiotike, detergente in barvila ter sevu  $\Delta impA$  (“increased membrane permeability”) z mutiranim genom za ImpA, ki ima zato večjo prepustnost zunanje celične stene. S testiranjem na mutirana seva smo želeli preučiti vpliv zmanjšanega aktivnega izčrpavanje spojin iz bakterijske celice in vpliv povečanja permeabilnosti zunanje celične stene bakterij na protibakterijsko aktivnost. Rezultati so podani kot odstotek zaviranja bakterijske rasti pri 50 µM koncentraciji zaviralca po 24 h izpostavitvi, ali kot vrednosti MIC<sub>50</sub>, ki nam pove, kakšna je minimalna koncentracija zaviralca, pri kateri pride do 50% inhibicije rasti mikroorganizma (preglednica V).

Razen spojine **6d**, ki je izkazovala 21% inhibicijo rasti bakterije *P. aeruginosa* (50 µM koncentracija, 24 h izpostavitev), ostale testirane spojine niso imele protibakterijske aktivnosti. Iz primerjav aktivnosti spojin na sevu bakterije *E. coli* divjega tipa (“wild type”) in sevu *E. coli*  $\Delta tolC$  smo ugotovili, da odsotnost izlivnih črpalk ne vpliva na njihovo učinkovitost. Tudi povečanje permeabilnosti celične stene zaradi mutacij v genu *impA* v splošnem ni povzročilo izboljšanja protibakterijske aktivnosti, z izjemo spojine **18a**, ki je na ta sev izkazovala 128 µg/mL vrednost MIC<sub>50</sub>. Za doseganje boljše protibakterijske učinkovitosti bi bilo potrebno v prvi vrsti izboljšati encimsko aktivnost tako na GyrB iz bakterije *E. coli*, kot na GyrB iz bakterije *S. aureus*, poleg tega pa bi bilo potrebno izboljšati tudi fizikalno-kemijske lastnosti spojin, kar bi omogočilo lažje prehajanje celične stene. Eden izmed načinov za doseganje boljše protibakterijske aktivnosti je tudi zamenjava močno kislih funkcionalnih skupin, kot je karboksilna skupina, z njenimi mimetiki, npr. z 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolom ali tetrazolom.

**Preglednica V:** Rezultati protibakterijskih testov na *E. coli*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *P. aeruginosa*, *E. coli*  $\Delta tolC$  in *E. coli*  $\Delta impA$ , za najbolj obetavne 4,5-dibromo-N-fenil-1H-pirol-2-karboksamidne in *N*-fenil-1H-indol-2-karboksamidne inhibitorje DNA giraze B.

Spojina	Struktura	Zaviranje rasti <sup>a</sup> (%) oz. MIK <sub>50</sub> <sup>b</sup> ( $\mu\text{g/mL}$ )					
		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. coli</i> $\Delta tolC^c$	<i>E. coli</i> $\Delta impA^d$
<b>5b</b>		8%	-14%	-5%	9%	>256 $\mu\text{g/mL}$	>256 $\mu\text{g/mL}$
<b>6a</b>		8%	5 %	9%	13%	>256 $\mu\text{g/mL}$	>256 $\mu\text{g/mL}$
<b>6b</b>		8%	-7%	-4%	13%	>256 $\mu\text{g/mL}$	>256 $\mu\text{g/mL}$
<b>6d</b>		8%	-6%	9%	21%	n.d.	n.d.
<b>11a</b>		8%	7%	9%	11%	n.d.	n.d.
<b>12a</b>		9%	5%	5%	14%	>256 $\mu\text{g/mL}$	>256 $\mu\text{g/mL}$
<b>12b</b>		6%	10%	-1%	9%	n.d.	n.d.
<b>17a</b>		>256 $\mu\text{g/mL}$	n.d.	n.d.	n.d.	>256 $\mu\text{g/mL}$	>256 $\mu\text{g/mL}$
<b>18a</b>		>256 $\mu\text{g/mL}$	n.d.	n.d.	n.d.	128 $\mu\text{g/mL}$	>256 $\mu\text{g/mL}$

<sup>a</sup> Zaviranje rasti mikroorganizmov v % pri 50  $\mu\text{M}$  koncentraciji zaviralca po 24 h izpostavitvi.  
<sup>b</sup> Minimalna koncentracija zaviralca, pri kateri pride do 50% inhibicije rasti mikroorganizma.  
<sup>c</sup> Sev z mutiranim genom *tolC*, zaradi odsotnosti izlivnih črpalk bolj dovzetem za antibiotike, detergente in barvila.  
<sup>d</sup> Sev z mutiranim genom *impA*, zaradi večje prepustnosti celične stene bolj dovzetem za antibiotike, detergente in barvila.  
<sup>e</sup> Ni določeno.

