

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

**ANDREJA JERNEJ**

**MAGISTRSKA NALOGA**

**ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA**

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ANDREJA JERNEJ

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA POTENCIALNIH ZAVIRALCEV  
GIRAZE B Z AMINOETANOLNIM FRAGMENTOM**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF POTENTIAL GYRASE B  
INHIBITORS WITH AMINOETHANOL FRAGMENT**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

Magistrsko naložko sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom prof. dr. Danijela Kiklja, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Roka Frlana, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo ter Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Biološka testiranja so bila opravljena na Fakulteti za farmacijo.

### **Zahvala**

Zahvaljujem se prof. dr. Danijelu Kiklju za pripravljenost za sodelovanje pri izdelavi magistrske naloge in asist. dr. Roku Frlanu za vso potrpežljivost in predano znanje. Iskrena hvala tudi staršem in družini za vso podporo v času študija, prijateljem za prijetna druženja ter fantu Emilu za spodbudne besede.

### **Izjava**

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

Ljubljana, 2015

Andreja Jernej

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

Član komisije: doc. dr. Rok Dreu, mag. farm.

**VSEBINA**

1 UVOD .....	1
1.1 Protibakterijske učinkovine .....	1
1.2 Bakterijska rezistenza .....	3
1.3 DNK topoizomeraze .....	4
1.4 Bakterijska DNK giraza .....	5
1.5 Inhibitorji DNK giraze A .....	7
1.6 Inhibitorji DNK giraze B .....	8
2 NAČRT DELA .....	12
3 MATERIALI IN METODE .....	15
3.1 Materiali .....	15
3.2 Metode .....	15
4 EKSPERIMENTALNO DELO .....	17
4.1 Sinteza 2-(4-nitrofenil)-2-oksoetanaminijevega klorida ( <b>1a</b> ) in 2-(3-nitrofenil)-2-oksoetanaminijevega klorida ( <b>1b</b> ) .....	19
4.2 Sinteza 2-amino-1-(4-nitrofenil)etanola ( <b>2a</b> ) in 2-amino-1-(3-nitrofenil)etanola ( <b>2b</b> ) .....	20
4.3 Sinteza 4,5-dibromo- <i>N</i> -(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida ( <b>3a</b> ), 4,5-dibromo- <i>N</i> -(2-hidroksi-2-(3-nitrofenil)ethyl)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida ( <b>3b</b> ) in 4,5-dikloro- <i>N</i> -(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida ( <b>3c</b> ) .....	22
4.4 Sinteza <i>N</i> -(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)-1 <i>H</i> -indol-2-karboksamida ( <b>4a</b> ) in <i>N</i> -(2-hidroksi-2-(3-nitrofenil)ethyl)-1 <i>H</i> -indol-2-karboksamida ( <b>4b</b> ) .....	25
4.5 Sinteza 2-kloro- <i>N</i> -(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)acetamida ( <b>5a</b> ) in 2-kloro- <i>N</i> -(2-hidroksi-2-(3-nitrofenil)ethyl)acetamida ( <b>5b</b> ) .....	27
4.6 Sinteza <i>terc</i> -butil (2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)karbamata ( <b>6</b> ) .....	29
4.7 Sinteza <i>terc</i> -butil (2-(4-aminofenil)-2-hidroksietil)karbamata ( <b>7</b> ) .....	30
4.8 Sinteza 2-(4-aminofenil)-2-hidroksietanaminijevega klorida ( <b>8</b> ) .....	31

4.9 Sinteza 4-(1-hidroksi-2-nitroethyl)benzojske kisline ( <b>9</b> ) .....	31
4.10 Sinteza 4-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-1-hidroksietil)benzojske kisline ( <b>10</b> ) .....	32
4.11 Sinteza 2-hidroksi-2-(4-(metoksikarbonil)fenil)etanaminijevega klorida ( <b>11</b> ) .....	33
4.12 Sinteza metil 4-(2-(4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamid)-1-hidroksietil)benzoata ( <b>12</b> ) .....	34
4.13 Poskus sinteze <i>N</i> -(2-(4-aminofenil)-2-hidroksietil)-1 <i>H</i> -indol-2-karboksamida ( <b>13a</b> ) in <i>N</i> -(2-(3-aminofenil)-2-hidroksietil)-4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida ( <b>13b</b> ) ....	36
4.14 Poskus sinteze 6-(4-nitrofenil)morfolin-3-ona ( <b>14</b> ) .....	36
4.15 Poskus sinteze 6-(3-nitrofenil)morfolin-3-ona ( <b>15</b> ) .....	37
5 REZULTATI IN RAZPRAVA.....	39
5.1 KOMENTAR K SINTEZNIM POSTOPKOM .....	39
5.1.1 Sinteza 2-(4-nitrofenil)-2-oksoetanaminijevega klorida ( <b>1a</b> ) in 2-(3-nitrofenil)-2-oksoetanaminijevega klorida ( <b>1b</b> ).....	39
5.1.2 Sinteza 2-amino-1-(4-nitrofenil)etanola ( <b>2a</b> ) in 2-amino-1-(3-nitrofenil)etanola ( <b>2b</b> ).....	39
5.1.3 Sinteza 4,5-dibromo- <i>N</i> -(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida ( <b>3a</b> ), 4,5-dibromo- <i>N</i> -(2-hidroksi-2-(3-nitrofenil)ethyl)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida ( <b>3b</b> ) in 4,5-dikloro- <i>N</i> -(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida ( <b>3c</b> ) .....	40
5.1.4 Sinteza <i>N</i> -(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)-1 <i>H</i> -indol-2-karboksamida ( <b>4a</b> ) in <i>N</i> -(2-hidroksi-2-(3-nitrofenil)ethyl)-1 <i>H</i> -indol-2-karboksamida ( <b>4b</b> ) .....	41
5.1.5 Sinteza 2-kloro- <i>N</i> -(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)acetamida ( <b>5a</b> ) in 2-kloro- <i>N</i> -(2-hidroksi-2-(3-nitrofenil)ethyl)acetamida ( <b>5b</b> ).....	42
5.1.6 Sinteza <i>terc</i> -butil (2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)karbamata ( <b>6</b> ) .....	43
5.1.7 Sinteza <i>terc</i> -butil (2-(4-aminofenil)-2-hidroksietil)karbamata ( <b>7</b> ).....	43
5.1.8 Sinteza 2-(4-aminofenil)-2-hidroksietanaminijevega klorida ( <b>8</b> ) .....	44
5.1.9 Sinteza 4-(1-hidroksi-2-nitroethyl)benzojske kisline ( <b>9</b> ) .....	45
5.1.10 Sinteza 4-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-1-hidroksietil)benzojske kisline ( <b>10</b> ) .....	45

5.1.11 Sinteza 2-hidroksi-2-(4-(metoksikarbonil)fenil)etanaminijevega klorida ( <b>11</b> )	46
5.1.12 Sinteza metil 4-(2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamid)-1-hidroksietil)benzoata ( <b>12</b> )	47
5.1.13 Poskus sinteze <i>N</i> -(2-(4-aminofenil)-2-hidroksietil)-1 <i>H</i> -indol-2-karboksamida ( <b>13a</b> ) in <i>N</i> -(2-(3-aminofenil)-2-hidroksietil)-4,5-dibromo-1 <i>H</i> -pirol-2-karboksamida ( <b>13b</b> )	48
5.1.14 Poskus sinteze 6-(4-nitrofenil)morfolin-3-ona ( <b>14</b> ) in 6-(3-nitrofenil)morfolin-3-ona ( <b>15</b> )	48
5.2 KOMENTAR BIOLOŠKIH TESTIRANJ	50
6 SKLEP	52
7 LITERATURA	53

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Sestava giraze in mehanizem delovanja .....	6
Slika 2: Predstavniki vseh štirih generacij kinolonov .....	8
Slika 3: Model vezave klorobiocina v ATP vezavno mesto DNK giraze B <i>E.coli</i> . ....	9
Slika 4: Predstavniki novih sinteznih inhibitorjev giraze B .....	11
Slika 5: Pomembne interakcije za vezavo izhodiščne spojine v girazo B <i>S.aureus</i> .....	13
Slika 6: Načrtovane spremembe izhodiščne spojine.....	14
Slika 7: Reakcija alkil halidov s heksametilentetraminom vodi v tvorbo produkta heksametilentetraminijeve soli .....	39
Slika 8: Reakcija heksametilentetraminijeve soli po dodatku konc. HCl in EtOH vodi v tvorbo produktov aminijevega klorida, amonijevega klorida in formaldehida .....	39
Slika 9: Reakcija karbonilne skupine z NaBH <sub>4</sub> in tvorba alkohola .....	40
Slika 10: Sinteza amidne vezi med karboksilno kislino in aminom z EDC in HOBr.....	41
Slika 11: Mehanizem reakcije med kislinskim kloridom in aminom ob dodatku trietilamina.....	43
Slika 12: Mehanizem reakcije med aminom in Boc <sub>2</sub> O.....	43
Slika 13: Predlagan mehanizem redukcije aromatske nitro skupine v amino skupino. ....	44
Slika 14: Mehanizem odščite <i>terc</i> -butil karbamata s HCl.....	44
Slika 15: Mehanizem reakcije med nitrometanom in aldehydom v prisotnosti baze. ....	45
Slika 16: Mehanizem reakcije tvorbe kislinskega klorida med kislino in SOCl <sub>2</sub> .....	46
Slika 17: Mehanizem reakcije tvorbe metilnega estra med kislinskim kloridom in metanolom. ....	46
Slika 18: Mehanizem reakcije med DMAP in <i>O</i> -acilizosečnino.....	47
Slika 19: Primer ciklizacije v literaturnem viru (46) .....	49
Slika 20: Primer ciklizacije v literaturnem viru (47) .....	49
Slika 21: Primer ciklizacije v literaturnem viru (48) .....	49

**KAZALO PREGLEDNIC**

Preglednica I: Predstavniki poddružin DNK topoizomeraz. ....	5
Preglednica II: Seznam končnih spojin in rezultati bioloških testiranj.....	50

## POVZETEK

Odkritje in uporaba protibakterijskih učinkovin sta bila dva izmed večjih znanstvenih dosežkov 20. stoletja. Njihova široka uporaba je nato v naslednjih desetletjih značilno prispevala k razvoju bakterijske odpornosti na večino znanih protibakterijskih učinkovin. Brez nadaljnega razvoja na tem področju nam zato grozi, da trenutno dostopne terapije v prihodnosti ne bodo več učinkovite. Za uspešen boj proti rezistenci nujno potrebujemo nove učinkovine z novimi mehanizmi delovanja.

DNK giraza je dobro raziskana in validirana tarča za protibakterijske učinkovine, fluorokinoloni in aminokumarini pa so njeni že dolgo poznani zaviralci. Zaradi vedno večjega pojava odpornosti na fluorokinolone se je iskanje novih zaviralcev giraze usmerilo na girazno podenoto B, ki je odgovorna za ATPazno aktivnost.

V sklopu magistrske naloge smo načrtovali potencialne zaviralce ATPazne aktivnosti giraze B s posnemanjem strukture 2-[(3S,4R)-4-{{[(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-il)karbonil]amino}-3-fluoropiperidin-1-il]-1,3-tiazol-5-karboksilne kisline. Sintetizirali smo šest končnih spojin (spojine **3a**, **3b**, **3c**, **4a**, **4b** in **12**) in jih ovrednotili z ustreznimi analiznimi metodami ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS, IR, HPLC). Pripravili smo učinkovito sintezno pot do derivatov *N*-(2-hidroksi-2-feniletil)-1*H*-pirol-2-karboksamida in *N*-(2-hidroksi-2-feniletil)-1*H*-indol-2-karboksamida. Postavljena sintezna pot in vsa spoznanja omogočajo nadaljnje delo ter sintezo učinkovitejših zaviralcev giraze B.

**Kjučne besede:** protibakterijske učinkovine, bakterijska rezistanca, giraza B, *N*-(2-hidroksi-2-feniletil)-1*H*-pirol-2-karboksamid, *N*-(2-hidroksi-2-feniletil)-1*H*-indol-2-karboksamid

**ABSTRACT**

The discovery and utilization of antibacterial agents have been two of major scientific achievements of the 20th century. Their wide use in the next decades has characteristically contributed to the development of bacterial resistance to most of the known antibacterial agents. Without further development in this field we are facing threat that currently available treatment will no longer be effective in the future. To fight successfully against resistance we urgently need novel agents with new mechanisms of action.

DNA gyrase is a well-investigated and well-validated target for antibacterial agents. Fluoroquinolones and aminocoumarins are its long known inhibitors. Due to the increasing emergence of fluoroquinolone resistance the search for novel gyrase inhibitors has redirected towards DNA gyrase B subunit with ATPase activity.

As part of a master's thesis we designed potential inhibitors of DNA gyrase B subunit with ATPase activity by mimicking the structure of 2-[(3S,4R)-4-{[(3,4-dichloro-5-methyl-1*H*-pyrrol-2-yl)carbonyl]amino}-3-fluoropiperidin-1-yl]-1,3-thiazole-5-carboxylic acid. Six final compounds (compounds **3a**, **3b**, **3c**, **4a**, **4b** and **12**) were synthesized and evaluated by the appropriate analytical methods ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS, IR, HPLC). An efficient synthesis route to *N*-(2-hydroxy-2-phenylethyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide and *N*-(2-hydroxy-2-phenylethyl)-1*H*-indole-2-carboxamide derivatives was prepared. Developed synthesis route and all the research findings are enabling further work and synthesis of more effective inhibitors of DNA gyrase B subunit.

**Key words:** antibacterial agents, bacterial resistance, DNA gyrase B subunit, *N*-(2-hydroxy-2-phenylethyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide, *N*-(2-hydroxy-2-phenylethyl)-1*H*-indole-2-carboxamide

**SEZNAM OKRAJŠAV**

ATP	adenozin-5'-trifosfat
ATR	spektroskopija oslabljenega popolnega odboja
Boc	<i>terc</i> -butiloksikarbonil
Boc <sub>2</sub> O	di- <i>terc</i> -butil dikarbonat
bs	širok singlet
CDCl <sub>3</sub>	devteriran kloroform
CD <sub>3</sub> OD	devteriran metanol
CTD	C-terminalna domena GyrA
d	dublet
dd	dublet dubleta
DKM	diklorometan
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO-d <sub>6</sub>	devteriran dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ekv.	ekvivalent
ESI	ionizacija z razprševanjem
Et <sub>3</sub> N	trietilamin
EtOAc	etyl acetat
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila (U.S. Food and Drug Administration)
GAIN	ameriški zakon, ki spodbuja k razvoju novih protibakterijskih učinkovin (Generating Antibiotics Incentives Now)
GHKL	superdružina encimov v katero spadajo DNK giraza, Hsp90, histidin kinaze in MutL encimi
GyrA	girazna podenota A

GyrB	girazna podenota B
HOBr	1-hidroksibenzotriazol
HMTA	heksametilentetramin
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti
IC <sub>50</sub>	je koncentracija inhibitorja, ki je potrebna za 50 % inhibicijo encima
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitvena konstanta
MDR	multirezistentni sevi
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
Mr	molekulska masa
MRSA	proti meticilinu odporni <i>S. aureus</i>
MS	masna spektrometrija
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
PABA	<i>para</i> -aminobenzojska kislina
RA	rezidualna aktivnost
Rf	retencijski faktor
RNK	ribonukleinska kislina
rt	sobna temperatura (room temperature)
s	singlet
TFA	trifluoroocetna kislina
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija
t <sub>R</sub>	retencijski čas
VRE	proti vankomicinu odporni <i>Enterococcus</i>
VRSA	proti vankomicinu odporni <i>S. aureus</i>

## 1 UVOD

### 1.1 Protibakterijske učinkovine

Odkritje in uporaba protibakterijskih učinkovin sta v začetku 20. stoletja povsem spremenila in izboljšala zdravljenje bakterijskih infekcij. Leta 1909 je Paul Ehrlich sintetiziral organoarzenovo spojino Salvarsan, ki se je uporabljala pri zdravljenju sifilisa. Alexander Fleming je do pomembnega odkritja penicilina prišel leta 1928, vendar je le-ta prišel v klinično uporabo šele po letu 1940 zaradi težav s čiščenjem in stabilnostjo aktivne substance. Sledilo je odkritje Prontosila s strani Bayerjevih kemikov, Gerhard Domagk pa je opravil testiranja na protibakterijsko delovanje pri številnih boleznih. Prontosil se je kasneje izkazal za predzdravilo sulfanilamida. (1)

Po odkritju prvih treh protibakterijskih učinkovin je sledilo masovno raziskovanje in odkritje velikega števila protibakterijskih spojin z različnimi mehanizmi delovanja. Te spojine so razdelili v različne razrede glede na njihov mehanizem delovanja (2, 3):

#### 1. Zaviralci sinteze celične stene:

- a. Zavirajo sintezo peptidoglikana preko kompetitivne inhibicije transpeptidaze:  
β-laktamski antibiotiki (penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami)
- b. Zavirajo sintezo peptidoglikana preko vezave na D-Ala-D-Ala konec peptidoglikanske verige ter s tem preprečijo premreženje peptidoglikana:  
glikopeptidni antibiotiki (vankomicin)
- c. Ovira defosforilacijo fosfolipidnega prenašalca, ki prenaša gradnike za izgradnjo peptidoglikana na zunanjou stran membrane: bacitracin (4)

#### 2. Zaviranje sinteze proteinov:

- a. Vezava na 30S podenoto ribosoma: aminoglikozidi (gentamicin), tetraciklini (doksiciklin), gliciklini (tigeciklin)
- b. Vezava na 50S podenoto ribosoma: makrolidi (eritromycin), amfenikoli (kloramfenikol), linkozamidi (klindamicin), oksazolidinoni (linezolid), streptogramini (kinupristin/dalfopristin)

#### 3. Zaviranje sinteze nukleinskih kislin:

- a. Zavirajo replikacijo in transkripcijo DNK preko inhibicije DNK giraze in topoizomeraze IV: fluorokinoloni (levofloksacin)
- b. Zavirajo sintezo RNK preko inhibicije RNK polimeraze: rifampicin

#### 4. Zaviranje celičnega metabolizma:

- a. Zavirajo sintezo folne kisline: sulfanilamidi (sulfametoksazol) delujejo kot kompetitivni inhibitorji dihidropteroat sintaze, so mimetiki PABA; trimetoprim je inhibitor dihidrofolat reduktaze in prepreči redukcijo dihidrofolne kisline v tetrahidrofolno kislino.
- b. Zavira sintezo mikolne kisline, ključnega gradnika celične stene *M. tuberculosis*: izoniazid (5)

#### 5. Sprememba funkcije celične membrane:

- a. Polimiksini so kationski polipeptidi, ki z detergentom podobnim delovanjem spremenijo permeabilnost celične membrane. (6)
- b. Daptomicin se veže v bakterijsko membrano v odvisnosti od kalcijevih ionov, kar povzroči depolarizacijo in izgubo membranskega potenciala ter vodi v zaviranje sinteze proteinov, DNK in RNK. (7)

V začetnem obdobju uporabe protibakterijskih učinkovin je veljalo, da so nekatere smrtonosne bakterijske infekcije, kot sta sifilis in tuberkuloza, premagane. Podobno je veljalo za življensko ogrožajoče vreznine in rane, ki so se do tedaj mnogokrat inficirale. (8) Smrtnost zaradi infekcij se je v ZDA in drugih razvitih državah po odkritju protibakterijskih učinkovin v nekaj letih drastično znižala. (9, 10)

V letih med 1930 in 1960 je bilo odkritih več kot 20 različnih razredov protibakterijskih učinkovin in to obdobje velja za njihovo zlato dobo odkrivanja. Vendar se je po letu 1970 razvoj novih razredov skoraj ustavil. (11) V naslednjih desetletjih so prišli na trg številni analogi že znanih protibakterijskih učinkovin, vendar le en nov razred do leta 2000 (mupirocin). Po letu 2000 se je stanje izboljšalo, saj smo dobili kar nekaj novih razredov protibakterijskih učinkovin na trgu (linezolid, daptomicin, retapamulin, fidaksomicin in bedakvilin). (12)

Vzrok za zaskrbljujoče zmanjšano zanimanje farmacevtskih družb za načrtovanje in razvoj novih protibakterijskih učinkovin je kompleksen in večplasten. Na splošno je razvoj večine zdravilnih učinkovin izredno dolgotrajen in drag proces, zato je v interesu farmacevtskih družb, da se vložena sredstva čim prej povrnejo. Ob tem je potrebno poudariti, da je verjetnost zaslužka veliko bolj tvegana kot pri zdravilih za zdravljenje kroničnih obolenj, saj je zdravljenje z njimi kratkotrajno (od 3 do 14 dni). Poleg tega se nove učinkovine zaradi preprečevanja prehitrega razvoja rezistence v začetku uporabljajo le v skrajnih primerih. Prav tako je regulatorna zakonodaja postala v zadnjih desetletjih

bistveno strožja v primerjavi s prvimi desetletji po odkritju prvih antibiotikov. Vsi ti faktorji vodijo v manjši dobiček proizvajalca po vstopu na trg in večje stroške razvoja, ki se povrnejo dosti kasneje. Zato je kar nekaj farmacevtskih družb prenehalo z razvojem protibakterijskih učinkovin. (11, 13)

V zadnjem času se politika začenja zavedati velikega problema, ki ga povzročata bakterijska rezistenca in zmanjšan razvoj protibakterijskih učinkovin. Ameriški predsednik Obama je leta 2012 podpisal zakon Generating Antibiotics Incentives Now (GAIN), ki spodbuja farmacevtske družbe k razvoju novih protibakterijskih učinkovin. Zakon ustanavlja multidisciplinarno skupino, ki pomaga pri razvoju in pregledu smernic povezanih z razvojem novih protibakterijskih spojin, podaljšuje ekskluzivnost patenta za dodatnih 5 let, predvideva hitrejši postopek odobritve zdravila pri FDA in posodobitve smernic s strani FDA. (14, 15)

## 1.2 Bakterijska rezistenca

Večdesetletna široka uporaba protibakterijskih učinkovin je povzročila razvoj patogenov, ki so rezistentni na določen razred protibakterijskih učinkovin, in tudi sevov, ki so rezistentni na več razredov hkrati. Takšne seve imenujemo multirezistentni sevi oz. MDR sevi (npr. multirezistentni sevi *M.tuberculosis* MDR-TB). Nekaj pogostih tipov rezistentnih baterij: MRSA (proti meticilinu odporni *S. aureus*), VRSA (proti vankomicinu odporni *S. aureus*), VRE (proti vankomicinu odporni *Enterococcus*). (16, 17)

Poznamo dve obliki odpornosti pri bakterijah. Prva je naravna ali intrinzična, ki je specifična za določeno vrsto (npr. nimajo tarčnih mest za določen antibiotik). Druga je pridobljena, razvije se predvsem zaradi prevelike uporabe protibakterijskih učinkovin in jo najdemo le pri posameznih sevih znotraj ene bakterijske vrste. Pridobitev rezistence poteka z mutacijo ali s pridobitvijo genskega materiala drugih organizmov z rekombinacijo (transformacija, transdukcija, konjugacija). (17)

Rezistenca bakterijskih patogenov na protibakterijske učinkovine je hitro rastoča globalna kriza in razumevanje njenih mehanizmov je ključnega pomena za načrtovanje ter razvoj novih terapevtskih strategij. (8) Glavni mehanizmi rezistence so:

1. Sprememba tarčnega mesta zmanjša občutljivost na protibakterijske učinkovine, hkrati pa tarčno mesto obdrži celično funkcijo. Primeri so mutacije pri DNK girazi (rezistenca na fluorokinolone) in RNK polimerazi (rezistenca na rifampicin), nastanek spremenjenih penicilin vezavih proteinov (rezistenca na β-laktamske antibiotike), številne spremembe v

metabolizmu celične stene (rezistenca na vankomicin pri VRSA), post-traskripcijske spremembe in mutacije na ribosomih (rezistenca na makrolide, linezolid, aminoglikozide).

