

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO TRAMPUŽ

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015



UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO TRAMPUŽ

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA AMINOKISLINSKIH DERIVATOV
SUBSTITUIRANIH PIROLAMIDOV KOT ZAVIRALCEV
BAKTERIJSKE DNA GIRAZE B**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF AMINO ACID DERIVATIVES OF
SUBSTITUTED PYRROLEAMIDES AS INHIBITORS OF
BACTERIAL DNA GYRASE B**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

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

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Danijelu Kiklju, mag. farm. in somentorju asist. dr. Roku Frlanu, mag. farm. za vso strokovno pomoč in vodenje pri laboratorijskem delu in pisanju magistrske naloge.

Zahvaljujem se tudi svoji družini, puncu Sari in prijateljem za vso podporo tekom študija.

Izjava

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

Marko Trampuž

Diplomska komisija:

Predsednica: prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag. farm.

Mentor: prof. dr. Danijel Kikelj, mag. farm.

Somentor: asist. dr. Rok Frlan, mag. farm.

Članica: izr. prof. dr. Mojca Lunder, mag. farm.

Vsebina

| | |
|--|-----|
| Povzetek | III |
| Abstract..... | IV |
| Seznam okrajšav | V |
| 1. Uvod..... | 1 |
| 1.1. Bakterijska odpornost | 1 |
| 1.2. Bakterijske topoizomeraze..... | 2 |
| 1.3. Mehanizem katalitičnega delovanja DNA giraze | 3 |
| 1.4. Bakterijske topoizomeraze in selektivna toksičnost | 4 |
| 1.5. Zaviralci bakterijskih topoizomeraz | 5 |
| 1.6. Alkaloidi spužev rodu <i>Agelas</i> | 7 |
| 2. Načrt za delo..... | 9 |
| 3. Materiali in metode | 14 |
| 4. Eksperimentalno delo | 16 |
| 4.1. Sinteza heterocikličnih derivatov L-tirozina..... | 16 |
| 4.1.1 Sinteza gradnikov | 16 |
| 4.1.2 Sinteza končnih spojin..... | 17 |
| 4.2. Sinteza aminokislinskih derivatov 4,5-dibromopirola..... | 17 |
| 4.2.1 Sinteza gradnikov | 18 |
| 4.2.2 Sinteza končnih spojin..... | 18 |
| 4.2.3 Sintezni postopki in eksperimentalni podatki..... | 19 |
| 5. Rezultati bioloških testiranj..... | 46 |
| 6. Razprava..... | 49 |
| 6.1. Kemijski del..... | 49 |
| 6.1.1 Priprava substituiranih pirolnih gradnikov | 49 |
| 6.1.2 Tvorba amidne vezi med L-tirozinom in 3-aminobenzojsko kislino | 50 |
| 6.1.3 Odščita Boc zaščitne skupine | 52 |

| | | |
|-------|---|----|
| 6.1.4 | Tvorba amidne vezi s heterocikličnimi gradniki | 53 |
| 6.1.5 | Poskus sinteze aminopirolnih derivatov | 56 |
| 6.1.6 | Tvorba amidne vezi med 4,5-dibromopirolnim gradnikom in različnimi aminokislinami | 57 |
| 6.1.7 | Tvorbe amidne vezi z derivatoma benzojske kisline | 61 |
| 6.1.8 | Racemizacija in optična čistota | 63 |
| 6.2. | Biološki del | 64 |
| 6.2.1 | Heterociklični derivati L-tirozina | 64 |
| 6.2.2 | Aminokislinski derivati 4,5-dibromopirola | 65 |
| 6.2.3 | Odnos med strukturo in delovanjem | 67 |
| 7. | Sklep | 69 |
| 8. | Literatura | 71 |

Povzetek

Vse bolj razširjena odpornost patogenih bakterij na protibakterijske učinkovine, ki so v klinični rabi, predstavlja vedno večji javnozdravstveni problem. Eden izmed ključnih pristopov v boju proti rezistentnim bakterijam je razvoj novih protibakterijskih učinkovin, predvsem tistih z delovanjem na še neveljavljene molekulske tarče ali novim mehanizmom delovanja na že poznane tarče. Med že uveljavljene tarče protibakterijskih učinkovin spadata bakterijska encima DNA giraza in topoizomeraza IV, ki sodita v skupino topoizomera, encimov, ki katalizirajo spremembe v topologiji DNA.

Na osnovi podobnosti struktur ATP, nekaterih znanih ATP-kompetitivnih zaviralcev podenote B DNA giraze in oroidina, alkaloida iz spužev rodu *Agelas* s protibakterijskim delovanjem, smo načrtovali dve seriji spojin s potencialnim zaviralnim delovanjem na DNA girazo B in protibakterijskim delovanjem. V prvi seriji spojin smo pripravili 12 derivatov L-tirozina z različno substituiranimi pirolamidnimi fragmenti, med katerimi so nekateri izkazali encimsko zaviralno delovanje na DNA girazo B *E. coli* v nizkem mikromolarnem območju in protibakterijsko delovanje na *S. aureus*, *E. faecalis* ter seva *E. coli tolC* in *impA*.

Na osnovi teh rezultatov smo v drugi seriji pripravili nadaljnjih 20 končnih spojin, kjer smo iz prve serije obdržali 4,5-dibromopirolni fragment ter ga povezali z različnimi aromatskimi ter alifatskimi aminokislinami. S tem smo izboljšali encimsko zaviralno delovanje, saj je bila vrednost IC_{50} pri nekaterih spojinah celo v nanomolarnem območju. Ugotovili smo, da na aktivnost spojin vpliva tudi stereokemija aminokislinskega fragmenta.

Pripravljeni aminokislinski derivati substituiranih pirolamidov tako zaradi svojega zaviralnega delovanja na DNA girazo B in protibakterijskega delovanja predstavljajo zanimivo izhodišče za nadaljnjo strukturno optimizacijo z namenom izboljšanja njihovega delovanja.

Ključne besede: protibakterijska učinkovina, DNA giraza, encimski zaviralec, pirolamid, aminokislinski derivat

Abstract

Increased spread of pathogenic bacteria, resistant to clinically used antibacterial drugs, is becoming a major public health issue. One of the key approaches in the battle against bacterial resistance is the development of novel antibacterials, especially those that target previously unexplored molecular targets or new binding sites on known targets. Bacterial enzymes DNA gyrase and topoisomerase IV are among the most known targets of antibacterial drugs. They belong to the class of topoisomerases, enzymes that catalyze changes in DNA topology.

Based on similarities between the structures of ATP, several known ATP-competitive DNA gyrase B inhibitors and oroidin, a marine alkaloid from *Agelas* sponges with antibacterial activity, we designed two series of compounds with potential inhibitory activity on DNA gyrase B, as well as antibacterial activity. First series included 12 derivatives of L-tyrosine and differently substituted pyrroleamide fragments. Some of the compounds showed low micromolar inhibitory activity on *E. coli* DNA gyrase B, as well as antibacterial activity on *S. aureus*, *E. faecalis* and *E. coli* strains *tolC* and *impA*.

Based on these results, we prepared another series of 20 final compounds that contained 4,5-dibromopyrrole moiety, coupled with various aromatic and aliphatic amino acids. Compounds from the second series showed even better inhibition of enzymatic activity, since IC_{50} values of some of the compounds were already in the nanomolar range. The stereochemistry of the amino acid fragment played an important role in the activity of the compounds.

Due to their inhibitory activity on DNA gyrase B and antibacterial action, the prepared amino acid derivatives of substituted pyrroleamides present an interesting starting point for further structural optimization of the compounds with the aim of improving their activity.

Key words: antibacterial compound, DNA gyrase, enzyme inhibitor, pyrroleamide, amino acid derivative

Seznam okrajšav

Ac₂O – acetanhidrid

AcOH – očetna kislina

ADP – adenzin 5'-difosfat

ADPNP – 5'-adenilil-β, λ-imidotrifosfat

ATP – adenzin 5'-trifosfat

ATR – oslajljena popolna odbojnost (attenuated total reflectance)

Boc – *terc*-butiloksikarbonil

Boc₂O – di-*terc*-butil karbonat

DCC – *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid

DIPEA – *N,N*-diizopropiletilamin

DMF – dimetilformamid

DMSO – dimetilsulfoksid

DKM – diklorometan

DNA – deoksiribonukleinska kislina (deoxyribonucleic acid)

EDC – 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid

ESI – elektrosprej ionizacija (electrospray ionization)

Et₃N – trietilamin

Et₂O – dietil eter

EtOAc – etilacetat

EtOH – etanol

HATU – 1-(bis(dimetilamino)metilen)-1*H*-1,2,3-triazolo(4,5-*b*)piridinijev-3-oksid heksafluorofosfat

HOBt – benzotriazol-1-ol

HPLC – tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (high performance liquid chromatography)

HRMS – masna spektrometrija visoke ločljivosti (high resolution mass spectrometry)

HTS – rešetanje visoke zmogljivosti (high throughput screening)

IC₅₀ – zaviralna koncentracija, kjer aktivnost pade za 50 % (inhibitory concentration)

IR – infrardeča spektroskopija

MeCN – acetonitril

MeOH – metanol

MIC – minimalna zaviralna koncentracija (minimal inhibitory concentration)

MIC₉₀ – minimalna zaviralna koncentracija, kjer rast bakterij pade za 90 %

MRSA – na meticilin odporni *Staphylococcus aureus* (methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*)

MS – masna spektrometrija

NMM – *N*-metilmorfolin

NMR – jedrska magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance)

Pi – fosfat

SAR – odnos med strukturo in delovanjem (structure-activity relationship)

SPR – površinska plazmonska resonanca (surface plasmon resonance)

TBTU – *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(benzotriazol-1-il)uronijev tetrafluoroborat

TFA – trifluoroocetna kislina (trifluoroacetic acid)

TLC – tankoplastna kromatografija (thin-layer chromatography)

THF – tetrahidrofuran

UV-VIS – ultravijolično-vidna spektroskopija (ultraviolet-visible spectroscopy)

1. Uvod

1.1. Bakterijska odpornost

Protibakterijske učinkovine že vse od svoje uvedbe v klinično prakso v 40. letih 20. stoletja veljajo za eno najpomembnejših odkritij v moderni medicini. Njihova uporaba je močno zmanjšala smrtnost zaradi življenjsko ogrožajočih bakterijskih okužb, podaljšala življenjsko dobo ljudi in olajšala invazivne posege, kot so operacije [1][2]. Velika uspešnost uporabe protimikrobnih učinkovin je v 50. letih prejšnjega stoletja celo vodila k mišljenju, da nalezljive bolezni ne predstavljajo več resnega problema v medicini in človeškem življenju nasploh [3].