### 5.3. ZAKLJUČEK

V okviru magistrskega dela smo sintetizirali in okarakterizirali 23 potencialnih zaviralcev bakterijske DNA giraze B. Vsem spojinam je bil skupen 4,5-dibromo-*N*-fenil-1*H*-pirol-2-karboksamidni oz. *N*-fenil-1*H*-indol-2-karboksamidni skelet, glede na substituente pa smo jih razdelili v štiri strukturne razrede. Pripravljeni spojini smo biološko ovrednotili z encimskimi, biofizikalnimi (SPR) in protibakterijskimi testi. Encimske teste smo izvedli na encimih DNA giraze in topoizomeraze IV iz bakterij *E. coli* in *S. aureus*, protibakterijske aktivnosti pa smo določili na dveh po Gramu pozitivnih (*E. faecalis* in *S. aureus*) in dveh po Gramu negativnih (*E. coli* in *P. aeruginosa*) bakterijah. Dodatno smo nekatere spojine mikrobiološko ovrednotili še na sevu bakterije *E. coli* z odsotnimi izlivnimi črpalkami in na sevu *E. coli* s povečano permeabilnostjo zunanje celične stene.

4,5-Dibromopirolamidne spojine so se izkazale za bolj aktivne od indolamidnih, prav tako so bile spojine s prosto karboksilno skupino bolj aktivne od njihovih analogov, ki so vsebovali metilne oz. etilne estrske skupine. Najbolj aktivne spojine (**5b**, **6a**, **6b**, **12a**, **18a**, **29b**, **32**, **38a**, **39a**) so imele vrednosti IC<sub>50</sub> na encimu DNA giraza iz *E. coli* manjše od 10 µM, kot najbolj aktivna pa se je izkazala spojina **39a** z IC<sub>50</sub> vrednostjo 360 nM. Za dve izmed spojini (**6a** in **18a**) smo vezavo v aktivno mesto GyrB dodatno potrdili z biofizikalno tehniko površinske plazmonske resonance, izmerjene vrednosti disociacijskih konstant pa so bile v skladu s predhodno določenimi encimskimi aktivnostmi (**6a**: K<sub>d</sub> = 2.73 µM, **18a**: K<sub>d</sub> = 1.67 µM). Zaradi strukturnih razlik med vezavnim mestoma na GyrB iz bakterije *E. coli* in vezavnim mestom na GyrB iz bakterije *S. aureus*, večina spojin na slednjega ni izkazovala obetavnih aktivnosti, relativno dobro zaviralno aktivnost na GyrB iz *S. aureus* je imela zgolj spojina **6a** (RA = 41%). Z izjemo spojine **6d**, ki je izkazovala 21% inhibicijo rasti seva *P. aeruginosa*, ostale testirane spojine žal niso imele občutnejše protibakterijske aktivnosti. Izboljšano protibakterijsko aktivnost pričakujemo od analogov v katerih smo kislo karboksilno skupino substituirali z njenim mimetikom, 5-okso-4,5-dihidro-1,3,4-oksadiazolom, s čemer si obetamo njihovo lažje prehajanje skozi bakterijsko celično steno. Spojine bodo testirane v kratkem.

Rezultati pridobljeni tekom magistrskega dela predstavljajo pomemben prispevek k razvoju novih zaviralcev bakterijske DNA giraze B. Glede na obetavne rezultate encimskih testov predstavljajo predvsem 4,5-dibromo-*N*-fenil-1*H*-pirol-2-karboksamidni zavralci DNA giraze

B zanimivo skupino spojin za nadaljnjo optimizacijo. S pomočjo strukturno podprtega načrtovanja bi lahko izboljšali njihovo zaviralno aktivnost, z iskanjem heterocikličnih mimetikov karboksilne skupine pa bi lahko izboljšali njihove fizikalno-kemijeske lastnosti in tako dosegli boljše prehajanje celične stene in s tem dobro protibakterijsko aktivnost.