(17)

2. Encimska razgradnja protibakterijske učinkovine oz. njena modifikacija. Encimi s pomočjo hidrolize cepijo vezi, ki so nujno potrebne za vezavo v tarčno mesto (npr.  $\beta$ -laktamaze), s kovalentno vezavo različnih skupin na ključne amino in/ali hidroksi skupine poslabšajo vezavo s tarčo (npr. aminoglikozidne acetiltransferaze). (18)

3. Zmanjšana prepustnost celične membrane in črpanje protibakterijske učinkovine iz celice sta pogosto sinergistična mehanizma. Protibakterijske učinkovine, kot so  $\beta$ -laktami, kloramfenikol in fluorokinoloni, prehajajo zunanjou membrano Gram negativnih bakterij skozi porine. Rezistenca je lahko posledica zmanjšanja števila porinov ali mutacij, ki vodijo v oženje porinskega kanala. Z ekspresijo efluks črpalk bakterije črpajo neželene snovi iz celice, lahko so specifične za posamezno učinkovino ali pa so sposobne črpati veliko različnih protibakterijskih spojin iz celice in tako prispevajo k MDR. (8)

Rezistenca se širi hitro, še posebej v bolnišnicah, kjer različne bakterije lahko pridejo v kontakt med seboj in tako širijo rezistenco. Opažena je povečana pojavnost bakterijske rezistence na večino protibakterijskih učinkovin. Zato nujno potrebujemo nove učinkovine z novimi mehanizmi delovanja. (8)

### 1.3 DNK topoizomeraze

Topoizomeraze so esencialni izomerazni encimi, ki spreminja topologijo DNK. Katalizirajo pretvorbe med različnimi topološkimi oblikami DNK in so pomembne pri procesih replikacije, transkripcije in rekombinacije. Sposobne so relaksirati pozitivno ali negativno dodatno zvito strukturo DNK. To dosežejo z začasno prekinitvijo ene ali dveh verig DNK, s prehodom enega odseka DNK skozi prekinitev drugega odseka DNK in kasneje povezavo prekinjene DNK. (19)

Mehanizem prekinitve verige se začne z napadom hidroksilne skupine tirozina iz aktivnega mesta DNK topoizomeraze na fosfodiestersko vez DNK, ki tako povzroči začasno prekinitev verige. Nato parna veriga ob konformacijski spremembi encima preide skozi začasno prekinitev, ki se nato s ponovno vzpostavitvijo fosfodiesterske vezi povrne v prvotno stanje. (20)

Topoizomeraze ločimo v dve skupini glede na mehanizem delovanja. Topoizomeraze I prekinejo eno verigo DNK, medtem ko topoizomeraze II prekinejo dve

verigi DNK hkrati. Oba tipa se še naprej delita v poddružine: IA, IB, IIA in IIB, katerih predstavniki so našteti v preglednici I. (19)

**Preglednica I:** Predstavniki poddružin DNK topoizomeraz. Povzeto po (19).

Poddružina	Predstavniki
<b>IA</b>	Bakterijski DNK topoizomerazi I in III Kvasna DNK topoizomeraza III Sesalski DNK topoizomerazi III $\alpha$ in III $\beta$
<b>IB</b>	Evkarijantska DNK topoizomeraza I Sesalska mitohondrijska DNK topoizomeraza I Poksvirusna topoizomeraza
<b>IIA</b>	Bakterijski DNK giraza in topoizomeraza IV Kvasna DNK topoizomeraza II Sesalski DNK topoizomerazi II $\alpha$ in II $\beta$
<b>IIB</b>	DNK topoizomeraza VI <i>Sulfolobus shibatae</i>

DNK topoizomeraze so tarče pomembnih protirakavih in protibakterijskih učinkovin. Široko uporabljene protirakave učinkovine, ki ciljajo človeško topoizomerazo tipa IIA so etopozid, doksorubicin in mitoksantron. Bakterijsko topoizomerazo tipa IIA (giraza in topoizomeraza IV) inhibirajo fluorokinoloni in aminokumarini. (21)

#### 1.4 Bakterijska DNK giraza

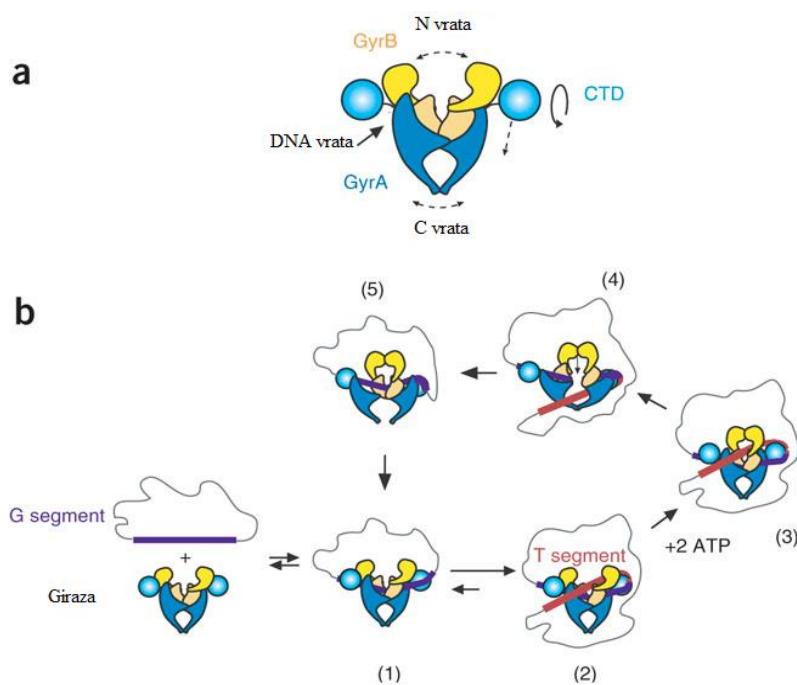
DNK giraza je heterotetramerni protein sestavljen iz dveh GyrA in dveh GyrB podenot ( $A_2B_2$ ). Topoizomeraza IV je analog DNK giraze in je sestavljena iz dveh ParC in dveh ParE podenot ( $C_2E_2$ ), ki sta homologna GyrA in GyrB. GyrA in ParC podenoti sta vpleteni v prehod DNK, medtem ko GyrB in ParE podenoti vsebujeta ATPazno domeno. Zaradi takšne velike podobnosti med encimoma so inhibitorji giraze v veliko primerih tudi inhibitorji topoizomeraze IV in obratno in jih v tem primeru imenujemo dualni inhibitorji. (22)

DNK giraza je edinstven encim med topoizomerazami, saj lahko uvede negativno dodatno zvitje v terciarno strukturo DNK in pri tem porablja energijo ATP. To je še posebej pomembno pri replikaciji krožne DNK, saj pred replikacijskimi vilicami nastaja

pozitivno dodatno zvitje in giraza ga je sposobna sprostiti. Topoizomeraza IV je pomembna ob koncu replikacije pri končni ločitvi novonastalih hčerinskih DNK. (20)

Giraza prekine eno dvojno verigo DNA (G segment) in s tem naredi vrzel skozi katero preide drugi T segment DNA. Ta prehod zahteva koordinirano odpiranje in zapiranje treh delov proteina, ki so jih poimenovali vrata. N vrata ali vhodna vrata za DNA so del GyrB podenote, ki dimerizirajo po vezavi molekule ATP, kar povzroči zaprtje N vrat. DNA vrata so stičišče GyrA in GyrB podenote in so v bližini tirozinskega ostanka, ki povzroči prekinitev G segmenta DNA. C vrata ali izhodna vrata za DNA so del N-terminalne domene GyrA. C-terminalna domena GyrA (CTD) je neodvisno zvita in je povezana z N-terminalno domeno GyrA preko fleksiblnega veznika, ki ji daje rotacijsko in translacijsko fleksibilnost, kar omogoči tvorbo DNA zavoja. (23)

DNA vrata vežejo G segment in ga prekinejo s pomočjo tirozinskega ostanka. DNA tvori zavoj okoli CTD dela in približa T segment k N vratom. Ko ta ujamejo T segment in vežejo ATP, se N vrata zaprejo. Hidroliza ATP sproži konformacijsko spremembo v encimski strukturi, ki prenese T segment skozi vrzel med prekinjenim G segmentom. S sprostitevijo T segmenta in ADP je proces zaključen in encim je pripravljen za nov krog katalize. (24)



**Slika 1:** Sestava giraze in mehanizem delovanja. Povzeto po (24). a) Dva monomera GyrB v rumeni barvi tvorita N vrata, dva monomera GyrA v modri barvi tvorita C vrata, C-terminalni domeni GyrA (CTD) sta modra kroga, stičišče GyrA in GyrB podenote so DNA vrata. b) Model uvedbe negativnega dodatnega zvitja DNA giraze.

DNK giraza spada v družino topoizomeraz IIA in zaradi posebnega Bergeratovega/GHKL zgiba v ATP vezavnem mestu tudi v GHKL superdružino encimov. V to družino poleg DNK giraze spadajo tudi Hsp90, histidin kinaze in MutL encimi. To dejstvo je še posebej pomembno pri zagotavljanju selektivnosti inhibitorjev giraze B, saj bi zaradi podobnosti v aktivnem mestu lahko delovali tudi na ostale encime GHKL superdružine. (25)

Poznamo dva glavna mehanizma inhibicije giraze. Prvi inhibira girazo s stabilizacijo kovalentnega kompleksa med encimom in DNK, tako delujejo fluorokinoloni. Drugi inhibira ATPazno aktivnost na GyrB podenoti, tako delujejo aminokumarini in ciklotialidini. (22)

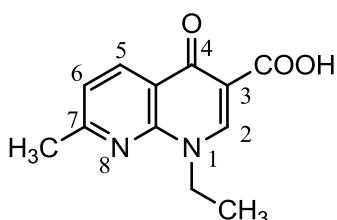
### 1.5 Inhibitorji DNK giraze A

Kinoloni so sintetični kemoterapeutiki s 4-kinolonskim obročnim sistemom in s karboksilno skupino na mestu 3. Prva generacija\* (nalidiksna kislina) deluje proti Gram negativnim bakterijam in se je uporabljala za infekcije urinarnega trakta. Nadomestila jo je druga generacija (norfloksacin in ciprofloksacin), ki ima fluor na mestu 6 in piperidin na mestu 7, kar razširi spekter delovanja tudi na *Pseudomonas* species in nekatere Gram pozitivne bakterije (npr: *Staphylococcus aureus*). Tretja generacija, ki ima substituente na mestu 7 in 8, ima povečan učinek na Gram pozitivnih bakterijah. Sem spada levofloksacin, ki deluje na *S. pneumoniae* in *S. aureus*, ta dva patogena pa sta povzročitelja respiratornih infekcij in akutnih vnetij sluhovoda. Četrta generacija ima širši spekter delovanja, deluje tudi na anaerobne bakterije (moksifloksacin). (Slika 2) (26)

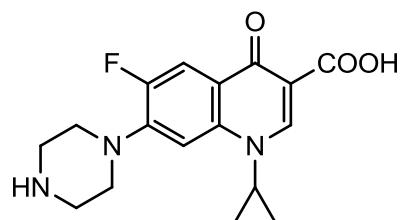
Glavni mehanizem inhibicije DNK giraze oz. topoizomeraze IV je tvorba in stabilizacija kompleksa med kinolonom, encimom in DNK, bolj natančno stabilizacija kovalentne vezi med prekinjeno DNK in tirozinskim ostankom v GyrA aktivnem mestu. DNK sinteza se ustavi zaradi blokiranih replikacijskih vilic, kar ima bakteriostatične učinke. (26) Baktericidni učinki ne izhajajo le iz inhibicije DNK replikacije, ampak tudi iz njenih negativnih posledic (poškodbe DNK, sinteza nepopolnih proteinov, indukcija oksidativnih poškodb). (22)

---

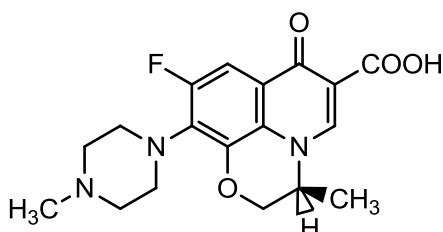
\* Nekatere učinkovine prve generacije kinolonov (npr. nalidiksna kislina) nimajo kinolonskega skeleta.



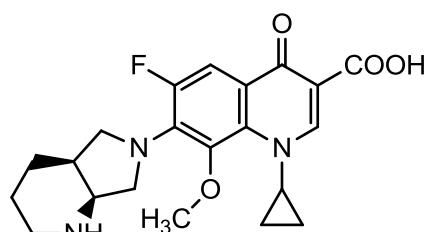
Nalidiksna kislina



Ciprofloxacin



Levofloxacin



Moksifloksacin

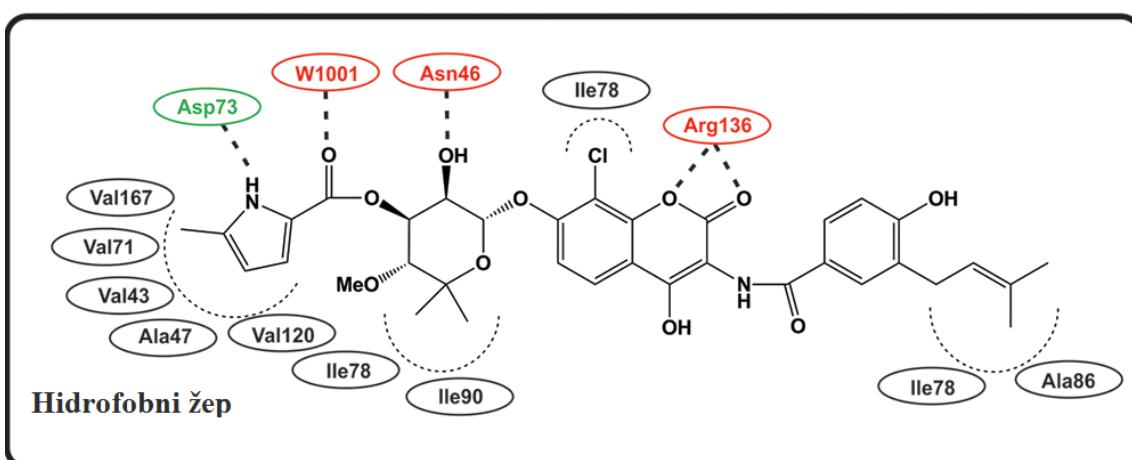
**Slika 2:** Predstavniki vseh štirih generacij kinolonov. 1. generacija: nalidiksna kilsina, 2. generacija: ciprofloksacin, 3. generacija: levofloksacin in 4. generacija: moksifloksacin.

Fluorokinoloni so edini inhibitorji DNK giraze in topoizomeraze IV, ki so trenutno v terapevtski uporabi. Od njihovega odkritja v 60. letih je bila struktura kinolonov optimizirana z namenom povečanja jakosti in spektra delovanja na Gram pozitivne, Gram negativne in atipične bakterije, poleg tega pa tudi z namenom premagovanja rezistence. Rezistanca na fluorokinolone je običajno posledica mutacije genov za GyrA ali/in ParC. K rezistenci pa prispevajo tudi efluks črpalke in encimi, ki modificirajo učinkovino. Zaradi vedno večjega pojava odpornosti na fluorokinolone in izrednega števila že sintetiziranih analogov se je iskanje inhibitorjev giraze usmerilo v iskanje inhibitorjev GyrB podenote, ki je odgovorna za ATPazno aktivnost. (22)

## 1.6 Inhibitorji DNK giraze B

Že dolgo poznani inhibitorji girazne podenote B so aminokumarini. Aminokumarini, kot so novobiocin, klorobiocin in kumermicin A, so naravni produkti izolirani iz *Streptomyces* species. Skupne imajo tri strukturne elemente: 3-amino-4,7-dihidrokumarinski obroč, sladkor L-noviozo in aromatski acilni substituent vezan na amino skupino kumarinskega obroča. So kompetitivni inhibitorji ATPazne domene GyrB, kljub temu da strukturno niso podobni ATP. Delujejo tako, da delno prekrijejo vezavno mesto za ATP in tako preprečijo vezavo ATP. (27)

Skupine, ki so pomembne za interakcije med klorobiocinom in ATP aktivnim mestom DNK giraze B *E. coli*, so: 1. Donor in akceptor vodikove vezi (pirolkarboksilni ester), ki je vezan na sladkor in interagira z Asp73, estrska skupina preko ohranjene molekule vode W1001 interagira s Thr165; 2. hidrofobna skupina (5-metilpirol) tvori interakcije v hidrofobnem žepu z Val43, Ala47, Val71, Ile78, Val120, Val167; 3. hidrosilna skupina sladkorja L-novioze tvori vodikovo vez z Asn46. Poleg tega obe metilni skupini prispevata k hidrofobnim interakcijam z aminokislinskima ostankoma Ile78 in Ile90; 4. akceptor vodikove vezi: dva kisikova atoma iz kumarinskega obroča tvorita močne vodikove vezi z Arg136 in to je ena od najpomembnejših interakcij za močno vezavo liganda. (28)



**Slika 3:** Model vezave klorobiocina v ATP vezavno mesto DNK giraze B *E.coli*. Pritejeno po (28). Aminokislinski ostanki v zeleni barvi predstavljajo akceptorje vodikove vezi, v rdeči predstavljajo donorje vodikove vezi in tisti v črni tvorijo hidrofobne interakcije.