Protibakterijske učinkovine že ves čas neizogibno spremlja pojav odpornosti bakterij na njihovo delovanje. Ta težava v prvih desetletjih uporabe zaradi nenehnega razvoja novih protibakterijskih učinkovin ni prišla tako močno do izraza [4]. V zadnjih dveh desetletjih pa se je razširjenost patogenih bakterij, odpornih na protibakterijske učinkovine, pojavila po vsem svetu, kar vodi v neučinkovitost obstoječih terapij proti bakterijskim okužbam [5]. Najbolj zaskrbljujoči so podatki o odpornosti stafilokokov, saj so nekateri sevi *Staphylococcus aureus*, ki spadajo med najpogostejše povzročitelje bolnišničnih okužb, odporni že na praktično vse protibakterijske učinkovine, ki so na razpolago. Visoka stopnja multirezistence (odpornosti na več različnih protibakterijskih učinkovin) je prisotna tudi pri enterokokih, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* in *Haemophilus influenzae* in *Mycobacterium tuberculosis* [2]. Vse to zaradi vedno večje obolevnosti in umrljivosti ljudi predstavlja veliko breme zdravstvenemu sistemu in bakterijska odpornost danes velja za eno največjih groženj javnemu zdravju [1][6].

Odpornost bakterij na spojine, ki so za njih toksične, je zaradi evolucije prisotna v naravi že milijone let. Določeni geni, ki kodirajo nekatere efluksne črpalke, so prisotni v genomu večine bakterij, kar nakazuje na njihov zgodnji izvor [4][7]. K povečanemu razvoju in širjenju odpornosti bakterij pa v največji meri prispeva prav pretirana uporaba protibakterijskih učinkovin v humani in veterinarski medicini ter tudi neprimerna uporaba v živilski industriji. Pomembno vlogo igra tudi njihovo neustrezno odstranjevanje, saj se le-te kopičijo v različnih vodnih in kopenskih ekosistemih [2][5][8]. Vse to vrši na bakterije močan selekcijski pritisk, ki omogoča preživetje le odpornim sevom [9]. Pri tem se je pomembno zavedati dejstva, da se odpornost lahko razvije tudi pri mnogo nižjih koncentracijah učinkovine, kot je potrebna za njeno protibakterijsko delovanje [8].

Podrobno razumevanje mehanizmov bakterijske odpornosti je ključno za ustrezno klinično uporabo obstoječih in načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin [2]. Poznamo dve vrsti odpornosti bakterij na protibakterijske učinkovine – intrinzično (prirojeno) ter pridobljeno odpornost. Intrinzična odpornost je povezana s strukturnimi in funkcionalnimi lastnostmi, ki so značilne za posamezno vrsto bakterije, kot je npr. odsotnost tarče protibakterijske učinkovine, spremenjena prepustnost celične membrane za posamezno učinkovino itd. Bakterije lahko pridobijo odpornost bodisi z genskimi mutacijami bodisi s horizontalnim prenosom genov (predvsem s konjugacijo). Mehanizme pridobljene odpornosti lahko razdelimo na tri skupine – zmanjšanje znotrajcelične koncentracije protibakterijske učinkovine (preko oteženega prehajanja v celico oz. aktivnega črpanja iz celice), sprememba tarče in encimska modifikacija učinkovine [1][2].

Razvoj odpornosti bakterij je neposredno povezan z uporabo protibakterijskih učinkovin, zato je za njeno zmanjšanje prvi pristop zmanjšanje uporabe le-teh z racionalnim predpisovanjem protibakterijskih zdravil v terapevtske namene ter opustitvijo njihove uporabe v ostale namene [3][5][7][8]. Ker pa so bakterije zaradi svoje odlične prilagodljivosti okolju sposobne razviti odpornost na različne načine, je drugi, prav tako zelo pomemben pristop, nenehen razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Večina razredov danes uporabljenih protibakterijskih učinkovin so namreč razvili v obdobju med 1930 in 1960, pri čemer so v zadnjih 30 letih odkrili le dva nova razreda sistemsko uporabnih učinkovin (linezolid in daptomicin). Veliko težavo zaradi prisotne zunanje celične membrane in posledično otežene permeabilnosti predstavljajo predvsem po Gramu negativne bakterije, med katerimi jih je veliko odpornih na številne učinkovine, ki so trenutno na voljo za terapevtsko uporabo. Razvoj novih potencialnih protibakterijskih učinkovin, predvsem tistih, ki ciljajo nove tarče v bakterijski celici oz. izkazujejo nov mehanizem delovanja na že ciljane tarče, je zato ključnega pomena v nadaljnjem boju z bakterijami [5].

1.2. Bakterijske topoizomeraze

Med najbolj uveljavljene tarče protibakterijskih učinkovin spadajo bakterijske topoizomeraze. To so encimi, ki katalizirajo spremembe v topologiji DNA in so zato ključnega pomena za preživetje bakterij [10][11]. Delimo jih na dve večji skupini, topoizomeraze tipa I in topoizomeraze tipa II, med katerima je ključna razlika v tem, ali pri svojem delovanju cepijo le eno ali obe verigi DNA. Najpomembnejša predstavnika topoizomeraz tipa II sta pri bakterijah DNA giraza in topoizomeraza IV, od ATP odvisna encima, ki sta udeležena

pri podvajanju, popravljanju in dekatenciji molekul DNA. Zaradi svoje pomembne fiziološke vloge ter možnosti razvoja učinkovin, ki ciljajo oba encima hkrati, kar zmanjša možnost razvoja odpornosti, sta zato zelo zanimivi tarči za razvoj novih protibakterijskih učinkovin [11].

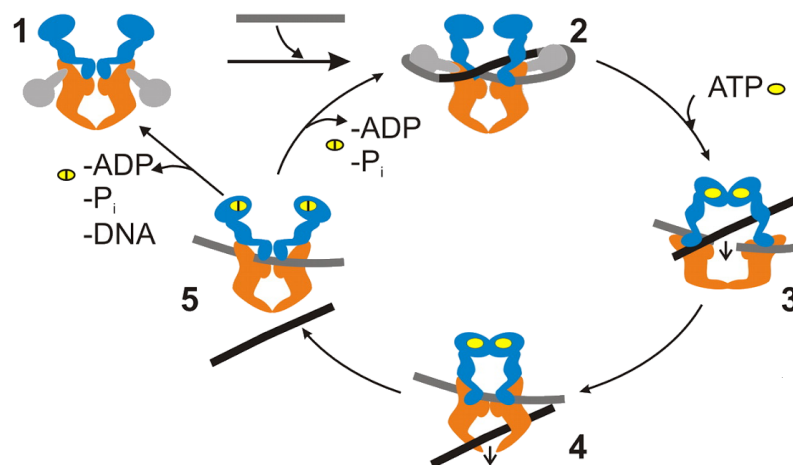
Čeprav sta si DNA giraza in topoizomeraza IV zelo sorodna encima, je njuna vloga v bakterijskih celicah nekoliko drugačna [11]. DNA giraza je edina poznana topoizomeraza, ki preko sproščene energije pri hidrolizi ATP katalizira uvedbo negativnih dodatnih zavojev (»supercoils«) v krožno molekulo DNA [12][13]. Le-to igra ključno vlogo pri sprostitvi torzijske napetosti, ki se pojavi pri podvojevanju DNA zaradi tvorbe pozitivnih dodatnih zavojev pred podvojevalnimi vilicami [11][14]. Od evkariontskih in bakteriofagnih topoizomeraz tipa II pa se DNA giraza razlikuje tudi po tem, da lahko katalizira relaksacijo negativnih dodatnih zavojev tudi ob odsotnosti ATP, medtem ko so ostale topoizomeraze tipa II pri tem odvisne izključno od energije, ki se sprosti pri hidrolizi ATP [13]. Vloga topoizomeraze IV pa je relaksacija dodatne zvitosti DNA in dekatencija hčerinskih verig DNA po podvojevanju [11].

Tako DNA giraza kot topoizomeraza IV sta tetramerna encima, sestavljena iz dveh parov podenot, ki se pri DNA girazi imenujeta GyrA in GyrB (ParC in ParE pri topoizomerazi IV). Funkcionalna oblika encima je tako kompleks A_2B_2 (C_2E_2 pri topoizomerazi IV). Podenota GyrA (ParC) je pomembna pri vezavi DNA, podenota GyrB (ParE) pa pri vezavi in hidrolizi ATP, s čimer se zagotavlja energija za ustrezno encimsko aktivnost. Kristalna struktura celotnega tetramera še ni bila določena za nobenega izmed obeh encimov, poznane pa so številne strukture fragmentov posameznih podenot, tudi v kompleksu z DNA, ADPNP in različnimi inhibitorji, kar omogoča strukturno podprto načrtovanje novih zaviralcev obeh encimov [11].