## 6. LITERATURA

1. Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, 2002: 4-5, 34-44, 429, 509-512.
2. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: Rang and Dale's Pharmacology 6<sup>th</sup> ed, Churchill Livingstone Elsevier, Philadelphia, 2007: 647- 678.
3. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry 5<sup>th</sup> ed, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2002: 37-62, 819- 825, 829, 830.
4. Thomas G: Medicinal Chemistry An Introduction, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, 2000: 159-165.
5. [http://www.frontiersin.org/files/Articles/40475/fmicb-04-00007-HTML/image\\_m/fmicb-04-00007-g001.jpg](http://www.frontiersin.org/files/Articles/40475/fmicb-04-00007-HTML/image_m/fmicb-04-00007-g001.jpg), dostopano dne 17.7.2014.
6. Sherer B, Hull K, Green O, Basarab G, Hauck S, Hill P, Loch III JT, Mullen G, Bist S, Bryant J, Boriack-Sjordin A, Read J, DeGrace N, Urias-Nickelsen M, Illingworth RN, Eakin AE: Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: Optimization of antibacterial activity and efficacy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2011; 21 (24): 7416-7420.
7. Trzoss M, Bensen DC, Li X, Chen Z, Lam T, Zgang J, Creighton CJ, Cunningham ML, Kwan B, Stidham M, Nelson K, Brown-Driver V, Castellano A, Shaw KJ, Lightstone FC, Wong S, Nguyen TB, Finn J, Tari LW: Pyrrolopyrimidine inhibitors of DNA gyrase B (GyrB) and topoisomerase IV (ParE), Part II: Development of inhibitors with broad spectrum, Gram-negative antibacterial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2013; 23 (5): 1537-1543.
8. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 244, 251-257.
9. Devlin TM: Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations 6<sup>th</sup> ed, Wiley-Liss, Hoboken, 2006: 51-53.
10. [http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/large\\_fig/c\\_fig06\\_04.html](http://csls-text3.c.u-tokyo.ac.jp/large_fig/c_fig06_04.html), dostopano dne 17.7.2014.

11. [http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Deoxy\\_Ribose\\_Nucleic\\_Acid4-Super\\_Coiling.htm](http://mol-biol4masters.masters.grkraj.org/html/Deoxy_Ribose_Nucleic_Acid4-Super_Coiling.htm), dostopano dne 17.7.2014.
12. Tomasić T, Peterlin-Mašić L: Prospects for Developing New Antibacterial Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases. Current Topics in Medicinal Chemistry 2014; 14 (1): 130-151.
13. Oblak M, Kotnik M, Solmajer T: Discovery and Development of ATPase Inhibitors of DNA Gyrase as Antibacterial Agents. Current Medicinal Chemistry 2007; 14 (19): 2033-2047.
14. Škedelj V, Tomasić T, Peterlin Mašić L, Zega A: ATP-Binding Site of Bacterial Enzymes as a Target for Antibacterial Drug Design. Journal of Medicinal Chemistry 2010; 54: 915–929.
15. Eakin AE, Green O, Hales N, Walkup GK, Bist S, Singh A, Mullen G, Bryant J, Embrey K, Gao N, Breeze A, Timms D, Andrews B, Uria-Nickelsen M, Demeritt J, Loch III JT, Hull K, Blodgett A, Illingworth RN, Prince B, Boriack-Sjordin A, Hauck S, MacPherson LJ, Ni B, Sherer B: Pyrrolamide DNA Gyrase Inhibitors: Fragment-Based Nuclear Magnetic Resonance Screening To Identify Antibacterial Agents. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2012; 56 (3): 1240-1246.
16. Uria-Nickelsen M, Blodgett A, Kamp H, Eakin A, Sherer B, Green O: Novel DNA gyrase inhibitors: Microbiological characterization of pyrrolamides. International Journal of Antimicrobial Agents 2013; 41 (1): 28-35.
17. Basarab GS, Manchester JI, Bist S, Boriack-Sjordin AP, Dangel B, Illingworth R, Sherer BA, Sriram S, Uria-Nickelsen M, Eakin AE: Fragment-to-Hit-to-Lead Discovery of a Novel Pyridylurea Scaffold of ATP Competitive Dual Targeting Type II Topoisomerase Inhibiting Antibacterial Agents. Journal of Medicinal Chemistry 2013; 56 (21): 8712-8735.
18. Tari LW, Trzoss M, Bensen DC, Li X, Chen Z, Lam T, Zhang J, Creighton CJ, Cunningham ML, Kwan B, Stidham M, Shaw KJ, Lightstone FC, Wong SE, Nguyen TB, Nix J, Finn J: Pyrrolopyrimidine inhibitors of DNA gyrase B (GyrB) and topoisomerase IV (ParE), Part I: Structure guided discovery and optimization of dual targeting agents with potent,

broad-spectrum enzymatic activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2013; 23 (5): 1529-1536.