Slaba aktivnost proti Gram negativnim bakterijam, ki je posledica slabe topnosti, in toksičnost za evkariotske celice so vzroki za neuspeh aminokumarinov v klinični uporabi. (25) Mutacije, ki povzročijo rezistenco na aminokumarine, pogosto povzročijo tudi inaktivacijo giraze zaradi nezmožnosti vezave ATP. To dejstvo naredi načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin tega razreda privlačnejše. (27)

Ciklotialidini so drugi razred naravnih produktov izoliranih iz *Streptomyces* species, ki prav tako inhibirajo ATPazno aktivnost GyrB. Sestavljeni so iz substituiranega resorcinolnega obroča z vezano pentapeptidno verigo (Cys, Ala, Ser, Pro, Ala). Kljub večji učinkovitosti in boljši selektivnosti proti evkariotskim topoizomerazam v primerjavi z aminokumarini so *in vivo* neaktivni zaradi previsoke lipofilnosti. (28)

Kibdelomicin in kibdelomicin A sta prav tako naravna produkta, ki inhibirata ATPazno aktivnost DNK giraze in topoizomeraze IV. Značilni strukturni del obeh produktov je 3,4-dikloropirol. Kibdelomicin izkazuje protibakterijsko delovanje proti nekaterim Gram pozitivnim bakterijam in Gram negativni *H. influenzae*, vendar ne deluje na *E.coli*. Ne povzroča navzkrižne rezistence z drugimi pomembnimi razredi inhibitorjev DNK giraze. Kibdelomicin A je derivat kibdelomicina, manjka mu le metilna skupina na mestu 5 pirolovega obroča. Izkazuje šibkejšo inhibicijo DNK giraze kot kibdelomicin, saj metilna skupina na pirolu prispeva k dodatnim hidrofobnim interakcijam in zato močnejši inhibiciji DNK giraze. (22)

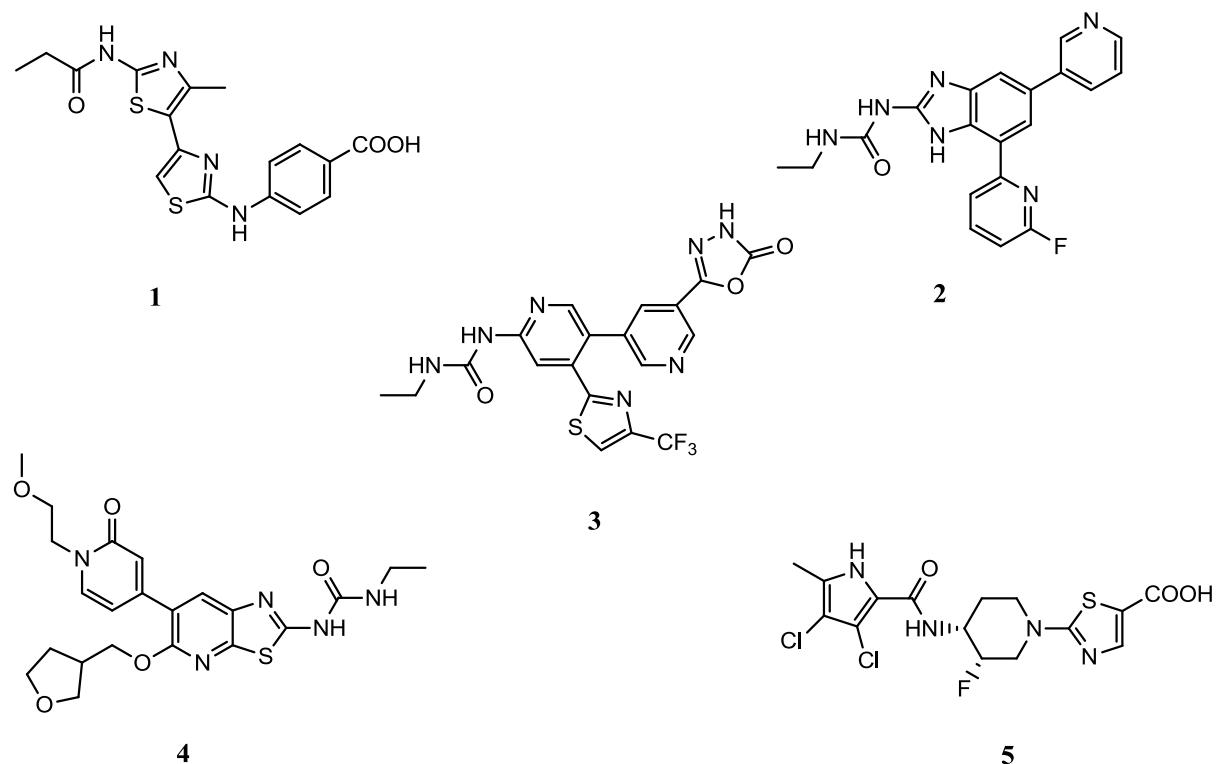
Z uporabo novih tehnik in kristalnih struktur kompleksov giraze B z različnimi inhibitorji so odkrili različne razrede sinteznih inhibitorjev: 4,5'-bitiazole, benzimidazol sečnine, piridin sečnine, tiazolopiridin sečnine, pirolamide, azaindole in mnoge druge. (28)

Substituirani 4,5'-bitiazoli so bili identificirani kot novi *E.coli* girazni inhibitorji. Izdelan je bil farmakofojni model na podlagi interakcij med klorobiocinom in girazo B. Sledilo je virtualno rešetanje velike knjižnice komercialno dostopnih spojin, kjer so odkrili spojino 4,5'-bitiazolnega razreda. Ta je bila nato uporabljena kot izhodišče za iskanje potentnejših spojin tega kemijskega tipa (spojava **1**). (28)

Drug tip preučevanih inhibitorjev giraze in topoizomeraze IV so spojine z etilsečninskim strukturnim elementom. Benzimidazol sečninski razred je bil odkrit s strani Vertex-a z rešetanjem visoke zmogljivosti. Predstavnik tega tipa (spojava **2**) je močan inhibitor obeh tarčnih encimov in selektiven proti človeški topoizomerazi II. (25) Bilo je narejenih mnogo analogov tega razreda z bioizosternimi zamenjavami ogrodnega sistema. Tako so prišli do piridin sečninskega razreda, katerih predstavnik (spojava **3**) je aktiven proti Gram pozitivnim patogenom *S. aureus* in *S. pneumoniae* ter Gram negativnim *H. influenzae*. (29) S pomočjo farmakofornega modela je bil odkrit tudi tiazolopiridin sečninski razred. Predstavnik (spojava **4**) izkazuje antituberkulotično delovanje z inhibicijo giraze B. Poleg naštetih bioizosternih zamenjav je bilo v literaturi objavljenih še dosti več različnih ogrodnih sistemov s sečninskim strukturnim elementom. (30) Problem teh inhibitorjev je slaba topnost in velika vezava na plazemske proteine, kar lahko rešimo s formulacijo predzdravila. (25)

Pirolamidni razred giraznih inhibitorjev so odkrili pri firmi AstraZeneca z načrtovanjem na podlagi fragmentov. Po začetnem zadetku, ki je izkazoval obetavno protibakterijsko delovanje, so z nadaljnjo optimizacijo dobili spojino **5** z boljšim *in vivo*

delovanjem. Substitucija fluora na mestu 3 piperidina je izboljšala *in vivo* učinkovitost v primerjavi z nesubstituiranimi analogi. Spojina **5** deluje učinkovito proti Gram pozitivnim bakterijam (npr: *S. aureus*, *S. pneumoniae*), dosti manj učinkovita pa je proti Gram negativnim bakterijam (npr. *E.coli*). Domnevajo, da je za slabo učinkovitost odgovoren predvsem bakterijski efluks mehanizem. (31)



**Slika 4:** Predstavniki novih sinteznih inhibitorjev giraze B. Spojina **1** je predstavnik 4,5'-bitiazolnega razreda z  $IC_{50}$  (*E.coli* GyrB) = 1,1  $\mu$ M; spojina **2** je predstavnik benzimidazol sečninskega razreda; spojina **3** je predstavnik piridin sečninskega razreda z  $IC_{50}$  (*S. aureus* GyrB) < 10 nM; spojina **4** je predstavnik tiazolopiridin sečninskega razreda z MIC (*M. tuberculosis*) = 0,5  $\mu$ M; spojina **5** je predstavnik pirolamidnega razreda z  $IC_{50}$  (*S. aureus* GyrB) = 4 nM.

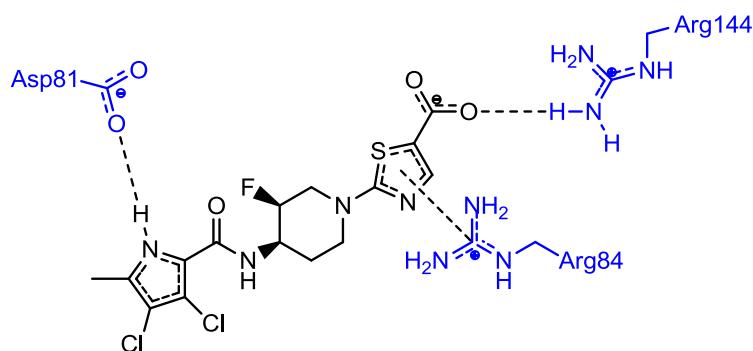
## 2 NAČRT DELA

Namen magistrske naloge je sintetizirati potencialne zaviralce ATPazne aktivnosti giraze B. Pri načrtovanju bomo posnemali strukturo spojine 2-[(3S,4R)-4-{[(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-il)karbonil]amino}-3-fluoropiperidin-1-il]-1,3-tiazol-5-karboksilne kisline. Izkazala je *in vivo* učinkovitost proti *S. pneumoniae* v mišjem modelu pljučnice. (31) Dodaten razlog za izbor te spojine za izhodišče našega dela je učinkovit zaviralec AZD5099, ki je bil pridobljen z njeno optimizacijo in je vstopil v fazo 1 kliničnih študij. (32)

Objavljena je kristalna struktura kompleksa 2-[(3S,4R)-4-{[(3,4-dikloro-5-metil-1H-pirol-2-il)karbonil]amino}-3-fluoropiperidin-1-il]-1,3-tiazol-5-karboksilne kisline v girazni podenoti B *S. aureus*, ki daje lep vpogled v pomembne interakcije, ki so potrebne za vezavo zaviralca v aktivno mesto encima (dostopno na RCSB Protein Data Bank pod šifro 3TTZ). (33)

Za uspešno vezavo so potrebne interakcije: (Slika 5)

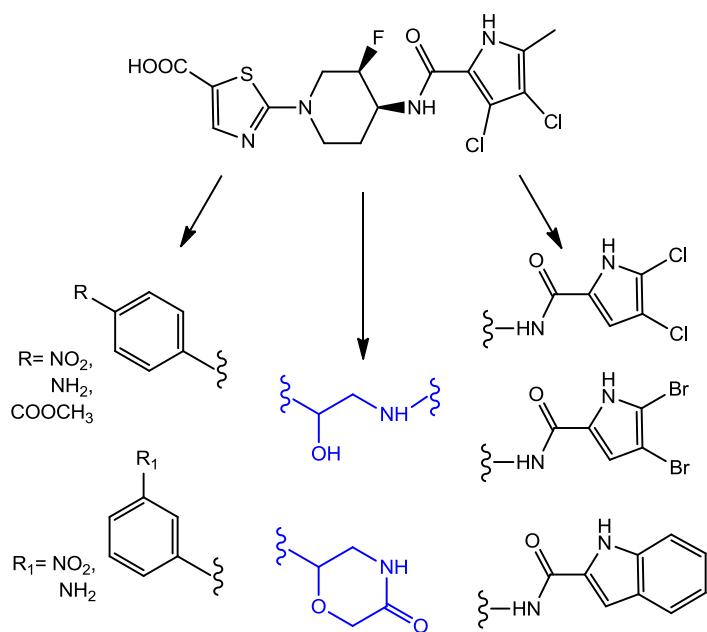
1. Donor-akceptor vodikove vezi: Pirolkarboksamid se veže v vezavni žep za adenin ATP molekule in tvori vodikovo vez med pirolno NH skupino in Asp81. Poleg tega tvori amidni kisik vodikovo vez z ohranjeno molekulo vode, ki je sicer povezana preko stranskih verig z Asp81 in Thr173. Dve lipofilni elektron privlačni skupini na pirolu povečata hidrofobne interakcije v adeninskem žepu in znižata pK<sub>a</sub> pirolne NH skupine, kar vodi v močnejšo interakcijo z Asp81.
2. Tiazolni aromatski obroč vezan na piperidin sega izven adeninskega žepa in tvori dodatne kation-π interakcije z gvanidinsko skupino Arg84. Arg84 je sicer povezan z Glu58 z ionskimi interakcijami, aminokislinska ostanka skupaj tvorita strop žepa v katerega se veže inhibitor.
3. Karboksilna skupina vezana na tiazol tvori ionske interakcije z gvanidinsko skupino Arg144. (32)



**Slika 5:** Pomembne interakcije za vezavo izhodiščne spojine v girazo B *S.aureus*, z modro označeni aminokislinski ostanki so pomembni pri vezavi. Povzeto po (33).

Naše spojine bomo načrtovali s pomočjo posnemanja izhodiščne spojine in njenih interakcij z vezavnim mestom, ki jih bomo poskušali ohraniti ali izboljšati za uspešno vezavo načrtovanih spojin v tarčni encim. Pri načrtovanju potencialnih inhibitorjev giraze B bomo: (Slika 6)

- modificirali pirolamidni fragment. Modifikacije obsegajo spremembo mesta vezave hidrofobnih substituentov in spremembo samih hidrofobnih substituentov na pirolu (Cl, Br) ali nadomestitev pirolamida z indolamidnim fragmentom. Z modifikacijami skušamo ohraniti in izboljšati vezavo z Asp81 in vezavo v adeninski žep.
- tiazolni aromatski obroč bomo nadomestili s fenilnim obročem, z ohranitvijo aromatskega obroča ohranimo kation- $\pi$  interakcije z gvanidinsko skupino Arg84. Na fenil bomo poskusili uvesti substituente  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_2$  in  $\text{COOMe}$  na para položaj in substituente  $\text{NO}_2$ ,  $\text{NH}_2$  na meta položaj.
- aminopiperidinski distančnik bomo nadomestili z aminoetanolnim in skušali ohraniti aromatska obroča na primerni razdalji,
- poskusili bomo ciklizirati aminoetanolni fragment in tako rigidizirati strukturo.



**Slika 6:** Načrtovane spremembe izhodiščne spojine.

Sintetiziranim končnim spojinam bo z biološkimi testiranji določena zaviralna aktivnost na girazo B.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Materiali

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

#### 3.2 Metode

##### Kromatografske metode:

- Za tankoplastno kromatografijo (TLC) smo uporabljali plošče proizvajalca Merck z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. TLC smo uporabili za spremljanje poteka reakcij, izolacij in čiščenja spojin. Uporabljene mobilne faze so navedene pri vsaki spojni posebej. Za detekcijo spojin na kromatogramu smo uporabili UV svetilko z valovno dolžino  $\lambda = 254$  nm ali  $\lambda = 366$  nm in orositvene reagente: ninhidrin za detekcijo aminov in bromkrezol zeleno za detekcijo karboksilnih spojin.
- Kolonsko kromatografijo smo uporabili za čiščenje želene spojine. Za izvedbo smo uporabili steklene kolone različnih velikosti, silikagel 60 z 0,04-0,063 nm velikimi delci (Merck) za stacionarno fazo in različne mobilne faze, ki so navedene pri posamezni spojini.
- Tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti (HPLC) smo uporabili za določanje čistosti končnih spojin in vmesnih produktov. Analize so bile izvedene na sistemu Agilent Technologies 1100 z UV-VIS detektorjem (220 nm in 254 nm) s kolono Agilent Eclipse Plus C18 (150 x 4,6 nm), ki je bila termostatirana na 25 °C. Volumen injiciranja je znašal 5  $\mu\text{l}$  in pretok mobilne faze 1,0 ml/min. Uporabili smo metode:
  - a. Metoda 1: Mobilna faza je bila sestavljena iz bidestilirane vode (A) in acetonitrila (B). Gradient: 0 - 15 min: od 40 % do 90 % B v A; 15 - 18 min: 90 % B v A; 18 - 24 min: 40 % B v A.
  - b. Metoda 2: Mobilna faza je bila sestavljena iz 0,1 % TFA v bidestilirani vodi (C) in acetonitrila (D). Gradient: 0 - 15 min: od 20 % do 50 % D v C; 15 – 17,5 min: 90 % D v C; 17,5 - 18 min: od 90 % do 20 % D v C; 18 - 24 min: 20 % D v C.

c. Metoda 3: Mobilna faza je bila sestavljena iz 0,1 % TFA v bidestilirani vodi (C) in acetonitrila (D). Gradient: 0 - 15 min: od 30 % do 90 % D v C; 15 - 17 min: 90 % D v C; 17 - 18 min: od 90 % do 30 % D v C; 18 - 24 min: 30 % D v C.

### **Spektroskopske metode:**

- Jedrska magnetna resonanca(NMR): Za potrditev strukture sintetiziranih spojin smo uporabili NMR spektre.  $^1\text{H}$  NMR in  $^{13}\text{C}$  NMR spektre smo posneli na Bruker Advance 400 MHz na Fakulteti za farmacijo. Vzorce smo posneli v devteriranih topilih (DMSO-d<sub>6</sub>, CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, aceton-d<sub>6</sub>). Spektre smo reševali z računalniškim programom NMRnotebook 2.70 proizvajalca NMRTEC S.A.S..
- Masna spektrometrija (MS): Masne spektre končnih spojin so posneli na masnem spektrometu VG-Analitical Autospec z ESI in HRMS tehniko na Inštitutu Jožef Stefan (Center za masno spektrometrijo).
- Infrardeča spektroskopija (IR): IR spektre smo posneli s spektrometrom Nexus FT-IR z uporabo ATR tehnike na Fakulteti za farmacijo.

### **Določanje temperature tališča:**

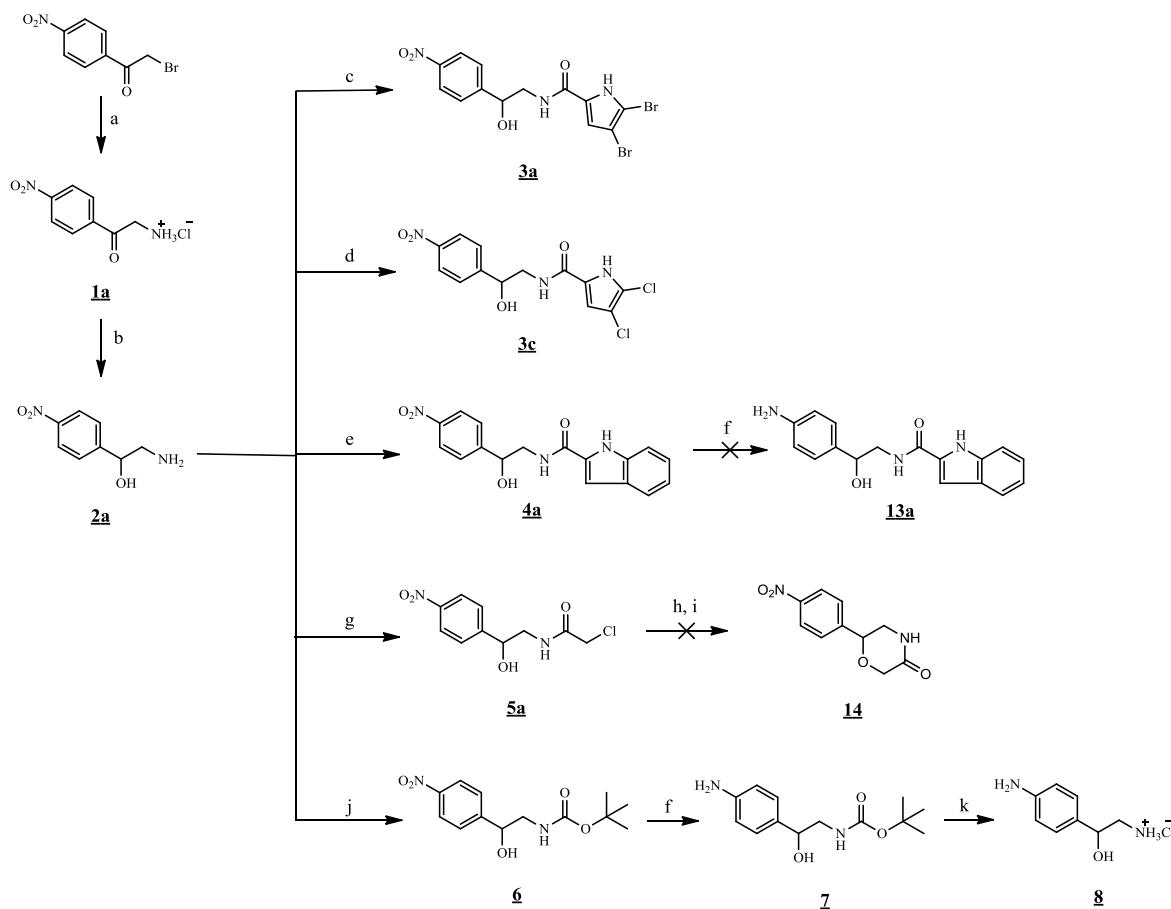
Talilne intervale smo določili s Koflerjevim talilnim mikroskopom z ogrevalno mizico (Leica).

### **Risanje in poimenovanje struktur:**

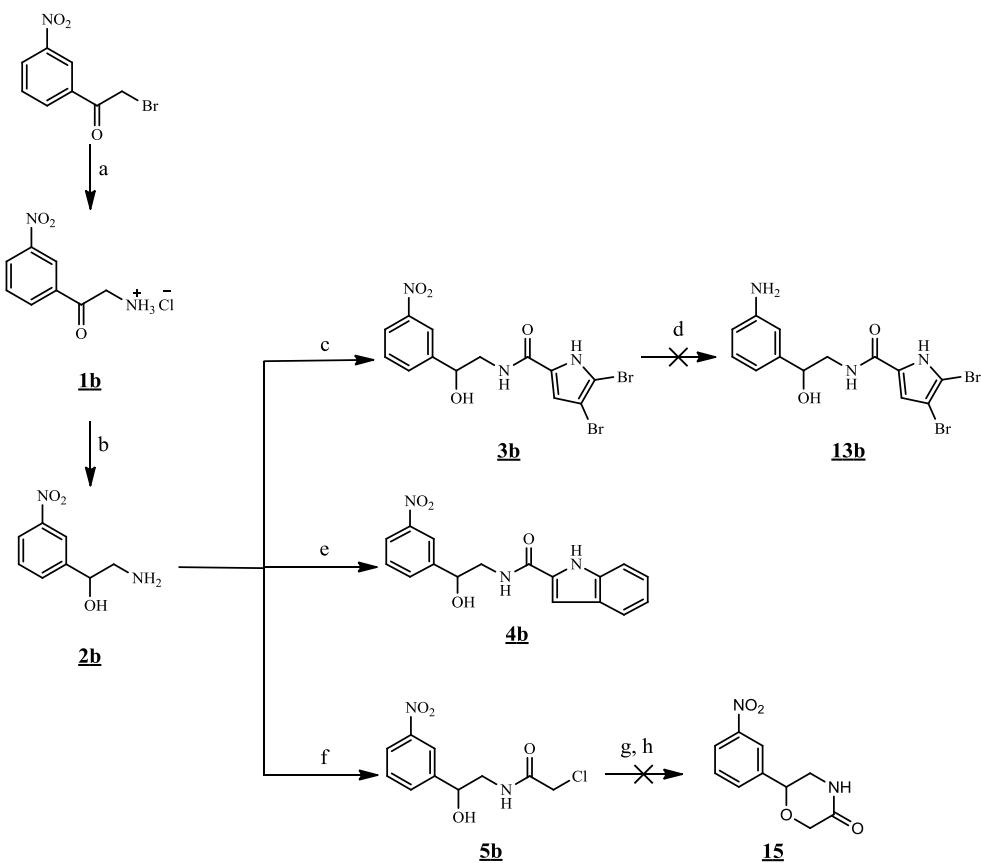
S pomočjo programa ChemDraw Ultra 12.0 smo narisali strukturne formule spojin in jih poimenovali po IUPAC nomenklaturi.

## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

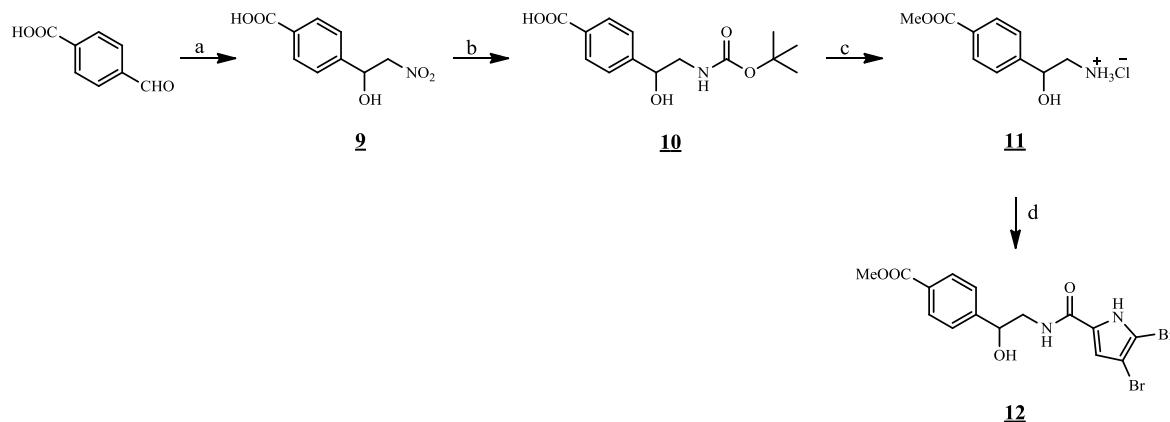
### Reakcijska shema 1:



Reagenti in pogoji: (a) 1. HMTA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2. konc. HCl, EtOH; (b) 1. NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 0 °C → rt, 2. NH<sub>4</sub>Cl, 3. NaOH; (c) 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-il)etanon, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, mikrovalovni reaktor 70 °C, 40 min, 40 W; (d) 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1H-pirol-2-il)etanon, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, mikrovalovni reaktor 70 °C, 40 min, 40 W; (e) indol-2-karboksilna kislina, EDC, HOBT, NMM, DMF, 0 °C → rt; (f) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, THF; (g) kloroacetilklorid, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, 0 °C; (h) NaH, THF, 0 °C → rt; (i) KOH/EtOH, refluks; (j) Boc<sub>2</sub>O, THF, 0 °C; (k) konc. HCl, THF, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH.