1.3. Mehanizem katalitičnega delovanja DNA giraze

Sodeč po predpostavljenem katalitičnem mehanizmu delovanja DNA giraze poteka uvedba negativnih dodatnih zavojev v molekulo DNA v več korakih (slika 1). DNA giraza se veže na krajši segment molekule DNA in cepi dvojno vijačnico DNA. Ključno vlogo pri tem igra A podenoti, saj se njuna aminokislinska ostanka Tyr¹²² vežeta na 5'-konec vsake verige DNA. S tem se ustvari t.i. G (»gate«) segment molekule DNA. Sosednja dvojna vijačnica, poimenovana T (transportni) segment, se najprej premakne skozi t.i. N-vrata, ki jih tvorita oba N-terminalna konca B podenot encima. Vezava ATP na GyrB povzroči, da

se N-vrata zaprejo in tako ujamejo T segment. V naslednjem koraku se odprejo DNA-vrata, ki jih tvorita GyrA, kar omogoči, da se T segment premakne skozi G segment. V zadnjem koraku se nato zaprejo DNA-vrata, s čimer se ponovno združi tudi G segment DNA. T segment zapusti aktivno mesto encima skozi t.i. C-vrata, ki jih tvorijo aminokislinski preostanki na C-terminalnih koncih GyrA, hidroliza ATP pa povzroči, da se ponovno odprejo tudi N-vrata, kar omogoči izstop tudi ponovno združeni dvojni vijačnici [10][11][13][15].



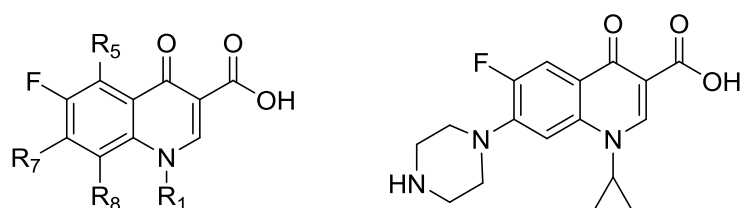
Slika 1: Mehanizem delovanja DNA giraze. Tetramerni encim je predstavljen z oranžno (GyrA) oz. modro (GyrB), G segment DNA s sivo barvo, T segment DNA pa s črno barvo. Povzeto po [16].

1.4. Bakterijske topoizomeraze in selektivna toksičnost

Topoizomeraze tipa II so prisotne tudi pri ljudeh, zato je pri načrtovanju novih protibakterijskih učinkovin potrebno dobro poznati tudi razlike med človeškimi in bakterijskimi encimi, saj le tako dosežemo ustrezno selektivno toksičnost. Dodatno težavo predstavlja tudi dejstvo, da so topoizomeraze od ATP odvisni encimi, zato bi morebitni zaviralci, ki bi se vezali v vezavno mesto za ATP, potencialno lahko izkazovali afiniteto tudi do vezavnih mest za ATP na različnih človeških encimih (npr. na protein kinazah). Za strukturno najbolj podobne človeške encime DNA girazi *E. coli* so se v *in silico* primerjalni študiji poleg topoizomeraze IV *E. coli* ter DNA topoizomeraz tipa II nekaterih drugih bakterij izkazale DNA topoizomeraza II ter piruvat dehidrogenaza kinaza, pri čemer ključna podobnost leži prav v ATP vezavnem mestu. To dejstvo je pri načrtovanju novih zaviralcev bakterijskih topoizomeraz tipa II vsekakor potrebno upoštevati [11][17].

1.5. Zaviralci bakterijskih topoizomeraz

Danes je poznanih veliko zaviralcev bakterijskih topoizomeraz tipa II, ki so selektivnejši bodisi za DNA girazo bodisi za topoizomerazo IV, kar je odvisno od njihove kemijske strukture in vrste bakterije. Edina skupina učinkovin med njimi, ki je danes v klinični uporabi, so fluorokinoloni (slika 2). Odkriti so bili v 60. letih prejšnjega stoletja in do danes je bilo sintetiziranih že preko 5000 različnih predstavnikov, ki se razlikujejo v spektru protibakterijskega delovanja, farmakodinamiki in farmakokinetiki. Njihov mehanizem delovanja temelji na stabilizaciji kompleksa G segmenta DNA in DNA giraze A (oz. ParC pri topoizomerazi IV), kar poleg zaustavitve podvojevanja DNA preko kaskade biokemijskih procesov povzroči tudi poškodbe DNA, oksidativni stres in celično smrt. Njihov spekter delovanja je širok, saj delujejo tako na po Gramu negativne in po Gramu pozitivne bakterije, kot tudi na *M. tuberculosis* itd. Velik problem pri fluorokinolonih pa predstavlja bakterijska odpornost, ki je še posebej izrazita pri *S. aureus* in *P. aeruginosa* [2][11][12].

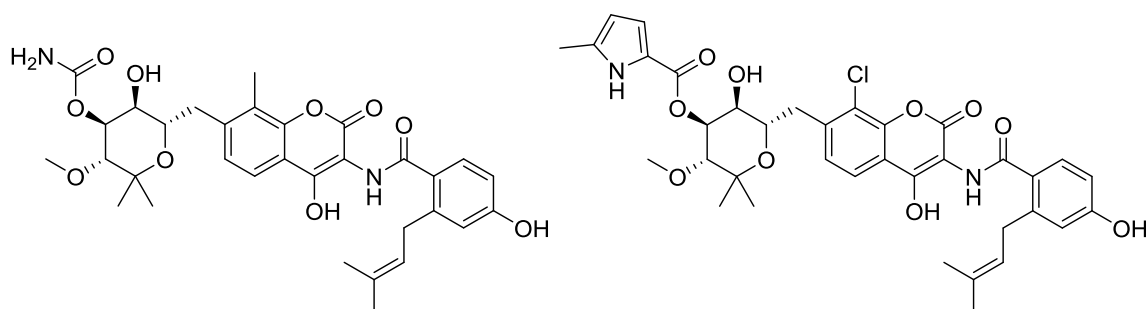


Slika 2: Splošna struktura fluorokinolonov (levo) in struktura ciprofloksacina (desno), enega najpogosteje uporabljanih fluorokinolonov.

Med ostale skupine učinkovin, ki izkazujejo svoje protibakterijsko delovanje z vezavo na GyrA (oz. ParC) spadajo še izotiazolokinoloni, 3-aminokinazolindioni, piperidini, 4-aminopiperidini, cikloheksilamini itd. Ker so v zadnjem času določili številne kristalne strukture v kompleksu z različnimi zaviralci, lahko pričakujemo, da se bo njihovo število še povečevalo [11].

Znanih je tudi precejšnje število zaviralcev GyrB (oz. ParE), ki delujejo kot ATP kompetitivni zaviralci [11]. Kljub začetnim pomislekom o smiselnosti tovrstnega pristopa zaradi prisotnosti vezavnih mest za ATP na številnih ostalih proteinih in visoke koncentracije ATP v bakterijskih celicah, je znanih veliko uspešnih primerov, kjer so lahko, z upoštevanjem poznavanja vezavnega mesta in sosednjih hidrofobnih žepov ter konformacije encima, načrtovali selektivne ATP-kompetitivne encimske zaviralce [17]. Prve znane spojine, ki svoje protibakterijsko delovanje izkazujejo s kompetitivno inhibicijo DNA giraze B, so bili

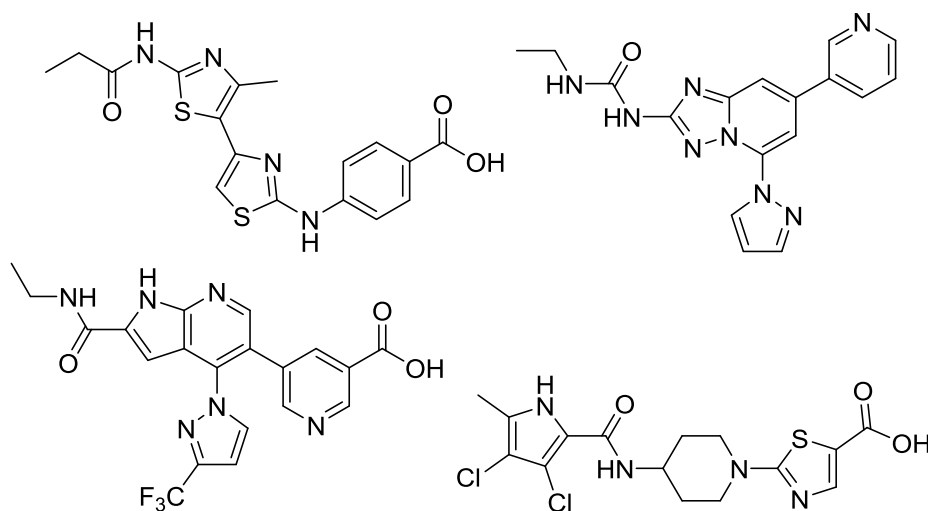
kumarinski antibiotiki novobiocin, klorobiocin in kumermicin A₁, izolirani iz vrst *Streptomyces* (slika 3). Njihova vezava na GyrB se delno prekriva z vezavnim mestom za ATP in tako prepreči njegovo vezavo in posledično encimsko aktivnost. Poleg zelo dobre encimske inhibicije izkazujejo tudi močno protibakterijsko delovanje na po Gramu pozitivnih bakterijah in novobiocin se je krajši čas celo uporabljal za zdravljenje okužb z MRSA. Zaradi slabega delovanja na po Gramu negativne bakterije, pojava rezistence in toksičnosti danes ni več v uporabi, vendar se še danes načrtujejo in sintetizirajo kumarinski analogi z izboljšanimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi in biološko aktivnostjo [11][15][17].