19. Brvar M, Perdih A, Renko M, Anderluh G, Turk D, Solmajer T: Structure-Based Discovery of Substituted 4,5'-Bithiazoles as Novel Dna Gyrase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 2012; 55 (14): 6413-6426.

20. Zidar N, Jakopin Ž, Madge DJ, Chan F, Tytgat J, Peigneur S, Sollner Dolenc M, Tomašić T, Ilaš J, Peterlin Mašić L, Kikelj D: Substituted 4-phenyl-2-aminoimidazoles and 4-phenyl-4,5-dihydro-2-aminoimidazoles as voltage-gated sodium channel modulators. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 74: 23-30.

21. Zhu X, Zhang X, Xin H, Yan H: A Transformation of N-Alkylated Anilines to N-Aryloxamates. *HelveticaChimica Acta* 2013; 96; 1545-1546.

22. Trstenjak U, Ilaš J, Kikelj D: Studies towards the Synthesis of AlkylN-(4-Nitrophenyl)-3/2-oxomorpholine-2/3-carboxylates. *HelveticaChimica Acta* 2013; 96: 2167-2170.

23: Balasubramaniyan V, Bhatia VG, Wagh SB: Facile esterification of carboxylic acids with organophosphorus reagents : Novel application of alkylphosphoric esters. *Tetrahedron* 1983; 39 (9); 1475-1485.

24: Collingwood SP, Hayler J , Le Grand DM, Mattes H, Menear KA; Walker CV, Cockcroft W: Preparation of anilinopurine derivatives as inhibitors of tyrosine protein kinase syk. PCT Int. Appl, Patent number WO 2001009134 A1 20010208, date of patent Aug. 8, 2001.

25. Dolle RE, Chu G, Gu M: Preparation of N-aminoalkyl amides as agonists of the κ opioid receptor useful against gastrointestinal disorders, pain, and pruritus.U.S. Pat. Appl. Publ., Patent number US 20050107355 A1 20050519, date of patent May 19, 2005.

26. Oguchi M, Wada K, Honma H, Tanaka A, Kaneko T, Sakakibara S, Ohsumi J, Serizawa N, Fujiwara T, Horikoshi H, Fujita T: Molecular Design, Synthesis, and Hypoglycemic Activity of a Series of Thiazolidine-2,4-diones. *Journal of Medicinal Chemistry* 2000; 43 (16): 3052-3066.

27. Vivek D, Kratika D, Goyal S, Parihar MS., Singh M: Synthesis and in-vitro anthelmintic activity of some 4-aminophenol derivatives. International Journal of Pharmaceutical Research 2010; 2: 21-24.
28. Dawsey AC, Li V, Hamilton KC, Wang J, Williams TJ: Copper-catalyzed oxidation of azolines to azoles. Dalton Trans. 2012; 41 (26): 7994–8002.
29. Miyatake K, Kaga S: Studies on Hippuric Acid Derivatives .2. Synthesis of Aminohippuric Acids. Yakugaku Zasshi 1952; 72 (9): 1160-1161.
30. Zidar N et.al.: 4,5-Dibromopyrrolamides and Indolamides as ATP competitive DNA Gyrase B Inhibitors: Design, Synthesis, and Evaluation. Članek še ni objavljen.
31. Dubis AT, Domagala M, Grabowski S: Spectroscopic and theoretical studies on some new pyrrol-2-yl chloromethyl ketones. New Journal of Chemistry 2010; 34: 556-566.
32. Tišler M: Organska kemija 3. izdaja, DZS, Ljubljana, 1988: 128-129.33. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmacevtska kemija III. Vaje in seminarji: Dodatne vsebine za razumevanje, Metode N- in O- aciliranja, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010.
34. Movassagh B, Balalaie S, Shaygan P: A new and efficient protocol for preparation of thiol esters from carboxylic acids and thiols in the presence of 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluroniumtetrafluoroborate (TBTU). ARKIVOC 2007; 13: 47-52.
35. [http://www.chem.umn.edu/groups/taton/chem8361/Handouts/10\\_17.pdf](http://www.chem.umn.edu/groups/taton/chem8361/Handouts/10_17.pdf), dostopano dne 31.7.2014.
36. <http://140.123.79.90/~seekwei/thesis-reference/37-b-1-s2.0-S0040402005013876-mainAmide%20bond%20formation.pdf>, dostopano dne 31.7.2014.
37. <http://www.sprpages.nl/spr-overview/spr-theory.html>, dostopano dne 27.8.2014.