**Reakcijska shema 2:**

Reagenti in pogoji: (a) 1. HMTA, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, 2. konc. HCl, EtOH; b) 1. NaBH<sub>4</sub>, MeOH, 0 °C → rt, 2. NH<sub>4</sub>Cl, 3. NaOH; (c) 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etanon, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, CH<sub>3</sub>CN, mikrovalovni reaktor 70 °C, 40 min, 40 W; (d) H<sub>2</sub>, Pd/C, MeOH, THF; (e) indol-2-karboksilna kislina, EDC, HOBT, NMM, DMF, 0 °C → rt; (f) kloroacetilklorid, Et<sub>3</sub>N, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, MeOH, 0 °C; (g) NaH, THF, 0 °C → rt; (h) NaH, DMF, 0 °C → rt.

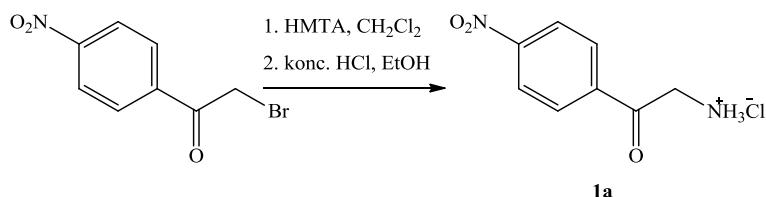
**Reakcijska shema 3:**

Reagenti in pogoji: (a)  $\text{CH}_3\text{NO}_2$ , LiOH, THF,  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ ; (b)  $\text{H}_2$ , Pd/C,  $\text{Boc}_2\text{O}$ , MeOH; (c)  $\text{SOCl}_2$ , MeOH,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ ; (d) 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilna kislina, EDC, HOBr, DMAP, NMM, DMF,  $0\text{ }^\circ\text{C} \rightarrow \text{rt}$ .

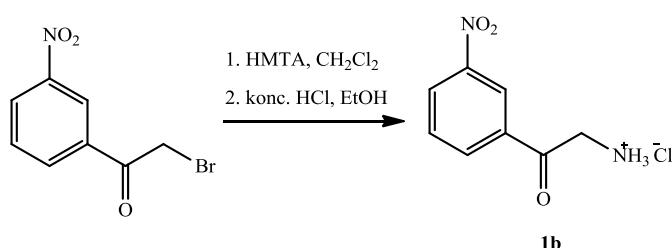
#### **4.1 Sinteza 2-(4-nitrofenil)-2-oksoetanaminijevega klorida (**1a**) in 2-(3-nitrofenil)-2-oksoetanaminijevega klorida (**1b**)**

##### **Reakcija**

**1a**



**1b**



##### **Sintezni postopek**

K raztopini 2-bromo-1-(4-nitrofenil)etanona (10,8 g; 44,3 mmol; 1,0 ekv.; reakcija **1a**) ali 2-bromo-1-(3-nitrofenil)etanona (10,8 g; 44,3 mmol; 1,0 ekv.; reakcija **1b**) v 105 ml diklorometana smo dodali HMTA (heksametilentetramin) (8,71 g; 62,1 mmol; 1,4 ekv.) in mešali 3 ure na sobni temperaturi. Po filtraciji reakcijske zmesi smo oborini dodali raztopino koncentrirane  $\text{HCl}$  (17 ml) v etanolu (70 ml). Dobljeno suspenzijo smo nato mešali do popolne zgostitve (12 h) in jo pustili stati 2 dni. Belo rumeno oborino smo nato odfiltrirali, jo sprali s hladno destilirano vodo in prekristalizirali iz vode. Spojini **1a** in **1b** sta bili pripravljeni z modifikacijo postopkov opisanih v literaturnih virih (34, 35).

##### **Rezultati**

- **1a**

Izkoristek reakcije: 56 %

Mr: 216,62 g/mol

Izgled: belo rumeni kristali

Rf (mobilna faza): 0,28 (DKM : MeOH : Et<sub>3</sub>N = 7 : 1 : 0,1)

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 4.69 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 8.25 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, Ar-H), 8.35 (d, *J* = 8.9 Hz, 2H, Ar-H), 8.67 (s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>)

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ (ppm) 45.44, 124.08, 129.90, 138.27, 150.58, 192.36

• **1b**

Izkoristek reakcije: 54 %

Mr: 216,62 g/mol

Izgled: belo rumeni kristali

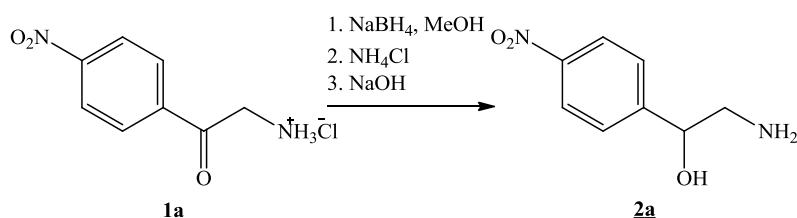
Rf (mobilna faza): 0,29 (DKM : MeOH : Et<sub>3</sub>N = 7 : 1 : 0,1)

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 4.72 (s, 2H, CH<sub>2</sub>), 7.90 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.1 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.45 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.54 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 8.61 (s, 3H, NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 8.70 (s, 1H, Ar-H).

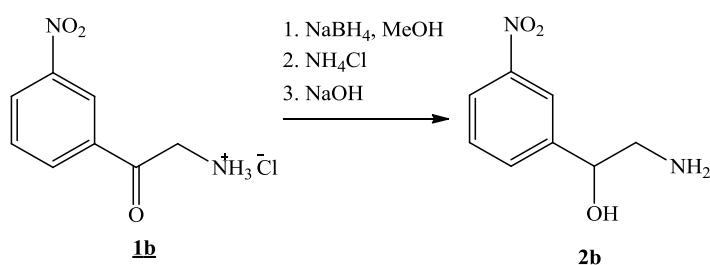
## 4.2 Sinteza 2-amino-1-(4-nitrofenil)etanola (**2a**) in 2-amino-1-(3-nitrofenil)etanola (**2b**)

### Reakcija

#### **2a**



#### **2b**



### **Sintezni postopek**

K raztopini **2a** (5,00 g; 23,1 mmol; 1,0 ekv.) ali **2b** (5,00 g; 23,1 mmol; 1,0 ekv.) v 250 ml metanola pri 0 °C smo počasi med mešanjem dodali NaBH<sub>4</sub> (2,62 g; 69,3 mmol; 3 ekv.). Temperatura se je postopoma zvišala na sobno temperaturo in po 12 h smo dodali 10 ml nasičene raztopine NH<sub>4</sub>Cl ter uparili do suhega. Ostanek v buči smo raztopili v 1M NaOH (50 ml) in odfiltrirali nastalo rumeno oborino, da smo dobili željen produkt. Spojini **2a** in **2b** sta bili pripravljeni z modifikacijo postopkov opisanih v literurnem viru (36).

### **Rezultati**

- **2a**

Izkoristek reakcije: 64 %

Mr: 182,18 g/mol

Izgled: rumeni kristali

Rf (mobilna faza): 0,19 (DKM : MeOH : Et<sub>3</sub>N = 7 : 1 : 0,1)

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 1.47 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>), 2.59 (dd, *J*<sub>1</sub> = 13.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.72 (dd, *J*<sub>1</sub> = 13.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.60 (dd, *J*<sub>1</sub> = 7.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.3 Hz, 1H, CH), 5.65 (bs, 1H, OH), 7.60 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, Ar-H), 8.18 (d, *J* = 8.8 Hz, 2H, Ar-H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ (ppm) 49.99, 73.90, 123.12, 127.13, 146.36, 152.56

- **2b**

Izkoristek reakcije: 56 %

Mr: 182,18 g/mol

Izgled: rumeni kristali

Rf (mobilna faza): 0,20 (DKM : MeOH : Et<sub>3</sub>N = 7 : 1 : 0,1)

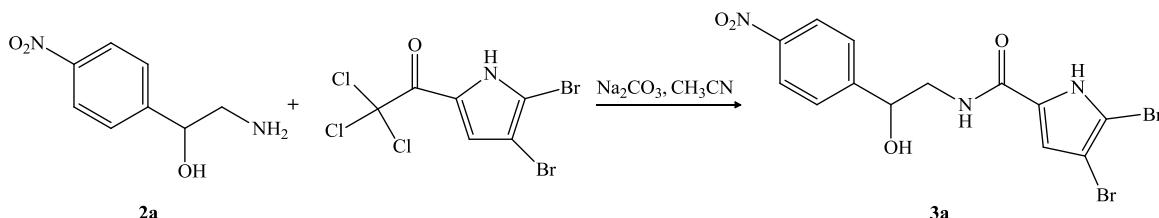
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 2.68 (dd, *J*<sub>1</sub> = 12.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 2.86 (dd, *J*<sub>1</sub> = 12.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.9 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.75 (dd, *J*<sub>1</sub> = 7.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.9 Hz, 1H, CH), 4.92 (bs, 3H, OH + NH<sub>2</sub>), 7.62 (dd, *J*<sub>1</sub> = *J*<sub>2</sub> = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.80 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.10 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 7.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.0 Hz, *J*<sub>3</sub> = 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 8.21 (dd, *J*<sub>1</sub> = *J*<sub>2</sub> = 2.0 Hz, 1H, Ar-H)

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ (ppm) 48.52, 71.76, 120.61, 121.90, 129.58, 132.80, 146.27, 147.73

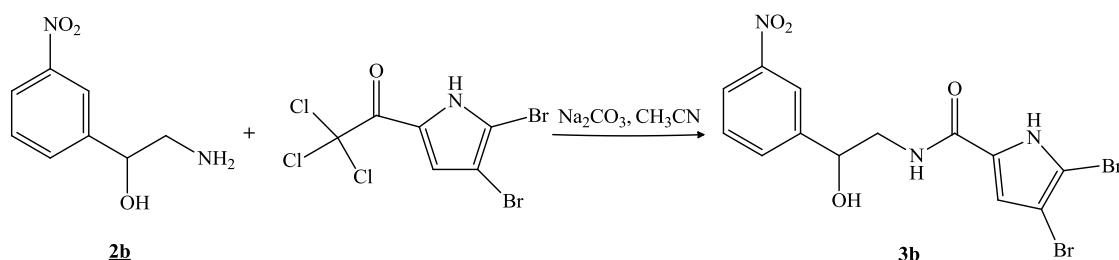
**4.3 Sinteza 4,5-dibromo-N-(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)-1*H*-pirol-2-karboksamida (3a), 4,5-dibromo-N-(2-hidroksi-2-(3-nitrofenil)ethyl)-1*H*-pirol-2-karboksamida (3b) in 4,5-dikloro-N-(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)-1*H*-pirol-2-karboksamida (3c)**

**Reakcija**

**3a**



**3b**



**Sintezni postopek**

V 5 ml acetonitrila smo raztopili spojino 2a (150 mg; 0,823 mmol; 1 ekv.) ali 2b (150 mg; 0,823 mmol; 1 ekv.) in 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etanon (305 mg; 0,823 mmol; 1 ekv.) ter dodali  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (87 mg; 0,823 mmol; 1 ekv.). Reakcija je potekla v mikrovalovnem reaktorju v 40 min pri 70 °C in 40 W moči. Reakcijski zmesi smo dodali 100 ml etilacetata, nato pa produkt spirali z 1M HCl (2 x 25 ml), 1M  $\text{NaHCO}_3$  (2 x 25 ml) in z nasičeno  $\text{NaCl}$  (20 ml), ter sušili nad  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in produkt prekristalizirali iz etilacetata.

**Rezultati**

- 3a

Izkoristek reakcije: 34 % (121 mg)

Mr: 433,06 g/mol

Izgled: rumeni kristali

Rf (mobilna faza): 0,35 (DKM : MeOH :  $\text{CH}_3\text{COOH}$  = 20 : 1 : 0,1)

Temperatura tališča: 221-223 °C

MS (ESI): m/z (%) = 431.9 ([MH+2]<sup>-</sup>, 100), 429.9 ([MH]<sup>-</sup>, 49), 433.9 ([MH+4]<sup>-</sup>, 47)

HRMS: (m/z=429,9) za C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Br<sub>2</sub> izračunana masa 429,9038 in izmerjena 429,9039

<sup>1</sup>H NMR (Aceton-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 3.51(ddd, J<sub>1</sub> = 13.7 Hz, J<sub>2</sub> = 7.5 Hz, J<sub>3</sub> = 5.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.71 (ddd, J<sub>1</sub> = 13.7 Hz, J<sub>2</sub> = 6.3 Hz, J<sub>3</sub> = 4.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 5.07 (ddd, J<sub>1</sub> = 7.5 Hz, J<sub>2</sub> = 4.2 Hz, J<sub>3</sub> = 4.0 Hz, 1H, CH), 5.24 (d, J = 4.2 Hz, 1H, OH), 6.93 (s, 1H, Ar-H(pirol)), 7.70 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar-H), 7.82 (dd, J<sub>1</sub> = 6.3 Hz, J<sub>2</sub> = 5.6 Hz, 1H, NHCO), 8.21 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar-H), 11.82 (bs, 1H, NH(pirol)).

<sup>13</sup>C NMR (Aceton-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ (ppm) 48.06, 72.75, 99.66, 105.69, 113.70, 124.12, 128.10, 128.89, 148.20, 151.86, 160.73.

HPLC: t<sub>R</sub> (min) = 6.725; 96 % pri 254 nm (Metoda 1 pri poglavju Materiali in metode)

IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3559, 3369, 3158, 2935, 2648, 1717, 1629, 1561, 1511, 1411, 1342, 1241, 1058, 978, 956, 900, 856, 819, 770, 697, 646, 620.

- **3b**

Izkoristek reakcije: 30 %

Mr: 433,06 g/mol

Izgled: rumeni kristali

Rf (mobilna faza): 0,32 (DKM : MeOH : CH<sub>3</sub>COOH = 20 : 1 : 0,1)

Temperatura tališča: 200-202 °C

MS (ESI): m/z (%) = 431.9 ([MH+2]<sup>-</sup>, 100), 429.9 ([MH]<sup>-</sup>, 51), 433.9 ([MH+4]<sup>-</sup>, 49)

HRMS: (m/z=429.9) za C<sub>13</sub>H<sub>10</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>Br<sub>2</sub> izračunana masa 429.9038 in izmerjena 429.9037

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 3.38 (ddd, J<sub>1</sub> = 13.2 Hz, J<sub>2</sub> = 7.3 Hz, J<sub>3</sub> = 5.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.47 (ddd, J<sub>1</sub> = 13.2 Hz, J<sub>2</sub> = 6.5 Hz, J<sub>3</sub> = 5.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.87 (ddd, J<sub>1</sub> = 7.3 Hz, J<sub>2</sub> = 5.4 Hz, J<sub>3</sub> = 4.2 Hz, 1H, CH), 5.93 (d, J = 4.2 Hz, 1H, OH), 6.95 (d, J = 2.7 Hz, 1H, Ar-H(pirol)), 7.61 (dd, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.78 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.11 (ddd, J<sub>1</sub> = 8.0 Hz, J<sub>2</sub> = 2.1 Hz, J<sub>3</sub> = 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.22 (dd, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 8.32 (dd, J<sub>1</sub> = 6.3 Hz, J<sub>2</sub> = 5.2 Hz, 1H, NHCO), 12.68 (d, J = 2.7 Hz, 1H, NH(pirol)).

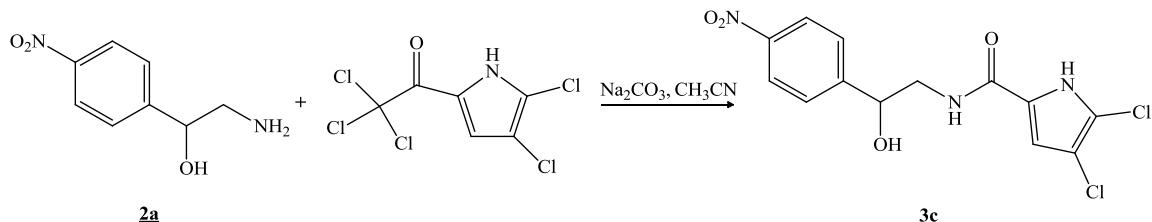
<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ (ppm) 46.48, 70.45, 97.86, 104.60, 112.93, 120.68, 122.05, 127.99, 129.57, 132.96, 145.99, 147.67, 158.99.

HPLC: t<sub>R</sub> (min) = 15.756; 96 % pri 254 nm (Metoda 2 pri poglavju Materiali in metode)

IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3395, 3371, 3199, 2929, 2859, 1711, 1604, 1567, 1530, 1393, 1348, 1239, 1117, 1070, 981, 892, 870, 815, 767, 734, 683.

## Reakcija

3c



## Sintezni postopek

V 5 ml acetonitrila smo raztopili spojino **2a** (150 mg; 0,823 mmol; 1 ekv.) in 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-il)etanon (231 mg; 0,823 mmol; 1 ekv.) ter dodali Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (87 mg; 0,823 mmol; 1 ekv.). Reakcija je potekla v mikrovalovnem reaktorju v 40 min pri 70 °C in 40 W moči. Reakcijski zmesi smo dodali 100 ml etilacetata, nato pa produkt spirali z 1M HCl (2 x 25 ml), 1M NaHCO<sub>3</sub> (2 x 25 ml) in z nasičeno NaCl (20 ml) ter sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in produkt prekristalizirali iz heksana.

## Rezultati

• 3c

Izkoristek reakcije: 32 %

Mr: 344,15 g/mol

Izgled: rumeno rjavi kristali

Rf (mobilna fază): 0,80 (DKM : MeOH = 20 : 1)

Temperatura tališča: 159-162 °C

MS (ESI): m/z (%) = 342.0 ( $[\text{MH}]^-$ , 100), 344.0 ( $[\text{MH}+2]^-$ , 64), 346.0 ( $[\text{MH}+4]^-$ , 10)

HRMS: ( $m/z = 342.0$ ) za  $C_{13}H_{10}N_3O_4Cl_2$  izračunana masa 342.0048 in izmerjena 342.0051

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):** δ (ppm) 3.36 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 13.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 5.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.45 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 13.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.8 Hz, *J*<sub>3</sub> = 5.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.85 (dd, *J*<sub>1</sub> = 6.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.5 Hz, 1H, CH), 5.88 (bs, 1H, OH), 6.91 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, Ar-H(pirol)),

7.62 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, Ar-H), 8.20 (d,  $J = 8.8$  Hz, 2H, Ar-H), 8.29 (dd,  $J_1 = 6.5$  Hz,  $J_2 = 5.2$  Hz, 1H, NHCO), 12.71 (d,  $J = 2.9$  Hz, 1H, NH(pirol)).

$^{13}\text{C}$  NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz):  $\delta$  (ppm) 46.46, 70.70, 107.96, 109.88, 114.90, 123.25, 124.71, 127.31, 146.64, 151.55, 159.12.

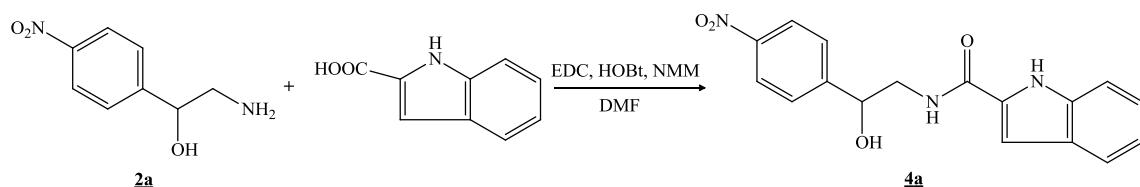
HPLC:  $t_{\text{R}}$  (min) = 6.368; 98 % pri 254 nm (Metoda 1 pri poglavju Materiali in metode)

IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3354, 3165, 2967, 2361, 1699, 1610, 1569, 1528, 1405, 1339, 1253, 1069, 1018, 827, 782, 747, 698.

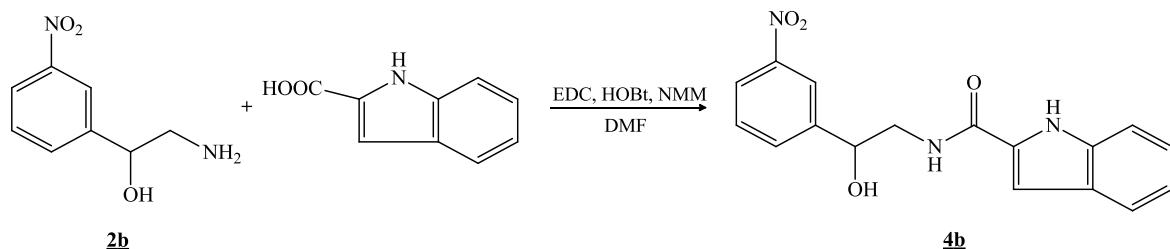
#### 4.4 Sinteza *N*-(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)-1*H*-indol-2-karboksamida (**4a**) in *N*-(2-hidroksi-2-(3-nitrofenil)ethyl)-1*H*-indol-2-karboksamida (**4b**)

##### Reakcija

###### 4a



###### 4b



##### Sintezni postopek

Spojino **2a** (150 mg; 0,823 mmol; 1 ekv.) ali **2b** (150 mg; 0,823 mmol; 1 ekv.), indol-2-karboksilno kislino (146 mg; 0,905 mmol; 1,1 ekv.), HOEt (111 mg; 0,823 mmol; 1 ekv.) in 0,45 ml NMM (*N*-metilmorfolin, 5 ekv.) smo raztopili v 8 ml DMF. Pri 0 °C smo dodali EDC (189 mg; 0,988 mmol; 1,2 ekv.) in pustili mešati 24 h tako, da se je temperatura postopoma zvišala na sobno temperaturo. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in produkt ekstrahirali s 100 ml etilacetata, organsko fazo smo spirali s citronsko kislino (2 x 25 ml), 1M NaOH (2 x 25 ml) in nasičeno raztopino NaCl (25 ml) ter sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

Reakcijsko zmes smo skoncentrirali na rotavaporju in produkt prekristalizirali iz etilacetata.