Slika 3: Strukturi novobiocina (levo) in klorobiocina (desno).

V zadnjem obdobju se je zaradi dostopnosti kristalnih struktur DNA giraze B (oz. ParE) v kompleksu z ADPNP oz. različnimi inhibitorji pristop načrtovanja ATP kompetitivnih zaviralcev usmeril predvsem v strukturno podprto virtualno reševanje (VS). Tovrstnega pristopa se poslužujejo tako v akademski sferi (primer bitiazolnih zaviralcev DNA giraze B (slika 4)) kot tudi nekatera farmacevtska podjetja, npr. Vertex (benzimidazolesečninski in pirazolotiazolni zaviralci GyrB), Evotec Ltd. (imidazolopiridinski in triazolopiridinski dualni zaviralci GyrB in ParE (slika 4)) in Pfizer (imidazolopiridinski dualni zaviralci GyrB in ParE) [11].

Nekatera druga farmacevtska podjetja pa se poslužujejo drugačnega pristopa – načrtovanja novih zaviralcev na osnovi posameznih fragmentov (FBDD), katerega prednost je v tem, da je z njim možno prereševati večji del kemijskega prostora. Tudi ta pristop je vodil k nekaterim obetavnim rezultatom, kot so fenolni zaviralci GyrB (Hoffmann-La Roche), azaindolni in pirolamidni dualni zaviralci GyrB in ParE (AstraZeneca (slika 4)) in pirolpirimidinski dualni zaviralci GyrB in ParE (Trius) [11].



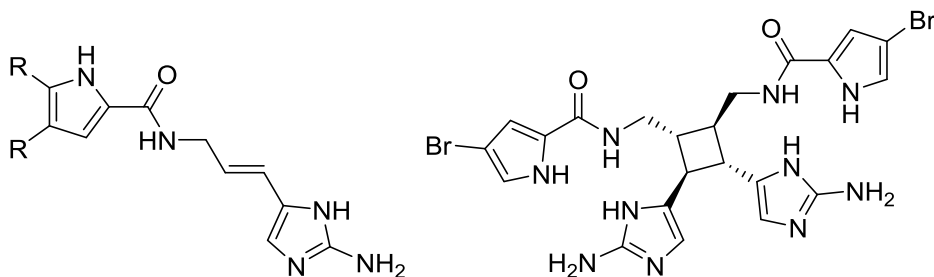
Slika 4: Strukture bitiazolnega zaviralca GyrB (levo zgoraj), triazolopiridinskega dualnega zaviralca GyrB in ParE (desno zgoraj), azaindolnega dualnega zaviralca GyrB in ParE (levo spodaj) in pirolamidnega dualnega zaviralca GyrB in ParE (levo spodaj).

1.6. Alkaloidi spužev rodu *Agelas*

Mnoge protibakterijske učinkovine so odkrili z empiričnim rešetanjem različnih naravnih spojin in več kot dve tretjini protibakterijskih učinkovin, ki jih uporabljamo dandanes, je naravnega oz. polysinteznega izvora [17]. Izjemno velik nabor spojin s protibakterijskim delovanjem lahko najdemo pri morskih organizmih, predvsem pri spužvah, saj so iz njih izolirali že preko 800 takšnih spojin [18][19]. Strukturno gre za zelo raznolike spojine, saj med drugim vključujejo terpenoide, alkaloidne, peptide, lektine, purinske derivate in makrolide. Čeprav na tržišču še ni protibakterijske učinkovine, ki bi izhajala iz morskega organizma, pa potekajo na tem področju intenzivne raziskave, nekatere spojine pa že preizkušajo v kliničnih študijah [19].

Med zanimivejše predstavnike morskih alkaloidov iz spužev uvrščamo pirol-imidazolne alkaloidne, ki jih najdemo predvsem pri rodu spužev *Agelas*, proizvajajo pa jih tudi spužve nekaterih drugih rodov. Med njimi najdemo tako preproste akiralne alkaloidne, kot sta klatrodin in oroidin (slika 6), kot tudi kompleksne alkaloidne s kar 16 stereogenimi centri (npr. stilasidin A in B). Biološka aktivnost teh alkaloidov je zelo pestra, pri čemer je veliko pozornosti namenjene njihovi protimikrobni aktivnosti, saj je znano, da izkazujejo protibakterijsko, protivirusno in protiglivično delovanje, zavirajo pa tudi rast bakterijskih biofilmov. Med alkaloidne, ki izkazujejo protibakterijsko delovanje, spadata med drugim tudi

oroidin in kompleksnejši sceptrin (slika 6), medtem ko klatrodin protibakterijskega delovanja ne izkazuje. To nakazuje na dejstvo, da je za protibakterijsko delovanje pomembna prisotnost lipofilnih substituentov na pirolnem obroču. Mehanizem delovanja teh spojin še ni poznan [18][20].



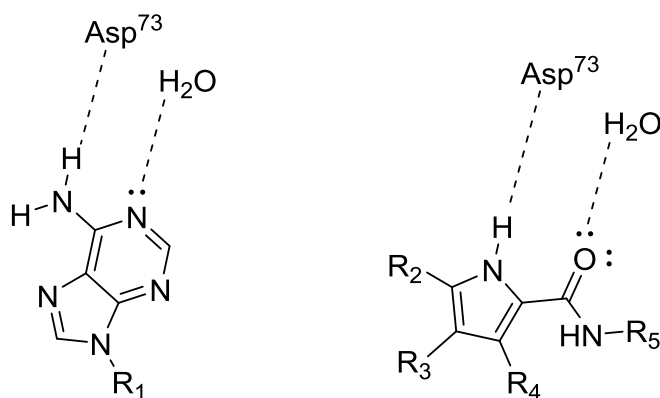
Slika 5: Strukture morskih alkaloidov oroidina ($R = \text{Br}$) in klatrodina ($R = \text{H}$) (levo) in sceptrina (desno).

Pripravljenih je bilo že veliko analogov oroidina z izboljšanim zaviralnim delovanjem na tvorbo bakterijskih biofilmov. Zaradi svoje enostavne strukture, nizke molekulske mase in znanega protibakterijskega delovanja je oroidin zelo primeren kandidat za nadaljnjo strukturno optimizacijo [18][20].

2. Načrt za delo

Cilj magistrskega dela je priprava derivatov oroidina z inhibitornim delovanjem na bakterijsko DNA girazo B in protibakterijsko aktivnostjo.

Osnova za načrtovanje naših spojin je znano protibakterijsko delovanje oroidina in nekaterih njegovih analogov, za katere pa mehanizem delovanja še ni poznan, po drugi strani pa smo po pregledu literature opazili kar nekaj znanih zaviralcev DNA giraze B, ki se vežejo v ATP vezavno mesto in vsebujejo v svoji strukturi različno substituiran pirolamidni fragment [18][21][22]. Za slednjega je znano, da pri vezavi v vezavno mesto encima zaradi prisotnosti donorja in akceptorja vodikove vezi na ustrezni medsebojni razdalji dobro posnema adeninski fragment v ATP (Slika 6) [23].

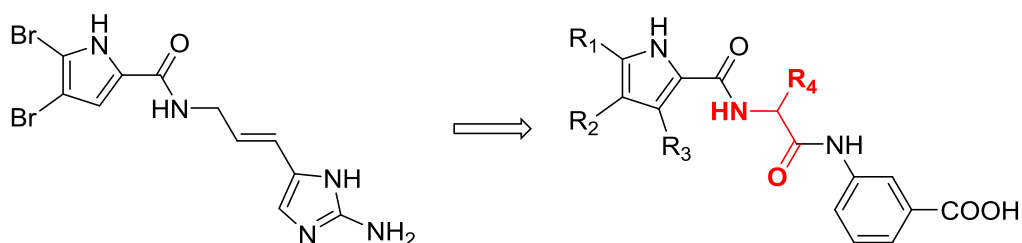


Slika 6: Primerjava vezave adenina in pirolamida v vezavno mesto *E. coli* DNA giraze B. Donor vodikove vezi tvori interakcijo z Asp⁷³, akceptor vodikove vezi pa z molekulo vode, ki je umeščena med Asp⁷³ in Thr¹⁶⁵. Prirejeno po [11][23] [24].

Pri načrtovanju spojin smo se zato odločili, da bomo posnemali pirolamidni fragment oroidina, ki ga bomo substituirali na mestih 3, 4 in 5 z različnimi substituenti. Po primerjavi zaviralnih aktivnosti DNA giraze B vseh sintetiziranih spojin bomo nato določili najprimernejši fragment za nadaljnjo optimizacijo spojin (slika 7).

Pri številnih znanih inhibitorjih DNA giraze B smo opazili, da vsebujejo poleg omenjenega motiva donor-akceptor vodikove vezi tudi derivat benzojske kisline oz. njeno bioizosterno zamenjavo, kot sta benzamid in oksa-3,4-diazolin-2-on, ki interagira preko tvorbe vodikove vezi in/ali pi-kation interakcije z Arg¹³⁶ [11][21][22][23][25]. Zato, da bomo dosegli čim ugodnejše interakcije naših spojin tudi v tem delu vezavnega mesta, smo se odločili, da bomo šibko bazičen 2-aminoimidazolni fragment oroidina zamenjali z derivatom benzojske kisline (slika 7).