### **Rezultati**

- **4a**

Izkoristek reakcije: 85 %

Mr: 325,32 g/mol

Izgled: rumeni kristali

Rf (mobilna faza): 0,66 (EtOAc)

Temperatura tališča: 245-247 °C

MS (ESI): m/z (%) = 324.1 ([MH]<sup>-</sup>, 100)

HRMS: (m/z = 324.1) za C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> izračunana masa 324.0984 in izmerjena 324.0991

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 3.46 (ddd, J<sub>1</sub> = 13.2 Hz, J<sub>2</sub> = 6.8 Hz, J<sub>3</sub> = 5.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.54 (ddd, J<sub>1</sub> = 13.2 Hz, J<sub>2</sub> = 5.8 Hz, J<sub>3</sub> = 5.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.94 (ddd, J<sub>1</sub> = 6.8 Hz, J<sub>2</sub> = 5.7 Hz, J<sub>3</sub> = 4.5 Hz, 1H, CH), 5.94 (d, J = 4.5 Hz, 1H, OH), 7.03 (dd, J<sub>1</sub> = 8.2 Hz, J<sub>2</sub> = 6.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.13 (d, J = 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.17 (dd, J<sub>1</sub> = 8.1 Hz, J<sub>2</sub> = 6.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.41 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.60 (d, J = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.66 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar-H), 8.21 (d, J = 8.7 Hz, 2H, Ar-H), 8.61 (dd, J<sub>1</sub> = 5.8 Hz, J<sub>2</sub> = 5.6 Hz, 1H, NHCO), 11.56 (s, 1H, NH(indol)).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ (ppm) 46.69, 70.72, 102.73, 112.29, 119.70, 121.52, 123.25, 123.30, 127.06, 127.36, 131.54, 136.41, 146.64, 151.65, 161.27.

HPLC: t<sub>R</sub> (min) = 6.167; 97 % pri 254 nm (Metoda 1 pri poglavju Materiali in metode)

IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3536, 3402, 3300, 2889, 1698, 1610, 1546, 1507, 1414, 1344, 1310, 1258, 1087, 895, 852, 813, 749, 699, 608.

- **4b**

Izkoristek reakcije: 80 %

Mr: 325,32 g/mol

Izgled: rumeni kristali

Rf (mobilna faza): 0,60 (EtOAc)

Temperatura tališča: 143-146 °C

MS (ESI): m/z (%) = 324.1 ([MH]<sup>-</sup>, 100)

HRMS: (m/z=324.1) za C<sub>17</sub>H<sub>14</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub> izračunana masa 324,0984 in izmerjena 324,0987

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 3.47 (ddd, J<sub>1</sub> = 13.1 Hz, J<sub>2</sub> = 6.8 Hz, J<sub>3</sub> = 5.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.55 (ddd, J<sub>1</sub> = 13.1 Hz, J<sub>2</sub> = 6.3 Hz, J<sub>3</sub> = 5.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.94 (ddd, J<sub>1</sub> = 6.8 Hz, J<sub>2</sub> = 5.6 Hz, J<sub>3</sub> = 4.6 Hz, 1H, CH), 5.94 (d, J = 4.6 Hz, 1H, OH), 7.02 (ddd, J<sub>1</sub> = 8.2 Hz, J<sub>2</sub> = 6.7 Hz, J<sub>3</sub> = 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.10 (d, J = 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.16 (ddd, J<sub>1</sub> = 8.2 Hz, J<sub>2</sub> = 6.7 Hz, J<sub>3</sub> = 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.40 (dd, J<sub>1</sub> = 8.2 Hz, J<sub>2</sub> = 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.60 (d, J = 8.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.62 (dd, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.81 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.12 (ddd, J<sub>1</sub> = 8.0 Hz, J<sub>2</sub> = 2.0 Hz, J<sub>3</sub> = 0.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.25 (dd, J<sub>1</sub> = J<sub>2</sub> = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.58 (dd, J<sub>1</sub> = 6.3 Hz, J<sub>2</sub> = 5.3 Hz, 1H, NHCO), 11.54 (s, 1H, NH(indol)).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ (ppm) 46.71, 70.52, 102.71, 112.32, 119.73, 120.73, 121.55, 122.08, 123.33, 127.09, 129.59, 131.56, 133.01, 136.45, 146.10, 147.71, 161.32.

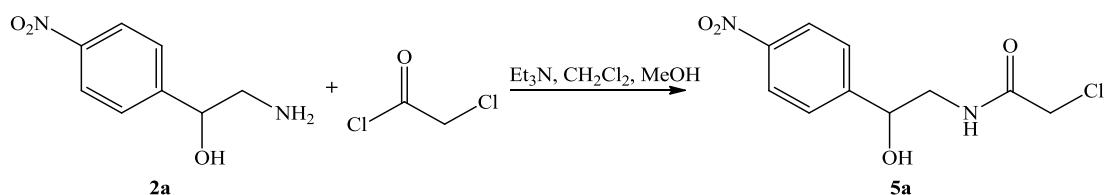
HPLC: t<sub>R</sub> (min) = 6.169; 100 % pri 254 nm (Metoda 1 pri poglavju Materiali in metode)

IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3338, 3063, 2980, 2913, 2875, 2362, 1621, 1548, 1524, 1420, 1347, 1308, 1257, 1072, 896, 805, 741, 684, 655.

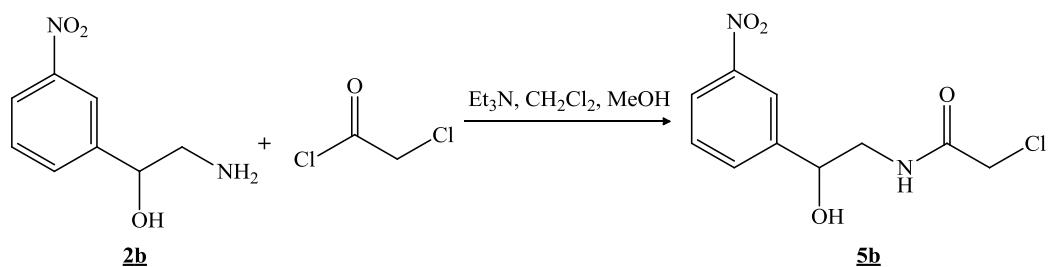
#### 4.5 Sinteza 2-kloro-N-(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)acetamida (**5a**) in 2-kloro-N-(2-hidroksi-2-(3-nitrofenil)ethyl)acetamida (**5b**)

##### Reakcija

###### **5a**



###### **5b**



### **Sintezni postopek**

K raztopini spojine **2a** (850 mg; 4,67 mmol; 1 ekv.) ali **2b** (850 mg; 4,67 mmol; 1 ekv.) v 40 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in 3ml MeOH smo dodali trietilamin (1,43 ml; 10,3 mmol; 2,2 ekv.) ter mešali do popolne raztopitve. Pri 0 °C smo po kapljicah dodali kloroacetilklorid (0,742 ml; 9,33 mmol; 2 ekv.) in mešali 2,5 h. Sledila je ekstrakcija s CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (50 ml), nato smo organsko fazo sprali z 1M HCl (2 x 20 ml), 1M NaHCO<sub>3</sub> (2 x 20 ml) in nasičeno raztopino NaCl (20 ml) ter jo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Reakcijsko zmes smo skoncentrirali na rotavaporju in prekristalizirali produkt iz heksana. Spojina **5a** je bila pripravljena z modifikacijo postopka opisanem v literaturnem viru (37).

### **Rezultati**

- **5a**

Izkoristek reakcije: 65 %

Mr: 258,66 g/mol

Izgled: oranžni kristali

Rf (mobilna faza): 0,47 (EtOAc)

<sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 3.35 (bs, 1H, OH), 3.41 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 14.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 5.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.74 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 14.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 3.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 5.01 (dd, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.0 Hz, 1H, CH), 7.01 (bs, 1H, NHCO), 7.56 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-H), 8.21 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-H).

<sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 100 MHz): δ (ppm) 42.63, 47.47, 72.62, 123.96, 126.88, 147.72, 148.84, 167.72.

- **5b**

Izkoristek reakcije: 61 %

Mr: 258,66 g/mol

Izgled: oranžni kristali

Rf (mobilna faza): 0,46 (EtOAc)

Temperatura tališča: 71-73 °C

MS(ESI): m/z (%) = 257.0 ([MH]<sup>-</sup>, 100), 259.0 ([MH+2]<sup>-</sup>, 32)

HRMS: (m/z=257.0) za C<sub>10</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>Cl izračunana masa 257.0329 in izmerjena 257.0323

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):** δ (ppm) 3.29 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 13.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.8 Hz, *J*<sub>3</sub> = 5.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.37 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 13.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.8 Hz, *J*<sub>3</sub> = 5.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.03 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Cl), 4.82 (dd, *J*<sub>1</sub> = 6.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.5 Hz, 1H, CH), 5.79 (bs, 1H, OH) 7.63 (dd, *J*<sub>1</sub> = 8.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.79 (dd, *J*<sub>1</sub> = 7.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 8.12 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 8.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.3 Hz, *J*<sub>3</sub> = 1.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.21 (dd, *J*<sub>1</sub> = 2.3 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 8.32 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.3 Hz, 1H, NHCO).

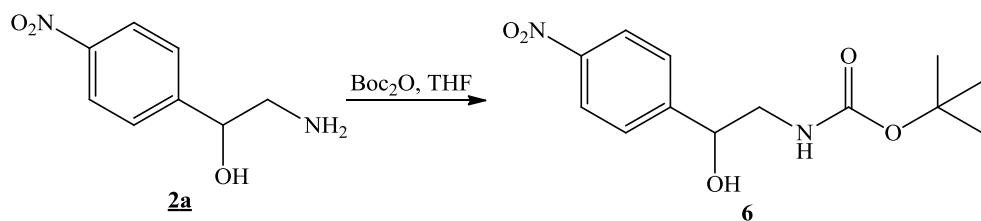
**<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz):** δ (ppm) 42.57, 46.52, 70.09, 120.74, 122.11, 129.61, 132.92, 145.67, 147.69, 166.15.

**HPLC:** t<sub>R</sub> (min) = 4.012; 95 % pri 220 nm (Metoda 3 pri poglavju Materiali in metode)

**IR (ATR, cm<sup>-1</sup>):** 3325, 3087, 2934, 1751, 1640, 1525, 1404, 1343, 1258, 1202, 1071, 897, 816, 765, 736, 692.

#### 4.6 Sinteza *terc*-butil (2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)karbamata (**6**)

##### Reakcija



##### Sintezni postopek

K raztopini spojine **2a** (970 mg; 5,32 mmol; 1 ekv.) v 40 ml THF smo pri 0 °C po kapljicah dodali raztopino Boc anhidrida (1,39 g; 6,38 mmol; 1,2 ekv.) v 5 ml THF. Po 2h smo izolirali produkt tako, da smo reakcijski zmesi dodali 50 ml EtOAc in sprali z 1M HCl (2 x 25 ml), 1M NaHCO<sub>3</sub> (25 ml) in nasičeno raztopino NaCl (25 ml) ter sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Reakcijsko zmes smo skoncentrirali na rotavaporju in produkt prekristalizirali iz EtOAc. Produkt smo dodatno očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: EtOAc : heksan = 1 : 1). Spojina **6** je bila pripravljena po splošnem postopku uvedbe Boc zaščite in je komercialno dostopna (38).

##### Rezultati

**Izkoristek reakcije:** 52 %

**Mr:** 282,29 g/mol

**Izgled:** beli kristali

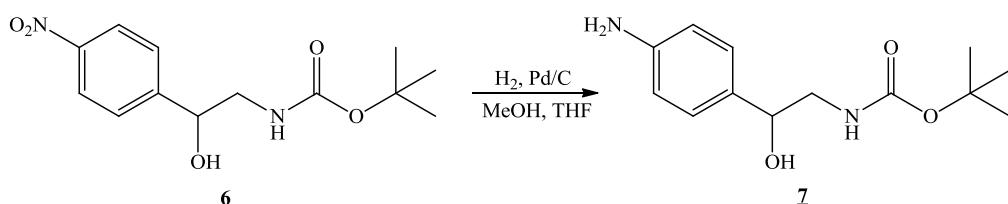
Rf (mobilna faza): 0,19 (EtOAc : heksan = 1 : 1)

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 1.32 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.08 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 13.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 5.0 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.14 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 13.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.5 Hz, *J*<sub>3</sub> = 5.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.72 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 6.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.6 Hz, *J*<sub>3</sub> = 4.6 Hz, 1H, CH), 5.72 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, OH), 6.83 (dd, *J*<sub>1</sub> = 6.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz, 1H, NHCO), 7.58 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-H), 8.19 (d, *J* = 8.7 Hz, 2H, Ar-H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ (ppm) 28.18, 47.70, 70.96, 77.75, 123.15, 127.38, 146.58, 151.64, 155.63.

#### 4.7 Sinteza *terc*-butil (2-(4-aminofenil)-2-hidroksietil)karbamata (7)

##### Reakcija



##### Sintezni postopek

Raztopino **6** (480 mg; 1,70 mmol; 1 ekv.) v 30 ml MeOH in 30 ml THF smo prepihovali z argonom 10 min, dodali 50 mg Pd/C in prepihovali z vodikom 20 min. Odfiltrirali smo katalizator in odparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: DKM : MeOH = 20 : 1). Spojina **7** je bila pripravljena po splošnem postopku katalitskega hidrogeniranja in je komercialno dostopna (39).

##### Rezultati

Izkoristek reakcije: 66 %

Mr: 252,31 g/mol

Izgled: rjavi kristali

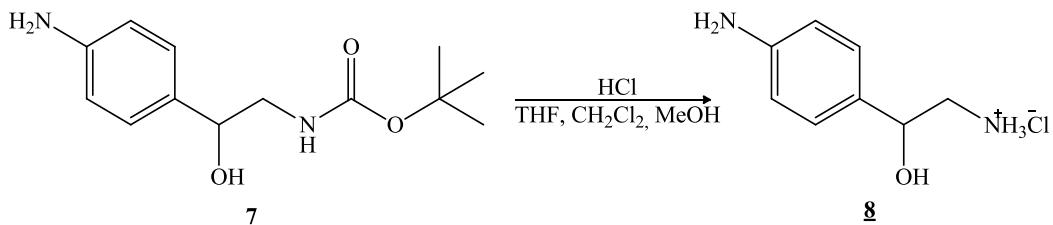
Rf (mobilna faza): 0,25 (DKM : MeOH = 20 : 1)

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 1.36 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 2.93 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 13.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 8.2 Hz, *J*<sub>3</sub> = 5.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.03 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 13.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.2 Hz, *J*<sub>3</sub> = 4.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.38 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 8.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.2 Hz, *J*<sub>3</sub> = 4.5 Hz, 1H, CH), 4.93 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 5.00 (d, *J* = 4.5 Hz, 1H, OH), 6.49 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 6.58 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz, 1H, NHCO), 6.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ (ppm) 28.27, 48.22, 71.35, 77.49, 113.44, 126.73, 130.77, 147.64, 155.59.

#### **4.8 Sinteza 2-(4-aminofenil)-2-hidroksietanaminijevega klorida (8)**

## Reakcija



## **Sintezni postopek**

Spojino **7** (240 mg; 0,951 mmol; 1 ekv.) smo raztopili v 15 ml THF, 18 ml CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in 2 ml MeOH. Po kapljicah smo dodali konc. HCl do pH 2 in sprotno preverjali pH reakcijske zmesi. Po 3 h smo produkt prekristalizirali iz dietiletra. Spojina **8** je bila pripravljena z modifikacijo postopka opisanem v literaturnem viru (40).

## Rezultati

Izkoristek reakcije: 90 %

Mr: 188,65 g/mol

Izgled: oranžni kristali

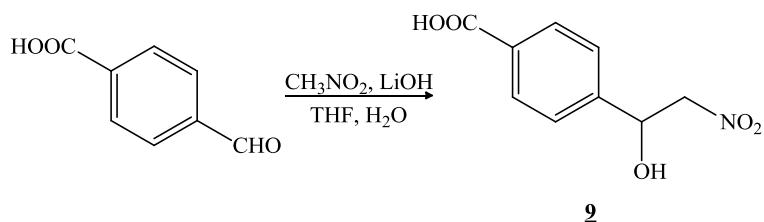
Rf (mobilna faza): 0,08 (DKM : MeOH : Et<sub>3</sub>N = 7 : 1 : 0,1)

**<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz):** δ (ppm) 2.81 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 12.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 9.4 Hz, *J*<sub>3</sub> = 5.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.00 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 12.5 Hz, *J*<sub>2</sub> = 6.4 Hz, *J*<sub>3</sub> = 3.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.89 (dd, *J*<sub>1</sub> = 9.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.1 Hz, 1H, CH), 7.39 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.48 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 8.25 (dd, *J*<sub>1</sub> = 6.4 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.3 Hz, 3H, NH<sub>3</sub>Cl), 10.58 (bs, 2H, NH<sub>2</sub>).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ (ppm) 45.60, 68.55, 123.28, 127.24, 131.38, 141.70.

#### **4.9 Sinteza 4-(1-hidroksi-2-nitroetil)benzojske kisline (9)**

## Reakcija



### **Sintezni postopek**

K raztopini 4-formilbenzojske kisline (1,00 g; 6,66 mmol; 1 ekv.) v 60 ml THF smo dodali nitrometan (2,4 ml; 46,6 mmol; 7 ekv.). Pri 0 °C smo dodali LiOH (191 mg; 7,99 mmol; 1,2 ekv.) in 4 ml destilirane H<sub>2</sub>O, da se je oborina raztopila. Temperatura se je postopoma zvišala na sobno temperaturo, po 3 dneh mešanja smo izvedli ekstrakcijo s 50 ml EtOAc in spirali z 1M HCl (2 x 25 ml), nasičeno raztopino NaCl (25 ml) ter sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

### **Rezultati**

Izkoristek reakcije: 51 %

Mr: 211,17 g/mol

Izgled: beli kristali

Rf (mobilna faza): 0,44 (DKM : MeOH : CH<sub>3</sub>COOH = 20 : 1 : 0,1)

Temperatura tališča: 160-163 °C

MS(ESI): m/z (%) = 210.0 ([MH]<sup>-</sup>, 100)

HRMS: (m/z = 210.0) za C<sub>9</sub>H<sub>8</sub>NO<sub>5</sub> izračunana masa 210.0402 in izmerjena 210.0404

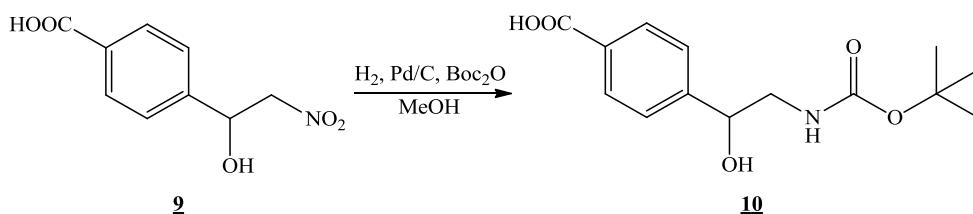
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 4.58 (dd, *J*<sub>1</sub> = 12.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 9.7 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.90 (dd, *J*<sub>1</sub> = 12.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 3.3 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 5.35 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 9.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.0 Hz, *J*<sub>3</sub> = 3.3 Hz, 1H, CH), 6.25 (d, *J* = 5.0 Hz, 1H, OH), 7.57 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.93 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 13.01 (bs, 1H, COOH).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ (ppm) 69.68, 81.61, 126.49, 129.47, 130.40, 145.36, 167.16.

IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3497, 2908, 2668, 2550, 1681, 1609, 1570, 1420, 1380, 1284, 1215, 1081, 1014, 923, 863, 764, 716.

### **4.10 Sinteza 4-((terc-butoksikarbonil)amino)-1-hidroksietilbenzojske kisline (10)**

#### **Reakcija**



### **Sintezni postopek**

Spojino **9** (600 mg; 2,84 mmol; 1 ekv.) smo raztopili v 23 ml MeOH. Bučko smo prepihovali z argonom 10 min, dodali 60 mg Pd/C in Boc anhidrid (682 mg; 3,12 mmol; 1,1 ekv.) in pustili, da se dobro premeša. Po 3,5 h prepihovanja z vodikom smo odfiltrirali katalizator in odparili topilo pri znižanem tlaku. Sledila je izolacija, dodali smo 50 ml EtOAc in sprali z 1M NaOH (2 x 30 ml) in nato nakisali vodno fazo do pH 2. Nato smo iz vodne faze ekstrahirali produkt z EtOAc (2 x 30 ml), organsko fazo sprali z nasičeno raztopino NaCl (25 ml) ter sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo prekristalizirali iz EtOAc, dietiletra in petroletra. Dokončno smo produkt očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: DKM : MeOH : CH<sub>3</sub>COOH = 20 : 1 : 0,1).

### **Rezultati**

Izkoristek reakcije: 49 %

Mr: 281,30 g/mol

Izgled: beli kristali

Rf (mobilna faza): 0,15 (DKM : MeOH : CH<sub>3</sub>COOH = 20 : 1 : 0,1)

Temperatura tališča: 68-70 °C

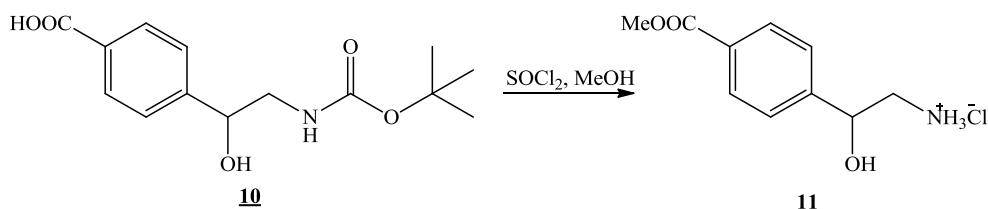
<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 1.22 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.52 (dd, *J*<sub>1</sub> = 6.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 1.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.84 (td, *J*<sub>1</sub> = 6.8 Hz, *J*<sub>2</sub> = 4.6 Hz, 1H, CH), 5.55 (d, *J* = 4.6 Hz, 1H, OH), 7.45 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.89 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, Ar-H), 9.32 (s, 1H, NHCO), 12.65 (bs, 1H, COOH).

<sup>13</sup>C NMR (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz): δ (ppm) 28.54, 58.80, 71.46, 82.22, 127.58, 130.88, 131.60, 149.39, 158.11, 170.14.

IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3239, 2978, 2931, 1683, 1402, 1239, 1163, 1107, 852, 765, 701.

### **4.11 Sinteza 2-hidroksi-2-(4-(metoksikarbonil)fenil)etanaminijevega klorida (**11**)**

#### **Reakcija**



### **Sintezni postopek**

K raztopini spojine **10** (300 mg; 1,07 mmol; 1 ekv.) v 40 ml MeOH smo pri 0 °C počasi dodali SOCl<sub>2</sub> (85 µl; 1,17 mmol; 1,1 ekv.) in mešali 12 h tako, da se je temperatura postopoma zvišala na sobno temperaturo. Po končani reakciji smo izvedli prekristalizacijo iz EtOAc, MeOH in dietiletra.

### **Rezultati**

Izkoristek reakcije: 63 %

Mr: 231,68g/mol

Izgled: rumeni kristali

Rf (mobilna faza): 0,41 (DKM : MeOH : CH<sub>3</sub>COOH = 20 : 1 : 0,1)

Temperatura tališča: 217-219 °C

MS(ESI): m/z (%) = 113.0 (100), 180.1 (93), 196.1 ([M-Cl], 87)

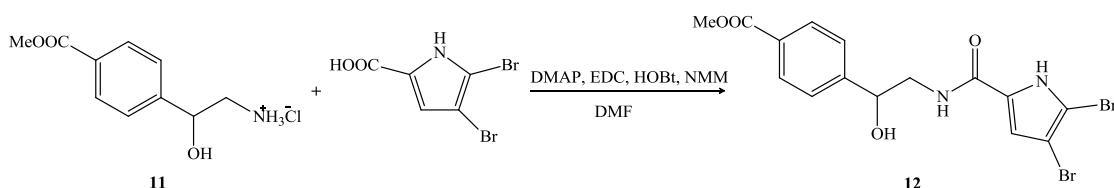
HRMS: (m/z = 196.1) za C<sub>10</sub>H<sub>14</sub>NO<sub>3</sub> izračunana masa 196.0974 in izmerjena 196.0969

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 3.23 (dd, *J*<sub>1</sub> = 12.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 10.2 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.34 (dd, *J*<sub>1</sub> = 12.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.86 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 5.11 (dd, *J*<sub>1</sub> = 10.2 Hz, *J*<sub>2</sub> = 2.8 Hz, 1H, CH), 6.31 (bs, 1H, OH), 7.56 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.98 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, Ar-H).

IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3416, 2944, 1688, 1605, 1486, 1419, 1380, 1282, 1225, 1110, 1005, 852, 767, 701.

### **4.12 Sintesa metil 4-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid)-1-hidroksietil)benzoata (**12**)**

#### **Reakcija**



### **Sintezni postopek**

K spojini **11** (427 mg; 1,84 mmol; 1 ekv.) smo dodali 4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilno kislino (703 mg; 2,61 mmol; 1,4 ekv.), HOBt (59 mg; 0,437 mmol; 0,2 ekv.), DMAP (4-

dimetilaminopiridin; 53 mg; 0,434 mmol; 0,2 ekv.), 1,2 ml NMM (*N*-metilmorfolin, 6 ekv.) in vse skupaj raztopili v 20 ml DMF. Pri 0 °C smo dodali EDC (483 mg; 3,11 mmol; 1,7 ekv.) in pustili mešati 24 h tako, da se je temperatura postopoma zvišala na sobno temperaturo. Po končani reakciji smo odparili topilo pod znižanim tlakom. Sledila je ekstrakcija s 100 ml etilacetata, nato smo organsko fazo sprali s citronsko kislino (2 x 25 ml), 1M NaHCO<sub>3</sub> (2 x 25 ml) in nasičeno raztopino NaCl (25 ml) ter sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Reakcijsko zmes smo skoncentrirali na rotavaporju in produkt očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: DKM : MeOH = 20 : 1).

## **Rezultati**

Izkoristek reakcije: 53 %

Mr: 446,09 g/mol

Izgled: beli kristali

Rf (mobilna faza): 0,20 (DKM : MeOH = 20 : 1)

Temperatura tališča: 198-200 °C

<sup>1</sup>H NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 400 MHz): δ (ppm) 3.73 (dd, *J*<sub>1</sub> = 13.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.8 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 3.84 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.87 (dd, *J*<sub>1</sub> = 13.7 Hz, *J*<sub>2</sub> = 7.6 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>), 4.99 (ddd, *J*<sub>1</sub> = 7.6 Hz, *J*<sub>2</sub> = 5.8 Hz, *J*<sub>3</sub> = 4.7 Hz, 1H, CH) , 5.69 (d, *J* = 4.7 Hz, 1H, OH), 6.91 (s, 1H, Ar-H (pirol)), 7.51 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.91 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, Ar-H), 10.13 (s, 1H, NH(pirol)).

<sup>13</sup>C NMR (DMSO-d<sub>6</sub>, 100 MHz): δ (ppm) 52.08, 55.92, 68.81, 98.08, 105.46, 117.06, 125.87, 126.43, 128.43, 128.99, 148.90, 159.02, 166.16.

HPLC: t<sub>R</sub> (min) = 5.990; 99 % pri 254 nm (Metoda 1 pri poglavju Materiali in metode)

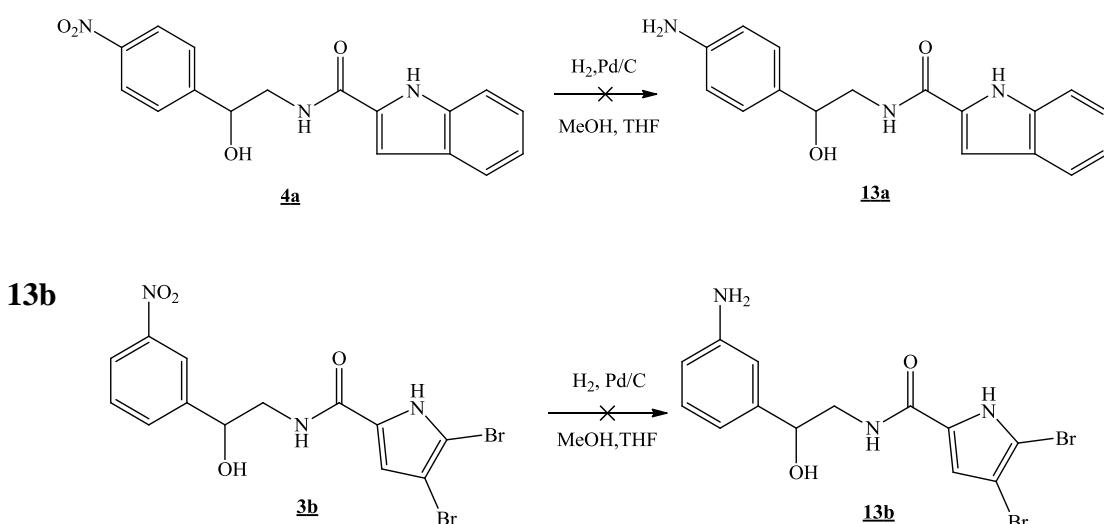
IR (ATR, cm<sup>-1</sup>): 3402, 3161, 2997, 2946, 2880, 1715, 1591, 1542, 1463, 1407, 1279, 1245, 1185, 1110, 1050, 1015, 975, 890, 845, 770, 731, 703.

## **POSKUSI SINTEZ**

**4.13 Poskus sinteze *N*-(2-(4-aminofenil)-2-hidroksietil)-1*H*-indol-2-karboksamida (13a) in *N*-(2-(3-aminofenil)-2-hidroksietil)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamida (13b)**

## Reakcija

13a

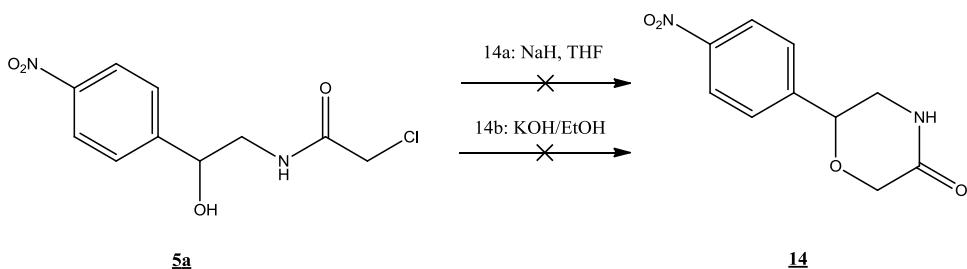


## Sintezni postopek

Raztopino **4a** (100 mg; 0,307 mmol) ali **3b** (100 mg; 0,231 mmol) v 5 ml MeOH in 5 ml THF smo za 10 min prepihali z argonom. Nato smo dodali katalizator Pd/C (10 mg, 10 % mase izhodne spojine), prepihali bučko z vodikom in pustili teči reakcijo 12 h pod vodikovo atmosfero. Po koncu reakcije smo odnučali katalizator in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo poskusili očistiti s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: heksan : etilacetat = 2 : 1 (**13a**); heksan : etilacetat = 1 : 1 (**13b**)). Po pregledu posnetega  $^1\text{H}$  NMR spektra reakcija ni potekla.

#### **4.14 Poskus sinteze 6-(4-nitrofenil)morfolin-3-ona (14)**

## Reakcija



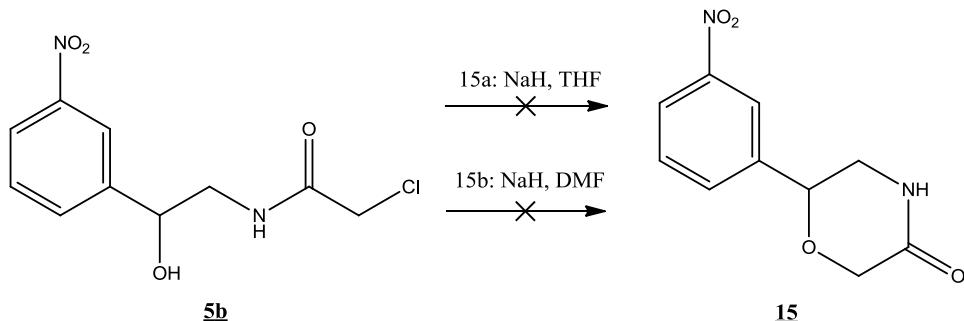
### Sintezni postopek

Pri reakciji **14a** smo spojino **5a** (400 mg; 1,55 mmol) raztopili pod argonovo atmosfero v 30 ml brezvodnega THF in raztopino ohladili na 0 °C. Nato smo dodali 60 % NaH (124 mg; 3,1 mmol; 2 ekv.) ter pustili mešati 12 h tako, da se je temperatura postopoma zvišala na sobno temperaturo. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in produkt čistili z ekstrakcijo. Dodali smo 100 ml EtOAc, organsko fazo smo spirali z nasičeno raztopino NaCl (2 x 25 ml) ter sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Reakcijsko zmes smo skoncentrirali na rotavaporju. Po pregledu posnetega <sup>1</sup>H NMR spektra reakcija ni potekla.

Pri reakciji **14b** smo spojino **5a** (40 mg; 0,155 mmol) raztopili v raztopini KOH (13 mg, 0,233 mmol; 1,5 ekv.) v 7 ml etanola. Reakcijsko zmes smo mešali pri refluksu 2,5 h. Nato smo dodali 50 ml EtOAc, organsko fazo smo spirali z nasičeno raztopino NaCl (2 x 20 ml) ter sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po filtraciji smo reakcijsko zmes skoncentrirali na rotavaporju do suhega. Po pregledu posnetega <sup>1</sup>H NMR spektra reakcija ni potekla.

### **4.15 Poskus sinteze 6-(3-nitrofenil)morfolin-3-ona (**15**)**

#### Reakcija



### Sintezni postopek

Pri reakciji **15a** smo raztopili spojino **5b** (182 mg; 0,704 mmol) v 15 ml brezvodnega THF pod argonovo atmosfero. Raztopino smo ohladili na 0 °C in dodali 60 % NaH (56,3 mg; 1,41 mmol, 2 ekv.) ter pustili mešati 12 h tako, da se je temperatura postopoma zvišala na sobno temperaturo. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in produkt čistili z ekstrakcijo. Dodali smo 50 ml EtOAc, organsko fazo smo spirali z nasičeno raztopino NaCl (2 x 25 ml) ter sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po filtraciji smo reakcijsko zmes skoncentrirali na rotavaporju in produkt prekristalizirali iz MeOH. Po pregledu posnetega <sup>1</sup>H NMR spektra reakcija ni potekla.

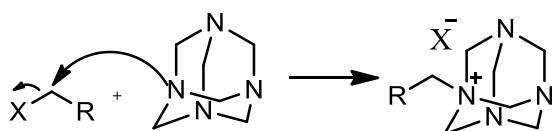
V reakciji **15b** smo raztopili spojino **5b** (100 mg; 0,387 mmol) v 2 ml DMF pod argonovo atmosfero. Raztopino smo ohladili na 0 °C in dodali 60 % NaH (31 mg; 0,774 mmol; 2 ekv.) ter pustili mešati 12 h tako, da se je temperatura postopoma zvišala na sobno temperaturo. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in produkt čistili z ekstrakcijo. Dodali smo 30 ml EtOAc, organsko fazo smo spirali s citronsko kislino (2 x 7,5 ml), nasičeno raztopino NaCl (15 ml) ter sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po filtraciji smo reakcijsko zmes skoncentrirali na rotavaporju in produkt skušali očistiti s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: EtOAc: heksan = 3 : 2, dodan 1 % CH<sub>3</sub>COOH). Po pregledu posnetega <sup>1</sup>H NMR spektra reakcija ni potekla.

## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 KOMENTAR K SINTEZNIM POSTOPKOM

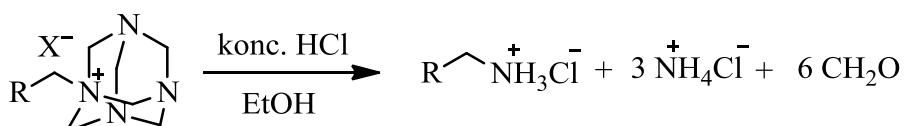
#### 5.1.1 Sinteza 2-(4-nitrofenil)-2-oksoetanaminijevega klorida (**1a**) in 2-(3-nitrofenil)-2-oksoetanaminijevega klorida (**1b**)

Sintezo primarnega amina iz alkil halida smo izvedli z Delépinovo reakcijo. Za Delépinovo reakcijo sta potrebna aktiviran halid (benzil, alil ali  $\alpha$ -halo-keton) in heksametilentetramin (HMTA). V našem primeru je aktiviran halid  $\alpha$ -bromo-keton. Reakcija je nukleofilna substitucija in poteka po  $S_N2$  mehanizmu, pri katerem nukleofilni dušik napade elektrofilni ogljik alkil halida ter pri tem izstopi  $X^-$ . Produkt reakcije je heksametilentetraminijeva sol, ki v našem primeru izkristalizira v  $CH_2Cl_2$ . (41)



**Slika 7:** Reakcija alkil halidov s heksametilentetraminom vodi v tvorbo produkta heksametilentetraminijeve soli. Povzeto po (34).

Heksametilentetramin je stabilen v nevtralnih vodnih pogojih tudi ob povišani temperaturi, razpade pa ob dodatku razredčene kisline. Zato heksametilentetraminijeva sol po dodatku konc. HCl in EtOH hidrolizira v aminijev klorid, amonijev klorid in formaldehid. (41)

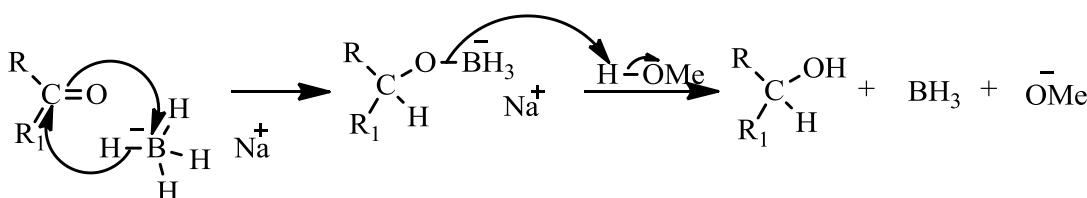


**Slika 8:** Reakcija heksametilentetraminijeve soli po dodatku konc. HCl in EtOH vodi v tvorbo produktov aminijevega klorida, amonijevega klorida in formaldehyda. Povzeto po (41).

#### 5.1.2 Sinteza 2-amino-1-(4-nitrofenil)etanola (**2a**) in 2-amino-1-(3-nitrofenil)etanola (**2b**)

Pri tej reakciji smo keton pretvorili v alkohol s pomočjo reducenta  $NaBH_4$  in aminijev sol v amin z 1M NaOH.  $NaBH_4$  je šibkejši reducent kot  $LiAlH_4$  in se največkrat uporablja za redukcije aldehidov in ketonov v alkohole. Ker je manj reaktiv, lahko za topilo uporabimo tudi metanol, kot v našem primeru. Reakcija je nukleofilna adicija hidridnega iona na elektrofilni karbonilni ogljik. Ker  $NaBH_4$  reagira tudi s protoni v topilu

in ob tem tvori  $H_2$  kot stranski produkt, je potrebno reducent dodati v prebitku. Bazičnost reakcijske zmesi med reakcijo počasi narašča, ker nastaja alkoksidni ion. Reakcija je eksotermna, zato  $NaBH_4$  dodajamo počasi pri 0 °C. Po koncu reakcije s kislo hidrolizo onemogočimo delovanje prebitnega  $NaBH_4$ , v našem primeru smo uporabili rahlo kislo nasičeno raztopino  $NH_4Cl$ . (42)



**Slika 9:** Reakcija karbonilne skupine z  $NaBH_4$  in tvorba alkohola. Povzeto po (42).

Metanol smo odparili pod znižanim tlakom, saj bi zaradi topnosti v vodi motil ekstrakcijo. Nato z dodatkom 1M NaOH spremenimo ionizirano obliko amina v neionizirano, ki je netopna v vodi, in spojina se izobori.

### 5.1.3 Sinteza **4,5-dibromo-N-(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)-1*H*-pirol-2-karboksamida (3a), 4,5-dibromo-N-(2-hidroksi-2-(3-nitrofenil)ethyl)-1*H*-pirol-2-karboksamida (3b) in 4,5-dikloro-N-(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)-1*H*-pirol-2-karboksamida (3c)**

V tej reakciji amidno vez tvorimo v mikrovalovnem reaktorju. Za tvorbo amidne vezi karboksilna kislina pri sobnih pogojih ni dovolj reaktivna, zato jo je običajno potrebno aktivirati. Aktivacija karboksilne kisline je mogoča s substitucijo slabo izstopajoče OH skupine z dobro izstopajočo skupino (elektron privlačne skupine). Ena od možnosti je tudi uporaba triklorometil ketonov, pri katerih je izstopajoči karboanion stabiliziran s tremi elektron privlačnimi skupinami. Ob tem poteče nukleofilna substitucija z napadom nukleofilnega amina na elektrofilni karbonilni ogljik in nastane nestabilen tetraedrični intermedijat, ki z odcepitvijo dobro izstopajoče skupine tvori amid. Dodatek baze nevtralizira sproščen proton.

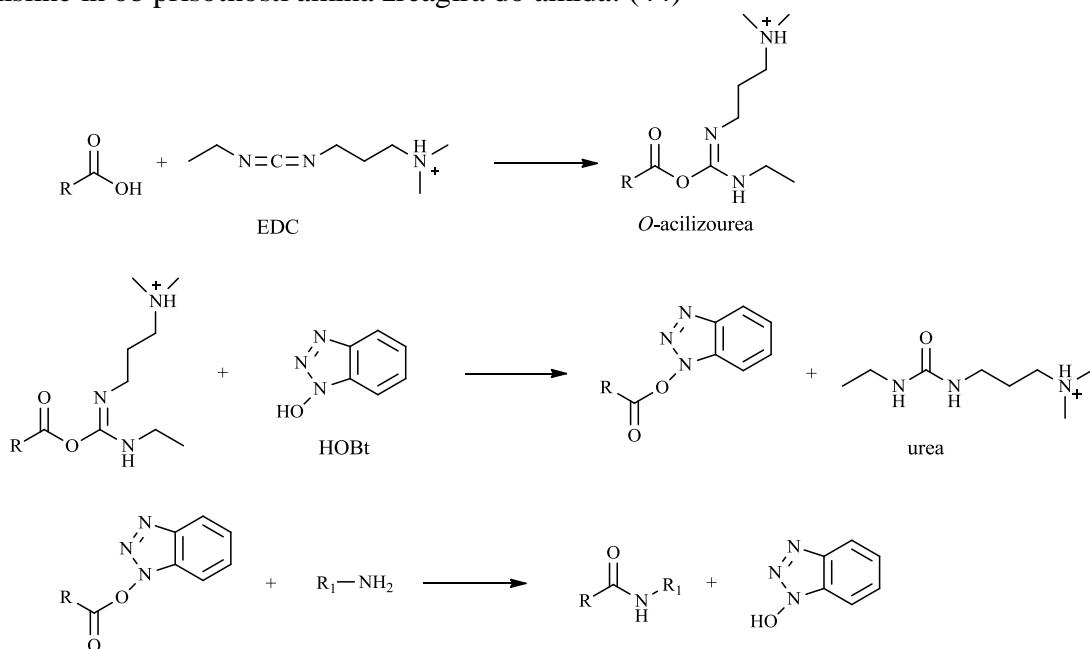
Uporaba mikrovalov je kar v nekaterih primerih uspešnejša alternativa izvajanju reakcij s klasičnim segrevanjem z visokimi temperaturami. Mikrovalovi so kot elektromagnetno valovanje sestavljeni iz oscilirajočega električnega polja, ki povzroči rotiranje dipolarnih molekul in nastanek toplotne. Prednosti izvajanja reakcije z mikrovalovi

so: zmanjšanje reakcijskega časa, zmanjšanje števila stranskih reakcij, večji izkoristki in potek reakcij, ki s klasičnim segrevanjem ne bi potekle. (43, 44)

#### 5.1.4 Sinteza *N*-(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)-1*H*-indol-2-karboksamida (**4a**) in *N*-(2-hidroksi-2-(3-nitrofenil)ethyl)-1*H*-indol-2-karboksamida (**4b**)

Pri tej reakciji smo tvorili amidno vez po drugačni poti. Uporabili smo karbodiimidni »coupling« reagent EDC (1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid) in pomožni nukleofil HOBr (1-hidroksibenzotriazol) v »one-pot« sintezi.