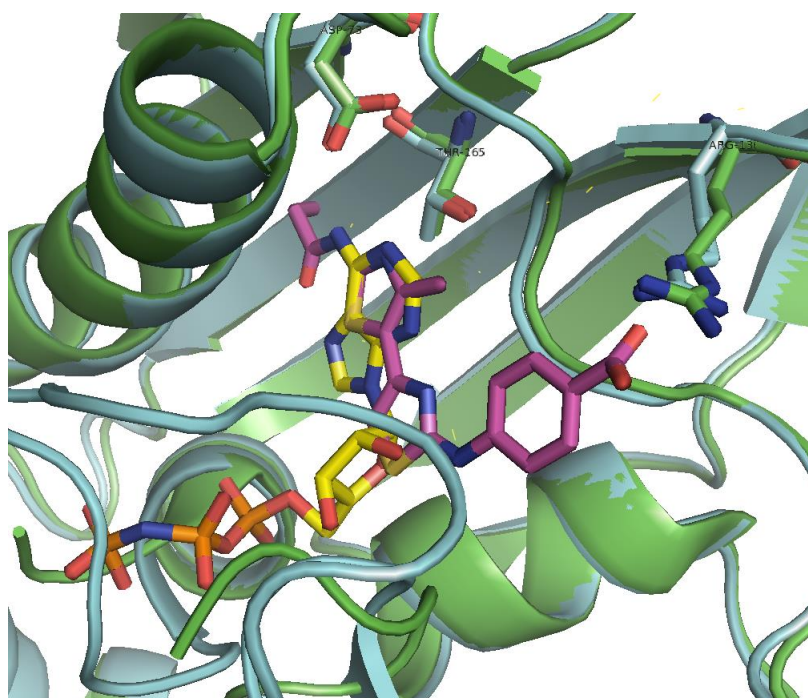
Ker je dvojna vez v molekuli oroidina labilna in podvržena oksidativni ciklizaciji, smo se odločili, da jo bomo zamenjali s stabilnejšo funkcionalno skupino, ki jo bo hkrati tudi enostavneje sintetizirati [26]. Odločili smo se za amidno skupino, saj nam ta poleg omenjenih prednosti omogoča tudi tvorbo dodatnih interakcij z aminokislinskimi ostanki encima zaradi prisotnosti tako donorja kot akceptorja vodikove vezi (slika 7). Dodatna prednost tega pristopa je tudi v tem, da so naše spojine po opisani zamenjavi postale derivati glicina. Ker so aminokisliline poceni in lahko dostopne, njihove kemijske pretvorbe pa dobro poznane, si bomo s tem po eni strani zelo olajšali pripravo končnih spojin, po drugi strani pa si bomo zaradi dostopnosti različnih naravnih in nenaravnih aminokislin tudi odprli možnost uvedbe dodatnih substituentov za izboljšanje interakcij z encimom.



Slika 7: Modifikacije strukture oroidina, s katerimi smo nameravali doseči zaviralno aktivnost na DNA girazo B. Z rdečo barvo je označen aminokislinski fragment.

Po natančnem pregledu kristalnih struktur vezave ADPNP (PDB: 1EI1) in različnih zaviralcev giraze B, kot sta klorobiocin (PDB: 1KZN) in prej omenjeni bitiazolni zaviralec (PDB: 4DUH), smo opazili, da se vezava zaviralcev v vezavno mesto nekoliko razlikuje od vezave ADPNP (Slika 8). Oba zaviralca se vežeta v adeninskem žepu podobno kot ADPNP preko dveh vodikovih vezi, nato pa se s preostalim delom molekule vežeta v žep, ki je obrnjen proti zunanosti vezavnega mesta (kjer se nahaja tudi Arg¹³⁶), medtem ko se trifosfatna veriga (oz. njen nehidrolizirajoči aza analog) pri nativnem ligandu veže v sosednji žep, ki je obrnjen bolj proti notranjosti encima. Zaradi te ugotovitve smo se odločili, da bomo z uvedbo različnih aminokislin na osrednjem delu molekule poskusili doseči, da bi se ta fragment vezal v fosfatni žep. Predpostavili smo, da bomo tako lahko dosegli veliko boljšo zaviralno aktivnost končnih spojin, kot pa če bi za osrednji fragment uporabili kar glicin. Ker je fosfatni žep precej velik, smo se odločili, da bomo za začetek izbrali za osrednji fragment aminokislino tirozin, ki je precej voluminozna, obenem pa smo sklepali, da bo zaradi prisotne fenolne OH skupine možnost tvorbe različnih interakcij z aminokis-

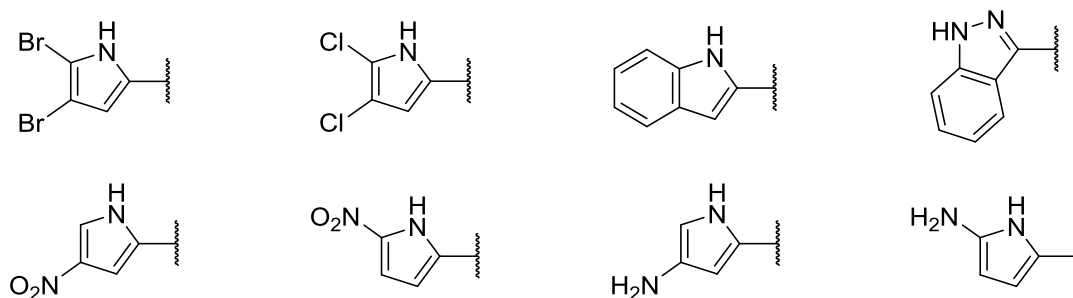
linskimi ostanki v tem delu vezavnega mesta toliko večja. Ker so aminokislina kiralne molekule, nam bo to dopuščalo tudi možnost, da z izbiro bodisi L- bodisi D-aminokislin kot osnovnih gradnikov ovrednotimo tudi pomen ustrezne prostorske razporeditve posameznih spojin. Po pregledu preliminarnih rezultatov molekulskega sidranja v aktivno mesto encima in po primerjavi vezave ADPNP in omenjenega bitiazolnega zaviralca smo predpostavili, da bo ugodnejša prostorska razporeditev v primeru uporabe L-tirozina. Nameravamo pa pripraviti tudi derivate D-tirozina, da bi to preverili tudi v praksi. Na osnovi danih rezultatov bomo nato namesto tirozina preizkusili tudi nekatere druge strukturno različne aminokislinae.



Slika 8: Primerjava vezave ADPNP (PDB: 1EI1) in bitiazolnega zaviralca (PDB: 4DUH) v vezavno mesto *E. coli* DNA giraze B. Ogljikov skelet ADPNP je obarvan rumeno, ogljikov skelet zaviralca pa vijolično. Označeni so tudi aminokislinski ostanki Asp⁷³, Arg¹³⁶ in Thr¹⁶⁵.

Odločili smo se, da bomo sintezo spojin, ki jih nameravamo pripraviti tekom magistrskega dela, razdelili na dva dela. Prvo serijo spojin bomo pripravili z namenom, da bi določili najprimernejši fragment za vezavo v adeninski žep. Pri tem bomo izhajali iz 4,5-dibromopirrolnega fragmenta, ki je prisoten pri oroidinu, obenem pa uporabili L-tirozin in 3-aminobenzojsko kislino kot preostala fragmenta. Da bi čim bolj optimalno zapolnili

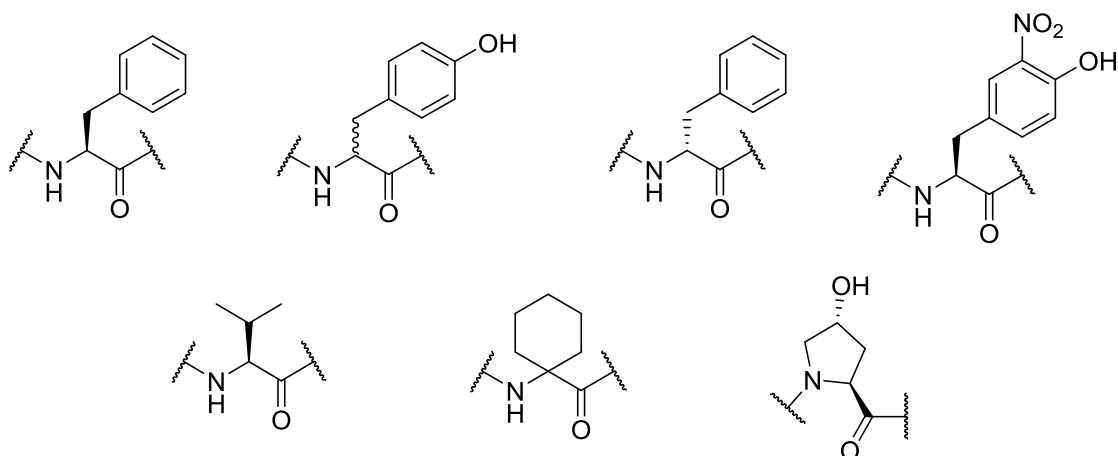
vezavno mesto, bomo pripravili tako spojini z nekoliko manjšim 4,5-dikloropirolnim fragmentom kot tudi spojine z nekoliko večjima indolnim in indazolnim fragmentom. Da bi zagotovili čimbolj optimalne interakcije med zaviralcem in encimom, bomo pripravili 4- in 5-aminopirolna derivata, saj predvidevamo, da bi takšna fragmenta s tem omogočala še dodatne interakcije z aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu. Ker bomo aminopirolne derivate sintetizirali z redukcijo ustreznih nitropirollov, bomo pripravili in ovrednotili zaviralno delovanje tudi tovrstnim spojinam (slika 9).



Slika 9: Fragmenti, ki jih bomo uporabili pri prvi seriji spojin

Na osnovi rezultatov testov biološke aktivnosti spojinam iz prve serije bomo najustreznejši fragment uporabili kot osnovo pri sintezi druge serije spojin. Namen le-te je pripraviti spojine, ki bodo namesto L-tirozina vsebovale nekatere ostale aminokislinske fragmente. Da bi ovrednotili vpliv fenolne OH skupine na zaviralno aktivnost naših spojin, bomo pripravili derivate L-fenilalanina, ki te skupine ne vsebuje. Hkrati nas zanima tudi pomen stereokemije na zaviralno aktivnost naših spojin, zato bomo pripravili tudi derivate D-tirozina in D-fenilalanina. Sklepamo namreč, da bi tovrstne spojine z nekoliko drugačno orientacijo v vezavnem mestu prav tako lahko izkazale dobro vezavo. Ker D-tirozin v času našega dela komercialno ni bil dostopen, smo se odločili namesto njega uporabiti racemni tirozin. Tako bodo tudi naše končne spojine vsebovale racemno zmes obeh enantiomerov. V primeru, da se bo derivat D-tirozina izkazal za aktivnejšega od L-derivata, se bo to izboljšanje aktivnosti poznalo tudi že pri racemni zmesi, kar nam bo kljub temu dalo ustrezne informacije. Z namenom izboljšanja vezave L-tirozinskega fragmenta bomo pripravili spojine, ki vsebujejo nitro skupino na fenolnem obroču, ki poveča kislost OH skupine. Le-ta bi tako lahko zaradi večjega deleža ioniziranega oblike pri fiziološkem pH tvorila z aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu tudi ionske interakcije. Poleg aromatskih aminokislinskih frag-

mentov pa bomo pripravili tudi spojine, ki vsebujejo nekatere nepolarne alifatske aminokislinske ostanke, kot so L-valin, 1-aminocikloheksan-1-karboksilna kislina ter rigidni 4-hidroksi-L-prolin. Poleg derivatov 3-aminobenzojske kisline bomo pripravili tudi derivate 4-(aminometil)benzojske kisline, saj je bilo v magistrskem delu kolega Andreja E. Cotmana ugotovljeno, da le-ti izkazujejo izmed vseh preizkušenih alifatskih in aromatskih fragmentov najboljše zaviralno delovanje na DNA girazo B.



Slika 10: Aminokislinski fragmenti, ki jih bomo uporabili pri drugi seriji spojin

3. Materiali in metode

Topila in kemikalije so bile kupljene pri proizvajalcih Acros Organics (Geel, Belgija) ter Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ZDA) in uporabljene brez dodatnega čiščenja. Za analitsko tankoplastno kromatografijo smo uporabili ploščice s silikagelom 60 F₂₅₄ (0.25 mm) proizvajalca Merck (Darmstadt, Nemčija). Za vizualizacijo ploščic smo uporabili UV svetlobo valovnih dolžin $\lambda = 254$ nm oz. 356 nm ter orositvene reagente ninhidrin, bromkrezolno zeleno in fosfomolibdensko kislino. Za preparativno kolonsko kromatografijo smo uporabili silikagel 60 (240-400 mesh). Reakcije, ki so potekale pod vplivom mikrovalov, smo izvedli v mikrovalovnem reaktorju CEM Discover (CEM Corp, Matthews, NC, ZDA). Temperaturo tališča smo določili na mikroskopu z grelno ploščo Reichert (Reichert Technologies, Depew, NY, ZDA) in niso korigirana. NMR spektre smo posneli na spektrometru Bruker AVANCE III 400 (Bruker, Billerica, MA, ZDA) pri 400 MHz (¹H NMR) oz. 100 MHz (¹³C NMR). Kot topilo smo uporabili DMSO-*d*₆, CDCl₃ in MeOD-*d*₄, kot interni standard pa tetrametilsilan (TMS). Za obdelavo spektrov smo uporabili program NMRnotebook. Signale smo navajali v ppm (parts per million) relativno na interni standard, njihovo multipliciteto pa smo označili z bs – širok singlet (broad singlet), d – dublet, dd – dublet dubleta, ddd – dublet dubleta dubleta, dt – dublet tripleta, m – multiplet, s – singlet, t – triplet. IR spektre smo posneli na spektrometru Thermo Nicolet Nexus FT-IR (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, ZDA). HPLC analize smo izvedli na instrumentu Agilent Technologies 1100 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, ZDA) z UV-VIS detektorjem G1365B, termostatom G1316A in samovzorčevalnikom G1313A. Masne spektre so posneli na Inštitutu Jožef Stefan na masnem spektrometru Autospec-Q VG-Analytical (Fisons, Manchester, Velika Britanija). Optično sučnost smo izmerili na Katedri za farmacevtsko kemijo s polarimetrom Perkin-Elmer 1241MC (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, ZDA) pri valovni dolžini $\lambda = 589,3$ nm v kiveti dolžine 10 cm. Za risanje kemijskih struktur, reakcijskih shem in generiranje kemijskih imen smo uporabili program ChemBioDraw. Za 3D vizualizacijo vezave spojin v aktivno mesto encima smo uporabili program PyMol.

Inhibitorno delovanje spojin na DNA girazo B so ovrednotili z uporabo *E. coli* Gyrase Supercoiling Assay Kit proizvajalca Inspiralis (Norwich, Velika Britanija). Testiranje so najprej izvedli pri koncentracijah inhibitorja 10 μ mol/L in 100 μ mol/L, spojinam, ki so pri teh koncentracijah izkazale inhibitorno delovanje, pa so določili vrednost IC₅₀. SPR eksperiment so izvedli po objavljenem literaturnem postopku [24]. Spojinam, ki so izkazale

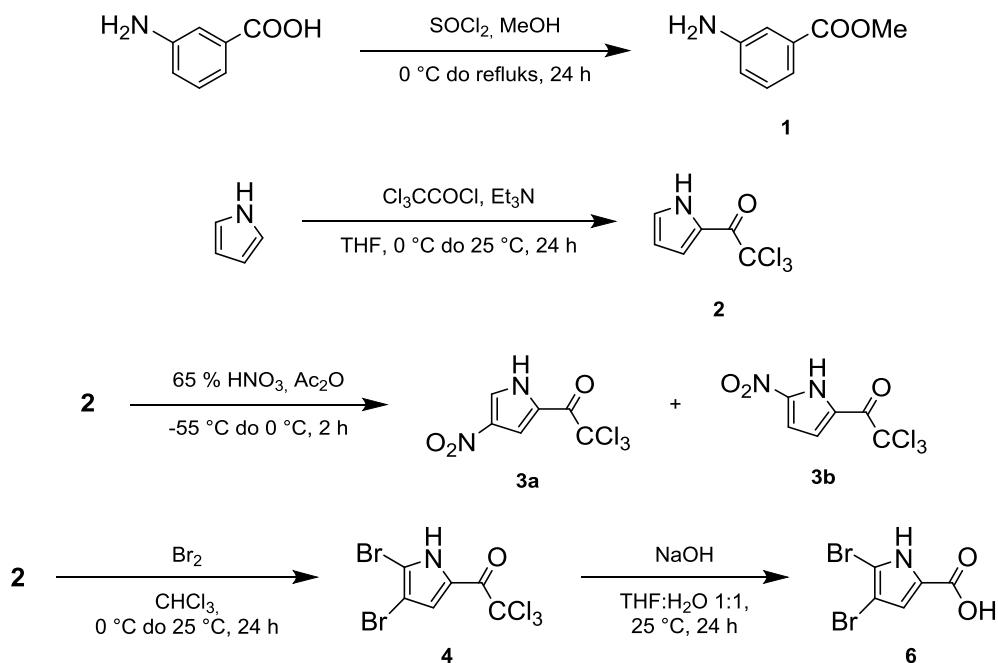
inhibitorno delovanje na DNA girazo B, so ovrednotili protibakterijsko delovanje na treh bakterijskih sevih – po Gramu pozitivnih *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 in *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 in po Gramu negativnih *Escherichia coli* ATCC 25922. Testiranje so najprej izvedli z mikrodilucijsko metodo pri koncentraciji 50 $\mu\text{mol/L}$, nato pa spojina, ki so pri tej koncentraciji izkazale vsaj 80 % inhibicijo rasti bakterij, določili vrednost MIC_{90} . Rezultati testiranj za drugo serijo spojin še niso znani. Biološko aktivnim spojinam iz prve serije so določili protibakterijsko delovanje tudi na bakterijskih sevih *Escherichia coli tolC* in *Escherichia coli impA*. Prvi nima funkcionalnega gena *tolC*, ki kodira protein, ki je sestavni del zunajmembranske komponente efluks črpalke, kar poveča občutljivost bakterije na delovanje antibiotikov, detergentov, barvil itd. [27]. Drugi sev pa ima mutacije na lokusu *imp* (*increased membrane permeability* oz. povečana permeabilnost membrane), kar preko zmanjšanja količine bakterijskega lipopolisaharida spremeni permeabilnost zunanje membrane in poveča občutljivost bakterije na različne hidrofobne molekule [28].