Z EDC smo najprej aktivirali karbonilni C atom kisline, ki je šibek elektrofil. Nastal je aktiviran ester s povečano elektrofilnostjo karbonilnega C atoma. Ta del reakcije poteče kot adicija karboksilatnega iona (nukleofil) na karbodiimidni C atom (elektrofil) in kot produkt nastane *O*-acilizosečnina ali *O*-acilizourea oz. aktiviran ester. V drugem delu reakcije *O*-acilizosečnina reagira z aminom, nastane amid in vodotopen derivat sečnine. Ta reakcija poteče kot nukleofilna substitucija z napadom amina na karbonilni C atom in izstopom derivata sečnine. Ob prisotnosti pomožnega nukleofila HOBr, ki reagira z *O*-acilizosečnino, se tvori manj reaktivni benzotriazolni ester, ki je še vedno dovolj aktiviran za reakcijo z aminom. *O*-acilizosečnina lahko reagira tudi po alternativnem mehanizmu z eno molekulo karboksilne kisline, pri tem nastane simetrični anhidrid karboksilne kisline in derivat sečnine. Anhidrid je prav tako kot *O*-acilizosečnina oblika aktivacije karboksilne kisline in ob prisotnosti amina zreagira do amida. (44)



Slika 10: Sinteza amidne vezi med karboksilno kislino in aminom z EDC in HOBr. Povzeto po (44).

Neželene stranske reakcije so: premestitev acilnega dela *O*-acilizosečnine in nastanek *N*-acilsečnine, tvorba gvanidinskih derivatov med EDC in aminom, ciklizacija, racemizacija. Nastanek *N*-acilsečnine v največji meri preprečimo z ohladitvijo reakcijske zmesi na 0 °C. Pomožni nukleofil HOBr pa reagira hitreje z *O*-acilizosečnino, kot pride do premestitve acilne skupine, ter na ta način prepreči stranske reakcije.

Dodatek bazičnega *N*-metilmorfolina ustvari alkalno okolje in ionizacijo karboksilne kisline, ki je nujna za začetek reakcije.

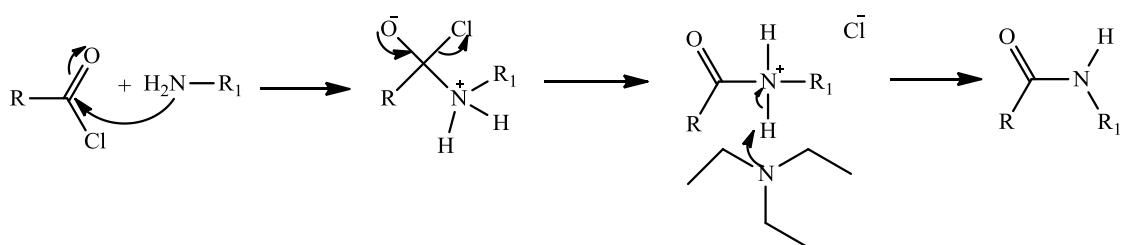
### **5.1.5 Sinteza 2-kloro-*N*-(2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)acetamida (**5a**) in 2-kloro-*N*-(2-hidroksi-2-(3-nitrofenil)ethyl)acetamida (**5b**)**

V tej reakciji smo uporabili še tretji način tvorbe amidne vezi in to s pomočjo kislinskega klorida. Kislinski klorid je način aktiviranja karboksilne kisline in v reakciji z aminom tvori amid.

Reakcija spada med nukleofilne substitucije, pri kateri na začetku nukleofilna amino skupina napade elektrofilni C atom karbonilne skupine, nato sledi izstop Cl<sup>-</sup>, ki je dobro izstopajoča skupina, in H<sup>+</sup>. Stranski produkt sinteze je HCl, zato je potreben dodatek baze za njeno nevtralizacijo. V našem primeru je to trietilamin, ki smo ga dodali v prebitku.

Kloroacetilklorid lahko reagira z aminom na dva načina. Najverjetnejši je potek *N*-aciliranja (glavna reakcija), saj je karbonilni C atom bolj elektrofilen kot alkil kloridni C atom in ga bo amin prej napadel. Druga možnost je *N*-alkiranje (stranska reakcija), kjer amin napade manj elektrofilni alkil kloridni C atom.

Pri reakciji na majhni skali smo s poizkušanjem odkrili razmerje med CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in MeOH, kjer se izhodna spojina raztopi. Pred dodatkom kloroacetilklorida reakcijsko zmes dobro ohladimo na ledo, da preprečimo potek stranskih reakcij. Produkt smo čistili z ekstrakcijo, pri kateri smo organsko fazo najprej spirali z 1M HCl, da smo odstranili bazične spojine (prebitni Et<sub>3</sub>N in nezreagirana izhodna spojina), spiranje smo nadaljevali z NaHCO<sub>3</sub> (odstranimo nastali HCl) ter odstranili vodo z nasičeno raztopino NaCl in sušenjem nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

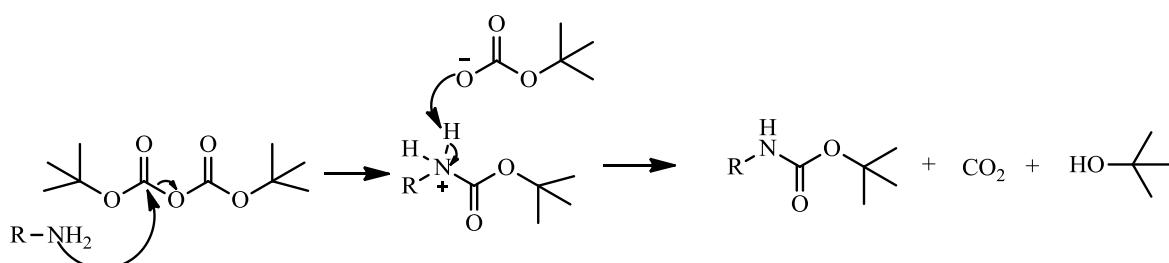


Slika 11: Mehanizem reakcije med kislinskim kloridom in aminom ob dodatku trietilamina.

### 5.1.6 Sinteza *terc*-butil (2-hidroksi-2-(4-nitrofenil)ethyl)karbamata (6)

Izhodna spojina ima več funkcionalnih skupin v svoji strukturi, kar bi lahko pomenilo težavo za nadaljnji potek reakcij. Zato smo se odločili, da amino skupino zaščitimo z di-*terc*-butil dikarbonatom ( $\text{Boc}_2\text{O}$ ) v obliki *terc*-butil karbamata. Karbamat je stabilen pri pH 4-12, katalitskem hidrogeniranju, pri dodatku hidridov in oksidantov.

Reakcija spada med nukleofilne substitucije oz. *N*-aciliranje. Nukleofilna amino skupina napade elektrofilni C atom karbonilne skupine  $\text{Boc}_2\text{O}$  in pri tem nastane tetraedrični intermediat. Sledi izstop *terc*-butil hidrogenkarbonata, ki je zelo nestabilen in takoj razpade na  $\text{CO}_2$  in *terc*-butanol. Končni produkt je ester karbaminske kisline ali karbamat. Z ohladitvijo reakcijske zmesi in počasnim dodajanjem regenta  $\text{Boc}_2\text{O}$  smo usmerili reakcijo v nastajanje pretežno *N*-aciliranega produkta.

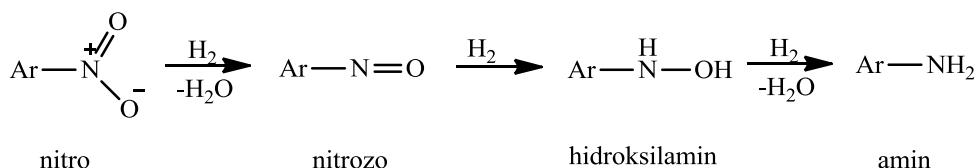


Slika 12: Mehanizem reakcije med aminom in  $\text{Boc}_2\text{O}$ .

### 5.1.7 Sinteza *terc*-butil (2-(4-aminofenil)-2-hidroksietil)karbamata (7)

Redukcijo nitro skupine v amino skupino smo izvedli s katalitskim hidrogeniranjem. Ta reakcija poteka v vodikovi atmosferi ob prisotnosti dobro uprašenega katalizatorja, v našem primeru je bil to paladij (Pd/C). Da se izboljša stik med vodikom, katalizatorjem in izhodno spojino, je katalizator adsorbiran na aktivni ogljik z veliko specifično površino. Mehanizem še ni dokončno pojasnjen, vendar naj bi redukcija

potekala postopno, preko nitrozo in hidroksilaminskega intermediata do končnega produkta amina.



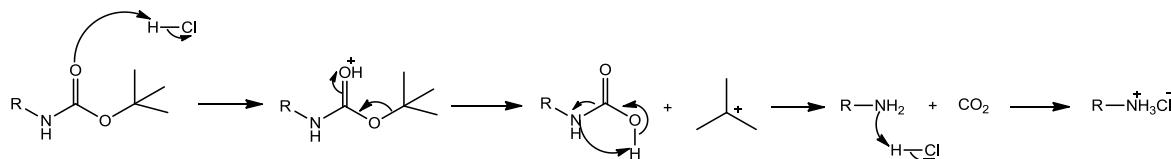
Slika 13: Predlagan mehanizem redukcije aromatske nitro skupine v amino skupino.

Ustrezno topilo vpliva na pravilen potek reakcije in na primerno topnost izhodne spojine ter vodika. Ugotovili smo, da je najprimernejše topilo za redukcijo nitro skupine zmes topil MeOH/ THF v razmerju 1:1. Če smo pustili reakcijo teče dlje kot 20 min, so se na TLC začele pojavljati dodatne lise nad našim produktom. Mogoča stranska reakcija, ki bi lahko potekla, je ciklizacija. Zato smo produkt očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: DKM : MeOH = 20 : 1).

### 5.1.8 Sinteza 2-(4-aminofenil)-2-hidroksietanaminijevega klorida (8)

Selektivna odstranitev karbamata oz. odščita amino skupine poteka z acidolizo. V kislih pogojih se *terc*-butil karbamat protonira, kar povzroči izstop *terc*-butil karbokationa, ki je stabiliziran s pozitivnim induktivnim efektom treh metilnih skupin. Karbokation lahko reagira z razpoložljivim nukleofilom, ki je v našem primeru metanol in nastane *terc*-butil metil eter (2-metoksi-2-metilpropan), ali pa nastane plin izobuten (2-metilpropen). Z izstopom karbokationa nastane karbaminska kislina, ki je zelo nestabilna in takoj razpade na amin in  $CO_2$ .

Ustrezno mešanico topil (THF/  $CH_2Cl_2$ / MeOH), kjer se izhodna spojina raztopi, smo odkrili s poizkušanjem pri reakciji na majhni skali. Konc. HCl smo dodajali po kapljicah in hkrati dobro mešali, da ni prišlo do lokalnega prenakisanja, ter sproti preverjali kislost raztopine. Alkil amin v kislih pogojih obstaja v protonirani obliki, torej v obliki soli s HCl. Aromatski amin je dosti manj bazičen kot alkil amin, zato ostane v neionizirani obliki. Produkt čistimo s kristalizacijo iz dietiletra.

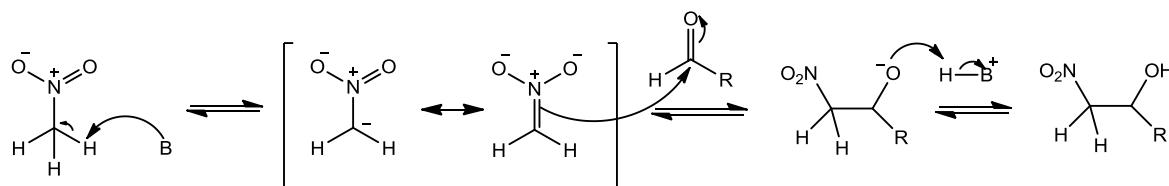


Slika 14: Mehanizem odščite *terc*-butil karbamata s HCl.

Nadaljnja reakcija, ki je žal nismo uspeli izvesti zaradi časovne omejitve, je bila tvorba amidne vezi med spojino **8** in 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-il)etanonom oz. 2,2,2-trikloro-1-(4,5-dikloro-1*H*-pirol-2-il)etanonom. Dobljeni spojini bi nam omogočili derivatizacijo aromatskega amina in dobro interakcijo z Arg144 giraze B.

### 5.1.9 Sinteza 4-(1-hidroksi-2-nitroethyl)benzojske kisline (**9**)

Za sintezo  $\beta$ -nitro alkohola smo uporabili Henry-evo reakcijo oz. nitro-aladol reakcijo. Pri reakciji med nitroalkanom in aldehydom oz. ketonom se tvori C-C vez v prisotnosti baze. Prva stopnja reakcije je deprotonacija  $\alpha$ -C atoma nitroalkana s pomočjo baze in nastanek resonančno stabiliziranega aniona. Ta anionski intemediat nato napade karbonilni C atom in tvori  $\beta$ -nitro alkoksid. Alkoksid se protonira s pomočjo prej protonirane baze in nastane  $\beta$ -nitro alkohol.



**Slika 15:** Mehanizem reakcije med nitrometanom in aldehydom v prisotnosti baze (B).

Reakcija je reverzibilna, kar lahko upočasni nastajanje želenega produkta. Stranska reakcija, ki lahko poteče je eliminacija vode in nastanek nitroalkena. Zelo bazični pogoji lahko vodijo do Cannizzaro-ve reakcije in neželenih stranskih produktov (primarni alkohol in kislina). Z ohladitvijo reakcijske zmesi na 0 °C skušamo preprečiti nastanek stranskih reakcij. Na manjši skali smo preizkusili vpliv različnih baz na potek reakcije: LiOH in KOtBu. Reakcija s KOtBu ni potekla. KOtBu je močnejša baza od LiOH in mogoče je razlog neuspešne reakcije v premočni bazi ali v prevelikem poteku stranskih reakcij.

### 5.1.10 Sinteza 4-((terc-butoksikarbonil)amino)-1-hidroksietil)benzojske kisline (**10**)

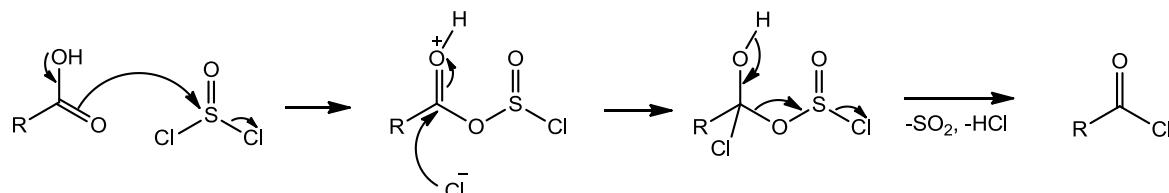
Pri tej reakciji smo združili redukcijo nitro skupine v amino skupino in zaščito novonastale amino skupine z Boc anhidridom. Najprej poteče redukcija preko katalitskega hidrogeniranja. Ta reakcija poteka v vodikovi atmosferi ob prisotnosti dobro uprašenega katalizatorja, v našem primeru je to bil paladij (Pd/C). Sledi zaščita amino skupine z di-terc-butil dikarbonatom (Boc<sub>2</sub>O) v obliko *terc*-butil karbamata. Obe reakciji potečeta po že poprej razloženih mehanizmih pri **5.1.7** in **5.1.6**.

Ustrezno topilo vpliva na pravilen potek reakcije in na primerno topnost izhodne spojine, vodika in Boc anhidrida. V našem primeru je bilo najprimernejše topilo MeOH. Med ekstrakcijo pretvorimo spojino v neionizirano obliko z nakisanjem. Ob neprevidnem prevelikem povečanju kislosti oz. prenizkem pH bi lahko povzročili odščito Boc zaščite, zato smo kislino dodajali počasi med mešanjem in sprotno preverjali pH reakcijske zmesi. Izvedli smo ekstrakcijo, odparili topilo pod znižanim tlakom, produkt prekristalizirali iz EtOAc, dietiletra in petroletra ter ga dokončno očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: DKM : MeOH : CH<sub>3</sub>COOH = 20 : 1 : 0,1).

### 5.1.11 Sinteza 2-hidroksi-2-(4-(metoksikarbonil)fenil)etanaminijevega klorida (11)

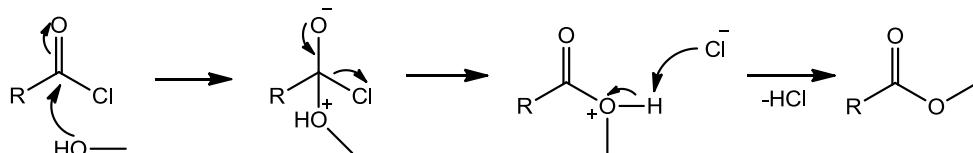
Pri tej reakciji smo združili odščito amino skupine in zaščito karboksilne skupine v obliko metilnega estra. Najprej aktiviramo kislino s pomočjo SOCl<sub>2</sub> in tvorimo kislinski klorid, ki nato reagira z metanolom v metilni ester. Pri reakciji z SOCl<sub>2</sub> in pri tvorbi estra nastaja HCl, ki povzroči acidolizo Boc zaščite.

Reakcija tvorbe kislinskega klorida se začne z napadom nukleofilnega dela karboksilne kisline na elektrofilno žveplo. Sledi eliminacija kloridnega iona in takojšen nukleofilni napad kloridnega iona na acilni C atom. Tvori se zelo nestabilen tetraedrični intermediat, ki razpade na acil klorid, SO<sub>2</sub> in HCl.



Slika 16: Mehanizem reakcije tvorbe kislinskega klorida med kislino in SOCl<sub>2</sub>.

Sledi tvorba metilnega estra oz. zaščita karboksilne kisline. Poteče nukleofilna substitucija oz. *O*-aciliranje. Nukleofilna hidroksi skupina alkohola napade elektrofilni C atom karbonilne skupine kislinskega klorida in pri tem nastane tedraedrični intermediat. Sledi izstop kloridnega iona, deprotonacija s pomočjo kloridnega iona in nastanek estra ter HCl.



Slika 17: Mehanizem reakcije tvorbe metilnega estra med kislinskim kloridom in metanolom.

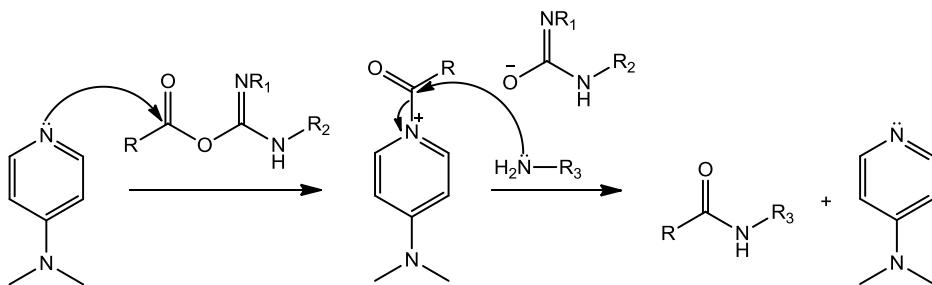
Odščita Boc je posledica nastajanja HCl pri obeh zgoraj omenjenih reakcijah in dejstva, da je Boc zaščita občutljiva na kisle pogoje. Mehanizem je opisan v **5.1.8.**

Reakciji esterifikacije in odščite naj bi potekale istočasno. Za uspešnost reakcije sta pomembni razmerje izhodne spojine proti  $\text{SOCl}_2$  in izbira alkohola, najboljši izkoristki so pri metanolu. (45)

### 5.1.12 Sinteza metil 4-(2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamid)-1-hidroksiethyl)benzoata (12)

Pri tej reakciji smo tvorili amidno vez kot v je razloženo v **5.1.4.** Uporabili smo karbodiimidni »coupling« reagent EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid) in pomožni nukleofil HOBt (1-hidroksibenzotriazol) v »one-pot« sintezi.

Dodatno smo uporabili še DMAP (4-dimetilaminopiridin) v katalitskih količinah, uporablja se podobno kot HOBt kot pomožni nukleofil oz. nukleofilni katalizator pri sintezi estrov in amidov. Aromatski dušikov atom v DMAP napade elektrofilni C atom *O*-acilizosečnine. Nastane piridinijeva sol, ki je močan elektrofil in reagira z aminom ter prepreči tvorbo stranskega produkta *N*-acilsečnine.



**Slika 18:** Mehanizem reakcije med DMAP in *O*-acilizosečnino.

Povečali smo dodatek bazičnega *N*-metilmorfolina, saj je za začetek reakcije potrebno spremeniti protoniran amin izhodne spojine v neionizirano obliko. Poleg tega je *N*-metilmorfolin potreben za ionizacijo karboksilne kisline in nevtralizacijo aminijevega klorida v EDC.

## **POSKUSI SINTEZ**

### **5.1.13 Poskus sinteze *N*-(2-(4-aminofenil)-2-hidroksietil)-1*H*-indol-2-karboksamida (**13a**) in *N*-(2-(3-aminofenil)-2-hidroksietil)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamida (**13b**)**

Redukcijo nitro skupine v amino skupino smo poskusili izvesti s katalitskim hidrogeniranjem kot pri **5.1.7.** Reakcija ni uspela ne pri *p*-nitrofenil derivatu kot tudi ne pri *m*-nitrofenil derivatu, saj kljub izvedeni kolonski kromatografiji nismo uspeli izolirati pravega produkta. Možni vzroki, da reakcija ni potekla, so lahko v prevelikem poteku stranskih reakcij (hidrogeniranje pirola). Reakcije nismo optimizirali v smislu preskušanja drugih topil, saj smo spremenili sintezno pot tako, da smo poskušali najprej reducirati nitro skupino v amino in šele nato tvoriti amidno vez. To se je izkazalo za pravilno odločitev, saj je redukcija nitro skupine potekla pri reakciji **7** ob zaščitenem aminu v obliki *tert*-butil karbamata. Amino skupina na aromatskem obroču je ključnega pomena, saj bi z nadaljnjo derivatizacijo (tvorbo amida) poskrbeli za dobro interakcijo z Arg144 tarčnega encima giraze B, ki je ena najpomembnejših vezav za dobro inhibicijo.

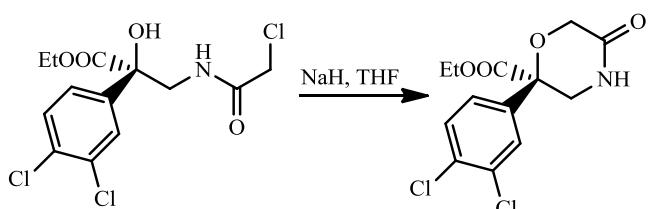
### **5.1.14 Poskus sinteze 6-(4-nitrofenil)morfolin-3-ona (**14**) in 6-(3-nitrofenil)morfolin-3-ona (**15**)**

Aminoetanolni fragment smo želeli ciklizirati v derivat morfolin-3-ona, da bi rigidizirali spojino, ohranili fenilni in pirolni obroč na primernem mestu za vezavo ter izboljšali vezavo v aktivno mesto tarčnega encima giraze B.

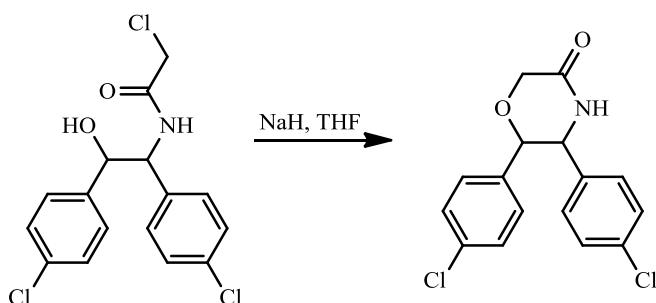
Sintezo smo izvedli po različnih literurnih virih, vendar nam v nobeni reakciji ni uspelo sintetizirati želenega obroča. Zaradi velike podobnosti med našimi izhodnimi spojinami in izhodnimi spojinami v literurnih virih smo pričakovali, da bo reakcija potekla. Izhodne spojine v literurnih virih imajo na aminoetanol vezan en ali dva fenilna obroča (2-aminofeniletanol ali 2-amino-1,2-difeniletanol) ali metilni ester, na fenilu pa vezan substituent klor. V našem primeru imamo vezano nitro skupino na fenilni obroč, ki je elektron privlačna skupina, kot so tudi halogenidi.

Pravega razloga za neuspešnost reakcije ne poznamo. Možni razlogi so lahko:  
1. izhodna spojina v literaturnem viru (46) (slika 19) ima vezan metilni ester (elektron privlačna skupina) v bližini OH skupine, kar povzroči povečano kislosti OH skupine in lahko olajša ciklizacijo, 2. v literarnih virih (47) in (48) (slika 20 in 21) pa sta izhodni

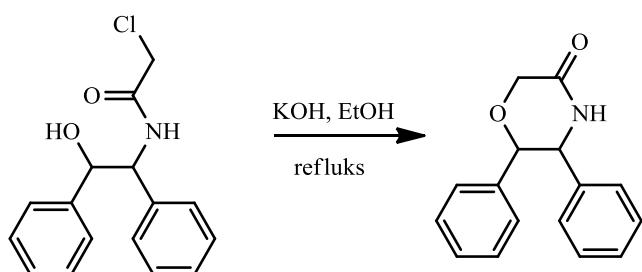
spojini bolj sterično ovirani kot v našem primeru, kar onemogoči povsem prosto vrtljivost funkcionalnih skupin in lahko povzroči njihovo približanje in tako olajša potek ciklizacije.



**Slika 19:** Primer ciklizacije v literaturnem viru (46). Ciklizacija je potekla pri dodatku NaH (2 ekv.), THF, pri 0 °C v 1 h s 75 % izkoristkom.



**Slika 20:** Primer ciklizacije v literaturnem viru (47). Ciklizacija je potekla pri dodatku NaH (2,2 ekv.), brezvodnem THF in reakcijskih pogojih (dušikova atmosfera, sobna temeperatura) v 3 h z 39 % izkoristkom.



**Slika 21:** Primer ciklizacije v literaturnem viru (48). Ciklizacija je potekla pri dodatku KOH (1,5 ekv.), EtOH, pri refluksu v 1,5 h s 97 % izkoristkom.

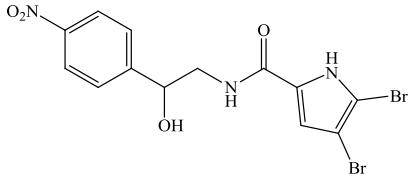
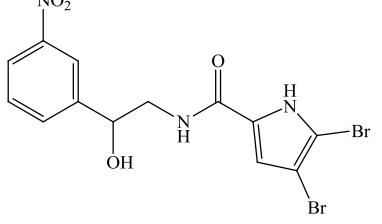
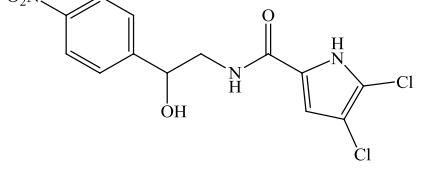
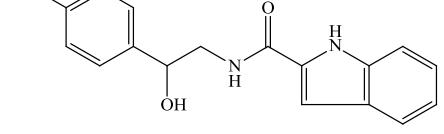
V literaturnih virih smo našli različne reagente in reakcijske pogoje. Največkrat sta uporabljeni topili THF ali etanol, kot bazo pa so uporabljali NaH ali KOH. Temperatura reakcije je variirala od 0 °C do refluksa, ob tem jim je uspelo izolirati produkt z 39 % do 97 % izkoristkom. (46, 47, 48)

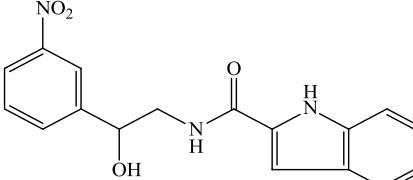
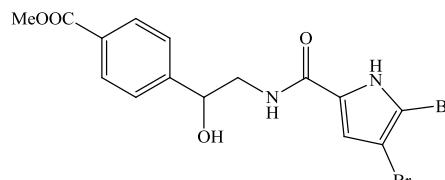
Glede na različne reakcijske pogoje v literaturi smo se odločili, da poskusimo oba reakcijska reagenta v pogojih, ki so se zdeli najbolj obetavni za ciklizacijo in zmanjšanje poteka stranskih reakcij. Zato smo v reakciji z NaH uporabili brezvodni THF pod argonovo atmosfero in dodali izhodno spojino šele po ohladitvi na 0 °C. Na manjši skali smo preskusili reakciji **14a** z NaH/THF ter **14b** s KOH/EtOH. <sup>1</sup>H NMR spekter se je zdel obetavnejši po reakciji **14a**, zato smo to reakcijo ponovili še z *m*-nitrofenil derivatom. Pri reakciji **15b** smo zamenjali topilo brezvodni THF za DMF, vendar niti to ni pomagalo k uspešnosti ciklizacije.

## 5.2 KOMENTAR BIOLOŠKIH TESTIRANJ

Sintetiziranim končnim spojinam so na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo s testiranjem določili zaviralno delovanje na girazno podenoto B *E. coli*. V preglednici II so prikazane strukture končnih spojin in rezultati bioloških testiranj. Rezidualna aktivnost (RA) je izražena v odstotkih in predstavlja razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti zaviralca in v njegovi odsotnosti. Rezidualna aktivnost je bila izmerjena pri dveh koncentracijah zaviralca, pri 100 µM in 10 µM. 100 % RA pomeni odsotnost inhibicije, 0 % pa popolno inhibicijo tarčnega encima.

**Preglednica II:** Seznam končnih spojin in rezultati bioloških testiranj.

Struktura in oznaka spojine		RA(%) pri 100 µM	RA(%) pri 10 µM
<b>3a</b>		<b>108,1</b>	<b>102,6</b>
<b>3b</b>		<b>109,7</b>	<b>101,5</b>
<b>3c</b>		<b>111,5</b>	<b>123,4</b>
<b>4a</b>		<b>107,4</b>	<b>117,9</b>

<b>4b</b>		<b>95,3</b>	<b>103,1</b>
<b>12</b>		<b>86,8</b>	<b>116,3</b>

Z rezultati bioloških testiranj smo ugotovili, da so sintetizirane končne spojine neaktivne pri zaviranju giraze B. Pri spojinah **4b** in **12** smo opazili manjše zmanjšanje RA pod 100 %, ki pa je v okviru eksperimentalne napake.

Večina načrtovanih sprememb izhodiščne spojine je bilo manjših (sprememba mesta vezave in samih hidrofobnih substituentov na pirolovem obroču, zamenjava tiazolnega obroča s fenilnim obročem). Največja načrtovana strukturna sprememba je bila zamenjava aminopiperidinskega distančnika za aminoetanolni fragment, zato ima najverjetneje ta zamenjava največji vpliv na neaktivnost spojin. Aminoetanolni fragment očitno ni dobra zamenjava za aminopiperidinski distančnik in ne obdrži aromatska obroča na primerni razdalji za vezavo pirolamida z Asp81 in nitro skupine oz. metil benzoata z Arg144 giraze B. Drugi možni razlog za neaktivnost je prevelika fleksibilnost končnih spojin. Omejitev fleksibilnosti spojine po vezavi v encim povzroči zmanjšanje konformacijske entropije in posledično zmanjšanje afinitete do tarčnega mesta. Z načrtovanjem bolj rigidnih spojin je izguba konformacijske entropije po vezavi dosti manjša in posledično je manjša tudi izguba afinitete.

## 6 SKLEP

V sklopu magistrske naloge smo načrtovali in sintetizirali šest potencialnih zaviralcev giraze B (spojine **3a**, **3b**, **3c**, **4a**, **4b** in **12**) in sintetizirane spojine ovrednotili z ustreznimi analiznimi metodami ( $^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR, MS, IR, HPLC) ter jih testirali na biološko aktivnost.

Pripravili smo učinkovito sintezno pot do derivatov *N*-(2-hidroksi-2-feniletil)-1*H*-pirol-2-karboksamida in *N*-(2-hidroksi-2-feniletil)-1*H*-indol-2-karboksamida. Potrebna bi bila še dodatna optimizacija postopkov do višjih izkoristkov in manjšega poteka stranskih reakcij, v smislu spremembe topila, reakcijskih pogojev in uporabe mikrovalovnega reaktorja. Zaradi omejenega časa v okviru magistrske naloge to žal ni bilo mogoče.

Po neuspešni redukciji nitro skupine spojin **4a** in **3b** (reakcija 13a in 13b) smo sintezno pot spremenili tako, da smo poskušali najprej reducirati aromatsko nitro skupino v amino skupino in šele nato tvoriti amidno vez. Odločitev se je izkazala za pravilno, saj je redukcija nitro skupine potekla pri reakciji **7** ob zaščitenem aminu v obliki *tert*-butil karbamata.

Pri reakciji **11** smo uspeli združiti v »one-pot« sintezo kar tri reakcije: aktivacijo karboksilne kisline z  $\text{SOCl}_2$  v kislinski klorid, zaščito karboksilne skupine s tvorbo metilnega estra iz kislinskega klorida in metanola ter odščito Boc zaščite amino skupine. Zadnja reakcija poteče zaradi nastajanja  $\text{HCl}$  pri prvih dveh reakcijah in tako povzroči acidolizo Boc zaščite. Z »one-pot« sintezo povečamo izkoristek in se izognemo dolgotrajnim postopkom ločevanja in čiščenja vmesnih produktov.

Končne spojine so se žal izkazale za neaktivne pri biološkem testiranju na zaviralno delovanje na girazo B *E. coli*. Vzrok za neaktivnost spojin je lahko v neustrezni zamenjavi aminopiperidinskega distančnika za aminoetanolni fragment, ki ne obdrži oba aromatska obroča na primerni razdalji za tvorbo potrebnih interakcij za uspešno inhibicijo giraze B. Drugi možni razlog je prevelika fleksibilnost končnih spojin, ki lahko vodi v zmanjšanje afinitete do tarčnega mesta.

Predlog za nadaljnje načrtovanje potencialnih zaviralcev giraze B pirolamidnega razreda je usmeritev v iskanje drugačnega in bolj rigidnega distančnika med aromatskima obročema, ki bi ju postavil v optimalno lego za vezavo v girazo B.

## 7 LITERATURA

1. Aminov RI. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front Microbiol.* 2010; 1(134): 1-7.
2. Kohanski MA, Dwyer DJ, Collins JJ. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat Rev Microbiol.* 2010; 8(6): 423-35.
3. Bbosa, G. , Mwebaza, N. , Odda, J. , Kyegombe, D. and Ntale, M. Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health.* 2014; 6: 410-25.
4. <http://www.drugbank.ca/drugs/db00626>, dostopano september 2015
5. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00951>, dostopano september 2015
6. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00803>, dostopano september 2015
7. <http://si.draagle.com/#!/greader/?file=http%3A%2F%2Fskrito.draagle.com%2Fmedia%2Fd%2Femea%2FWC500036049.pdf>, dostopano september 2015
8. Kumar A, Schweizer HP. Bacterial resistance to antibiotics: Active efflux and reduced uptake. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57(10): 1486-513.
9. De Flora S, Quaglia A, Bennicelli C, Vercelli M.. The epidemiological revolution of the 20th century. *FASEB J.* 2005; 19: 892-7.
10. Armstrong GL, Conn LA, Pinner RW. Trends in Infectious Disease Mortality in the United States During the 20th Century. *JAMA.* 1999; 281(1): 61-6.
11. Coates AR, Halls G, Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same?. *Br J Pharmacol.* 2011; 163(1): 184-94.
12. Butler MS, Blaskovich MA, Cooper MA. Antibiotics in the clinical pipeline in 2013. *J Antibiot (Tokyo).* 2013; 66(10): 571-91.
13. Conly J, Johnston B. Where are all the new antibiotics? The new antibiotic paradox. *Can J Infect Dis Med Microbiol.* 2005; 16(3): 159-60.
14. <http://blogs.fda.gov/fdavoice/index.php/tag/gain-act/>, dostopano avgust 2015
15. <http://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm320643.htm>, dostopano avgust 2015
16. Gerard D. Wright. Antibiotics: a new hope. *Chem Biol.* 2012; 19(1): 3-10.
17. Peter A. Lambert. Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57: 1471-85.

18. Gerard D. Wright. Bacterial resistance to antibiotics: enzymatic degradation and modification. *Adv Drug Deliv Rev.* 2005; 57(10): 1451-70.
19. James C. Wang. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2002; 3(6): 430-40.
20. Lodish H, Berk A, Zipursky SL, et al. Molecular Cell Biology. 4th edition. New York: W. H. Freeman; 2000. Section 12.3, The Role of Topoisomerases in DNA Replication. Dostopano <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21703/>
21. Pommier Y., Leo E., Zhang H., Marchand C. DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chem Biol.* 2010; 17(5): 421-33.
22. Tomašić T., Mašić LP. Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Curr Top Med Chem.* 2014; 14(1): 130-51.
23. Martin A. Lanz, Dagmar Klostermeier. Guiding strand passage: DNA-induced movement of the gyrase C-terminal domains defines an early step in the supercoiling cycle. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39(22): 9681–94.
24. Nöllmann M1, Stone MD, Bryant Z, Gore J, Crisona NJ, Hong SC, Mitelheiser S, Maxwell A, Bustamante C, Cozzarelli NR. Multiple modes of Escherichia coli DNA gyrase activity revealed by force and torque. *Nat Struct Mol Biol.* 2007; 14(4): 264-71.
25. Mayer C, Janin YL. Non-quinolone inhibitors of bacterial type IIA topoisomerases: a feat of bioisosterism. *Chem Rev.* 2014; 114(4): 2313-42.
26. Cheng G, Hao H, Dai M, Liu Z, Yuan Z. Antibacterial action of quinolones: from target to network. *Eur J Med Chem.* 2013; 66: 555-62.
27. Collin F1, Karkare S, Maxwell A. Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2011; 92(3): 479-97.
28. 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. *J Med Chem.* 2012; 55(14): 6413-26.
29. Basarab GS1, Manchester JI, Bist S, Boriack-Sjodin PA, 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. *J Med Chem.* 2013; 56(21): 8712-35.

30. Kale MG1, Raichurkar A, P SH, Waterson D, McKinney D, Manjunatha MR, Kranthi U, Koushik K, Jena Lk, Shinde V, Rudrapatna S, Barde S, Humnabadkar V, Madhavapeddi P, Basavarajappa H, Ghosh A, Ramya VK, Guptha S, Sharma S, Vachaspati P, Kumar KN, Giridhar J, Reddy J, Panduga V, Ganguly S, Ahuja V, Gaonkar S, Kumar CN, Ogg D, Tucker JA, Boriack-Sjodin PA, de Sousa SM, Sambandamurthy VK, Ghorpade SR. Thiazolopyridine ureas as novel antitubercular agents acting through inhibition of DNA Gyrase B. *J Med Chem.* 2013; 56(21): 8834-48.
31. Sherer BA1, Hull K, Green O, Basarab G, Hauck S, Hill P, Loch JT 3rd, Mullen G, Bist S, Bryant J, Boriack-Sjodin A, Read J, DeGrace N, Urias-Nickelsen M, Illingworth RN, Eakin AE. Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: optimization of antibacterial activity and efficacy. *Bioorg Med Chem Lett.* 2011; 21(24): 7416-20.
32. Basarab GS, Hill PJ, Garner CE, Hull K, Green O, Sherer BA, Dangel PB, Manchester JI, Bist S, Hauck S, Zhou F, Urias-Nickelsen M, Illingworth R, Alm R, Rooney M, Eakin AE. Optimization of pyrrolamide topoisomerase II inhibitors toward identification of an antibacterial clinical candidate (AZD5099). *J Med Chem.* 2014; 57(14): 6060-82.
33. <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=3TTZ>, dostopano september 2015
34. Kadam KS, Jadhav RD, Kandre S, Guha T, Reddy MM, Brahma MK, Deshmukh NJ, Dixit A, Doshi L, Srinivasan S, Devle J, Damre A, Nemmani KV, Gupte A, Sharma R. Evaluation of thiazole containing biaryl analogs as diacylglycerol acyltransferase 1 (DGAT1) inhibitors. *Eur J Med Chem.* 2013; 65: 337-47.
35. Blau L, Menegon RF, Trossini GH, Molino JV, Vital DG, Cicarelli RM, Passerini GD, Bosquesi PL, Chin CM. Design, synthesis and biological evaluation of new aryl thiosemicarbazone as antichagasic candidates. *Eur J Med Chem.* 2013; 67: 142-51.
36. Pankaj Gupta, Abdul Rouf, Bhahwal A. Shah, Debaraj Mukherjee, Subhash C. Taneja. Efficient Preparation of Biologically Important 1,2-Amino Alcohols. *Synthetic Communications.* 2013; 43: 505-19.
37. A. Balsamo, P. Crotti, A. Lapucci, B. Macchia, F. Macchia, M. Del Tacca, L. Mazzanti, R. Ceserani. Conformational effects on the activity of drugs. 7. Synthesis and pharmacological properties of 2-(p-nitrophenyl)-substituted morpholines. *J. Med. Chem.* 1979; 22(6): 738-41.
38. <https://chem-space.com/CSC010187374.html>, dostopano november 2015

39. <https://www.enaminestore.com/catalog/BBV-22269789>, dostopano november 2015
40. U. M. Teotino, L. Polo Friz, G. Steis and D. Della Bella. Synthesis and pharmacological properties of some derivatives of p-aminophenylethanolamine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 1963; 15: 26-33.
41. Nikola Blažević, D. Kolbah, Branka Belin, Vitomir Šunjić, Franjo Kajfež. Hexamethylenetetramine, A Versatile Reagent in Organic Synthesis. *Synthesis* 1979; 1979(3): 161-76.
42. Thomas N. Sorrell. Organic Chemistry. University Science Books, Sausalito, 2006: 612-4.
43. M. Anderluh, J. Mravljak, A. Perdih, M. Sova, S. Pečar: Farmacevtska kemija III, Vaje in seminarji, FFA, Ljubljana, 2010: 96-100.
44. Christian A.G.N. Montalbetti, Virginie Falque. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* 2005; 61: 10827-52.
45. Xuemei Tang, Guangxia Tang, Hang Wang, Lingfei Luo and Dacheng Yang. A convenient and highly efficient synthesis of one kind of peptide nucleic acid monomer *Bull. Chem. Soc. Ethiop.* 2012; 26(3): 415-20.
46. Thomas-Xavier Métro, Anne Cochi, Domingo Gomez Pardo, and Janine Cossy. Asymmetric Synthesis of an Antagonist of Neurokinin Receptors: SSR 241586. *J. Org. Chem.* 2011; 76(8): 2594-602.
47. Gonzalez-Lopez de Turiso F, Sun D, Rew Y, Bartberger MD, Beck HP, Canon J, Chen A, Chow D, Correll TL, Huang X, Julian LD, Kayser F, Lo MC, Long AM, McMinn D, Oliner JD, Osgood T, Powers JP, Saiki AY, Schneider S, Shaffer P, Xiao SH, Yakowec P, Yan X, Ye Q, Yu D, Zhao X, Zhou J, Medina JC, Olson SH. Rational design and binding mode duality of MDM2-p53 inhibitors. *J Med Chem.* 2013; 56(10): 4053-70.
48. Ravindra S. Jagtap, Navalkishore N. Joshi. An improved synthesis and resolution of cis- and trans-2,3-diphenyl morpholines. *Tetrahedron: Asymmetry*. 2011; 22(20–22): 1861-64.