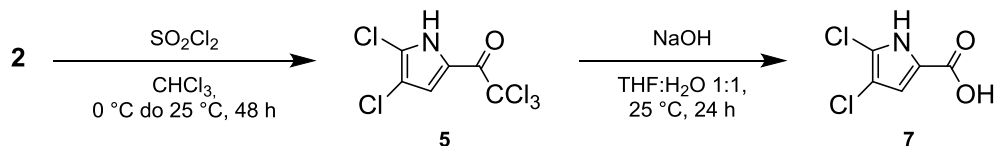
4. Eksperimentalno delo

4.1. Sinteza heterocikličnih derivatov L-tirozina¹

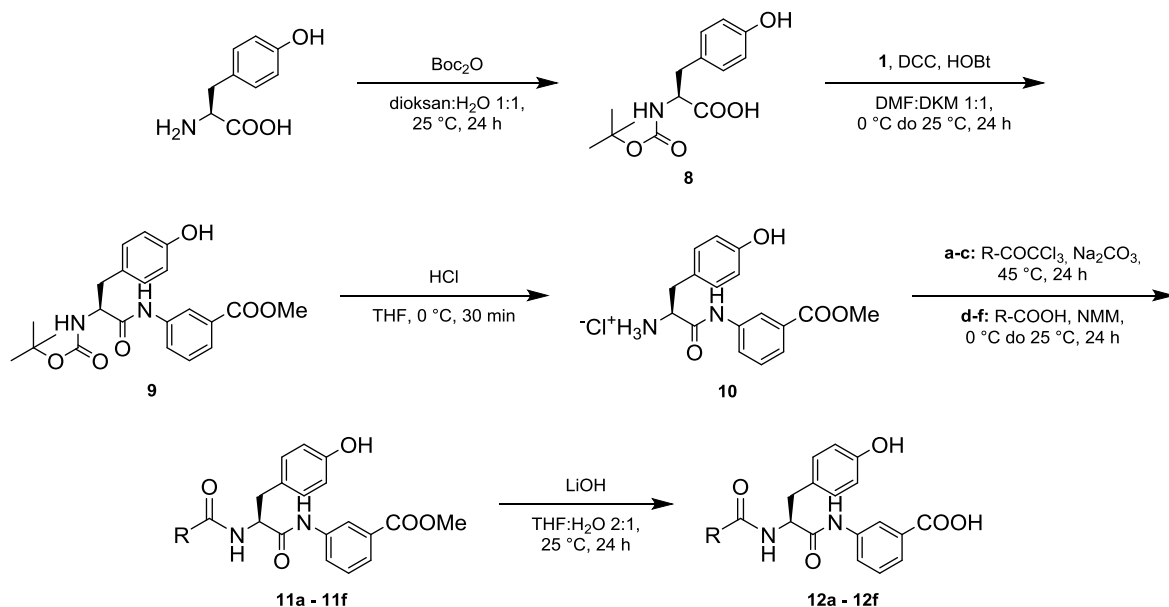
Sintezo prve serije spojin smo začeli s pripravo derivatov pirola. Najprej smo na mesto C2 pirola pripeli trikloroacetilno skupino, nato pa smo iz nastalega intermedija **2** z različnimi kemijskimi pretvorbami sintetizirali ustrezno substituirane spojine (**3a**, **3b**, **4**, **5**). Nitropirole smo poskusili reducirati do aminopirololov šele pri končnih spojinah, saj bi sicer morali amino skupino ustrezno zaščititi in na koncu še odščititi. Indolni in indazolni gradnik sta komercialno dostopna v obliki karboksilne kisline, zato ju ni bilo potrebno sintetizirati. Meta-aminobenzojsko kislino smo zaščitili v obliki metilnega estra (**1**), amino skupino L-tirozina pa z Boc skupino (**8**) in ju povezali z amidno vezjo (**9**). Po odstranitvi Boc zaščitne skupine smo na sintetizirani intermediat **10** s tvorbo amidne vezi pripeli še ustrezen pirolni (**11a-c**), indolni (**11d**) in indazolni (**11e**) gradnik. Predvidevali smo, da je tvorba amidne vezi pri sintetiziranih gradnikih mogoča kar direktno preko aminolize trikloroacetilne skupine, a smo le-to v enem primeru vseeno morali najprej pretvoriti v karboksilno kislino (**7**) in nato tvoriti amidno vez (**11f**). Na koncu smo hidrolizirali metilne estre in pripravili spojine s prosto karboksilno skupino (**12a-f**). Tako estrom kot kislinam smo določili zaviralno aktivnost na DNA girazo B.

4.1.1 Sinteza gradnikov





4.1.2 Sinteza končnih spojin

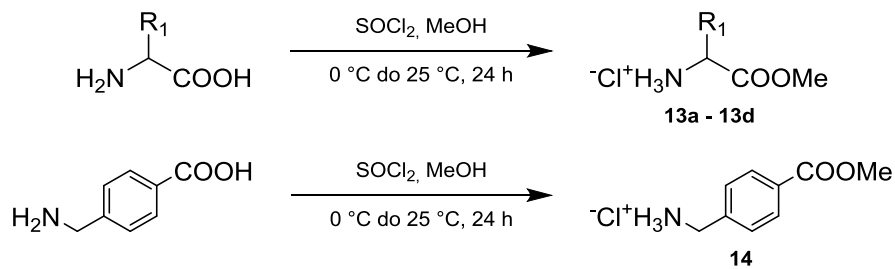


1: Sintezo heterocikličnih derivatov L-tirozina sva izvedla skupaj s kolegom Andrejem Emanuelom Cotmanom kot del študentske raziskovalne naloge. Sintezni postopki in eksperimentalni podatki se nahajajo v njegovi magistrski nalogi (Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo; Ljubljana, 2014).

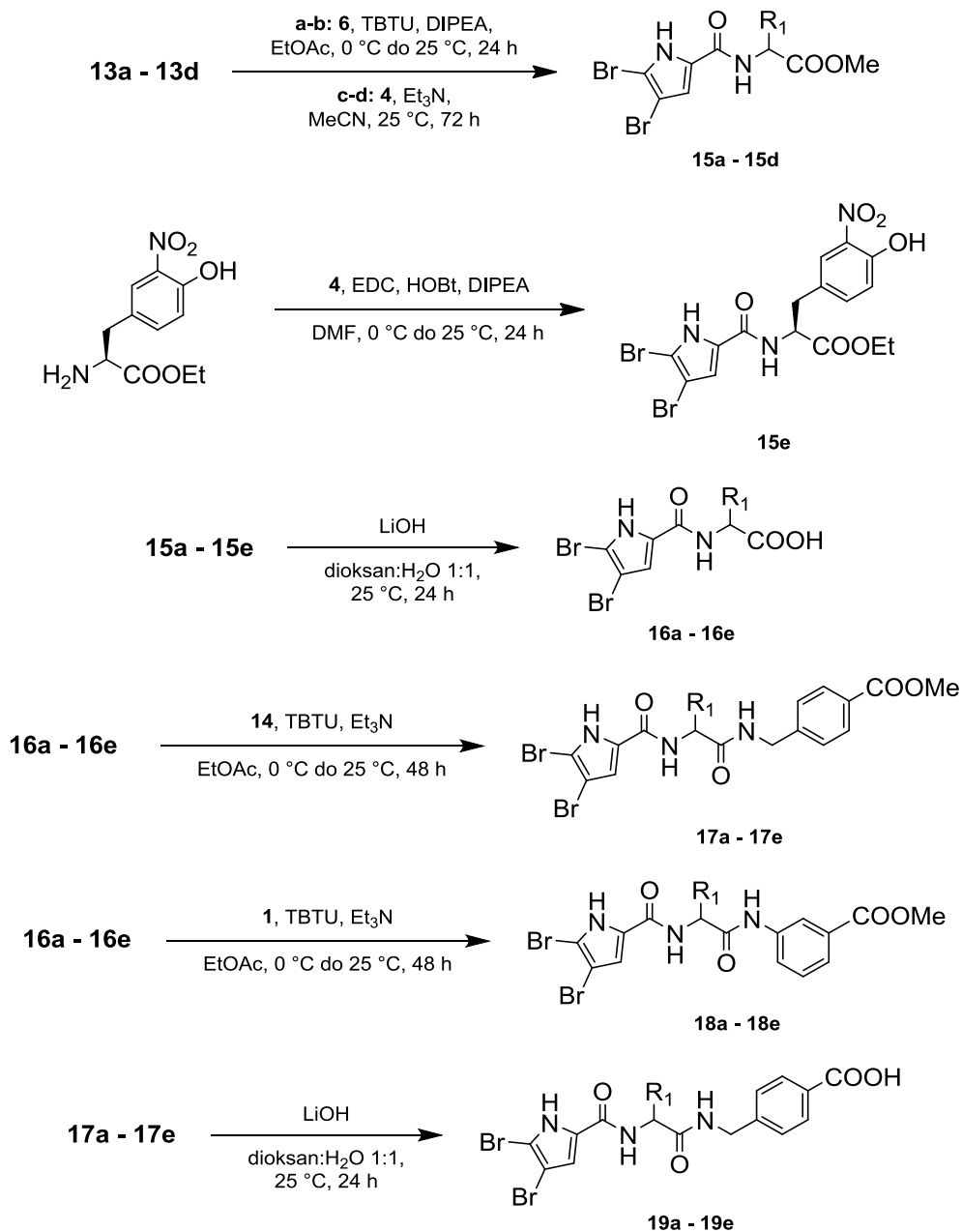
4.2. Sinteza aminokislinskih derivatov 4,5-dibromopirola

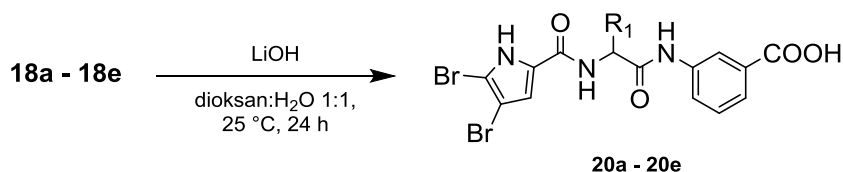
Pri sintezi druge serije spojin smo najprej zaščitili vse aminokislinske gradnike ter 4-aminometilbenzojsko kislino v obliki metilnih estrov (**13a-d**). Izjema je 3-nitro-L-tirozin, ki je komercialno že dostopen v obliki etilnega estra. Za razliko od prve serije spojin smo tokrat najprej tvorili amidno vez med pirolnim in aminokislinskim gradnikom (**15a-e**), po hidrolizi estra pa smo intermediate **16a-e** preko amidne vezi povezali bodisi z metil 4-(aminometil)benzoatom (**17a-e**), bodisi z metil 3-aminobenzoatom (**18a-e**). Tudi tu smo končne metilne estre hidrolizirali do ustreznih karboksilnih kislin (**19a-e**, **20a-e**). Zaviralno aktivnost na DNA girazo B smo določili poleg končnim spojinam tudi vsem intermediiatom pred pripenjanjem benzojskega fragmenta, saj smo želeli ovrednotiti, če je za vezavo spojin le-ta sploh potreben.

4.2.1 Sinteza gradnikov



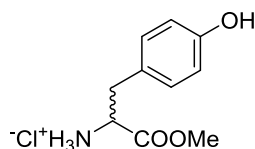
4.2.2 Sinteza končnih spojin





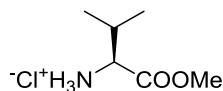
4.2.3 Sintezni postopki in eksperimentalni podatki

3-(4-Hidroksifenil)-1-metoksi-1-oksopropan-2-amonijev klorid (13a)

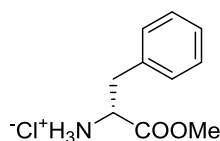


Standardni postopek za pripravo metilnih estrov: DL-tirozin (3.00 g, 16.6 mmol) raztopimo v 30 mL MeOH in med mešanjem ohladimo na ledeni kopeli. Tekom 10 min po kapljicah s pipeto dodamo SOCl_2 (1.8 mL; 24.8 mmol) in reakcijsko zmes mešamo še 30 min na 0°C , nato pa jo pustimo mešati čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan uparimo topilo pod znižanim tlakom in preostanek raztopimo v 30 mL dietil etra. Topilo uparimo pod znižanim tlakom, da dobimo bele kristale. Postopek spiranja z dietil etrom ponovimo še dvakrat, nato pa produkt sušimo na vakuumski črpalki, da dobimo 3.84 g (100 %) belih kristalov. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 2.97 (dd, $J = 14.1$ Hz, 6.9 Hz, 1H, benzil- CH_a), 3.05 (dd, $J = 14.1$ Hz, 5.9 Hz, 1H, benzil- CH_b), 3.67 (s, 3H, CH_3), 4.17 (dd, $J = 6.9$ Hz, 5.9 Hz, 1H, α -CH), 6.72 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-2,6-CH), 7.00 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-CH), 8.55 (s, 3H, NH_3^+), 9.46 (s, 1H, fenol-OH) ppm.

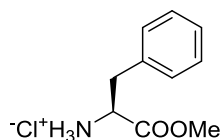
(S)-1-Metoksi-3-metil-1-oksobutan-2-amonijev klorid (13b)



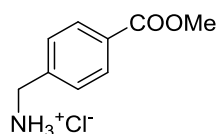
Spojino pripravimo po standardnem postopku za sintezo metilnih estrov iz L-valina (2.00 g; 17.1 mmol). Po sušenju na vakuumski črpalki dobimo 2.87 g (100 %) belih kristalov. $^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 0.93 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3 -1), 0.98 (d, $J = 6.9$ Hz, 3H, CH_3 -2), 2.20 (m, $J = 6.9$ Hz, 4.7 Hz, 1H, β -CH), 3.74 (s, 3H, OCH_3), 3.82 (d, $J = 4.7$ Hz, 1H, α -CH), 8.70 (s, 3H, NH_3^+) ppm.

(R)-1-Metoksi-1-okso-3-fenilpropan-2-amonijev klorid (13c)

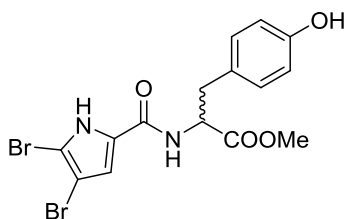
Spojino pripravimo po standardnem postopku za sintezo metilnih estrov iz D-fenilalanina (2.00 g; 12.1 mmol). Po sušenju na vakuumski črpalki dobimo 2.61 g (100 %) belih kristalov. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.08 (dd, $J = 14.0$ Hz, 7.3 Hz, 1H, benzil- CH_a), 3.17 (dd, $J = 14.0$ Hz, 6.0 Hz, 1H, benzil- CH_b), 3.67 (s, 3H, CH_3), 4.28 (dd, $J = 7.3$ Hz, 6.0 Hz, 1H, α -CH), 7.21-7.37 (m, 5H, 5x benzen-CH), 8.59 (s, 3H, NH_3^+) ppm.

(S)-1-Metoksi-1-okso-3-fenilpropan-2-amonijev klorid (13d)

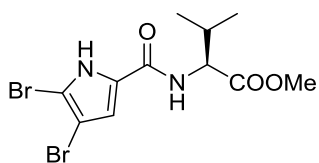
Spojino pripravimo po standardnem postopku za sintezo metilnih estrov iz L-fenilalanina (3.00 g; 18.2 mmol). Po sušenju na vakuumski črpalki dobimo 3.93 g (100 %) belih kristalov. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.10 (dd, $J = 14.0$ Hz, 7.4 Hz, 1H, benzil- CH_a), 3.20 (dd, $J = 14.0$ Hz, 5.7 Hz, 1H, benzil- CH_b), 3.65 (s, 3H, CH_3), 4.24 (dd, $J = 7.4$ Hz, 5.7 Hz, 1H, α -CH), 7.21-7.37 (m, 5H, 5x benzen-CH), 8.73 (s, 3H, NH_3^+) ppm.

(4-(Metoksikarbonil)fenil)metanamonijev klorid (14)

Spojino pripravimo po standardnem postopku za sintezo metilnih estrov iz 4-aminometilbenzojske kisline. Po sušenju na vakuumski črpalki dobimo bele kristale. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.84 (s, 3H, CH_3), 4.09 (bs, 2H, CH_2), 7.67 (d, 2H, benzen-3,5-CH), 7.95 (d, 2H, benzen-2,6-CH), 8.81 (bs, 3H, NH_3^+) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 41.75, 52.34, 129.28, 129.33, 129.47, 39.52, 165.98 ppm.

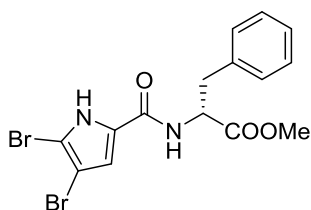
Metil 2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanoat (15a)

Spojino **6** (0.70 g; 2.4 mmol), TBTU (1.02 g; 3.2 mmol) in DIPEA (0.80 mL; 4.9 mmol) raztopimo v 30 mL etilacetata in mešamo pri sobni temperaturi 30 min, nato pa dodamo spojino **13a** (0.57 g; 2.4 mmol) in pustimo reakcijsko zmes mešati čez noč. Nato dodamo 70 mL etilacetata in raztopino speremo dvakrat s 100 mL 10 % vodne raztopine citronske kisline in dvakrat s 100 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃. Združeni bazični vodni fazi speremo še s 100 mL etilacetata, združene organske faze pa nato speremo s 150 mL nasičene vodne raztopine NaCl in sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄. Topilo uparimo pod znižanim tlakom in preostanek očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 1:1 + 5 % očetna kislina) in nato prekristaliziramo iz CHCl₃, da dobimo 0.63 g (58 %) belih kristalov. Tališče: 170 – 173 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.88 (dd, *J* = 13.8 Hz, 10.0 Hz, 1H, benzil-CH_a), 2.99 (dd, *J* = 13.8 Hz, 5.3 Hz, 1H, benzil CH_b), 3.61 (s, 3H, CH₃), 4.51 (ddd, *J* = 10.0 Hz, 8.0 Hz, 5.3 Hz, 1H, α-CH), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenol-2,6-CH), 7.01 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, pirol-CH), 7.03 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenol-3,5-CH), 8.43 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, amid-NH), 9.22 (s, 1H, fenol-OH), 12.68 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 35.72, 51.94, 54.08, 97.91, 105.18, 113.35, 115.06, 127.40, 127.44, 130.00, 155.97, 158.79, 172.26 ppm. IR (ATR): ν 3234, 1717, 1608, 1562, 1517, 1436, 1392, 1275, 1212, 1105, 979, 826, 764, 689 cm⁻¹. MS (ESI-) *m/z* = 446.9 ([MH+4]⁻, 52), 444.9 ([MH+2]⁻, 100), 442.9 ([MH]⁻, 53). HRMS (ESI-) za [C₁₅H₁₃N₂O₄Br₂]⁻: izr.: 442.9242, ugot.: 442.9248. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 40 % MeCN/H₂O do 90 % MeCN/H₂O v 15 min, nato 2.5 min pri 90 % MeCN/H₂O, v 18. minuti nazaj do 40 % MeCN/H₂O, post time 6 min; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μl; retencijski čas: 6.1 min (99.3 % pri 220 nm, 99.1 % pri 254 nm). [α]_D = -2.0 (c 1.00, MeOH).

Metil (*S*)-2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-metilbutanoat (15b)

Spojino pripravimo po postopku za sintezo spojine **15a** iz spojine **13b** (0.50 g; 3.0 mmol). Surov produkt očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 4:1 + 5 % očetna kislina) in prekristaliziramo iz mobilne faze, da dobimo 0.50 g (44 %) rjavkastih kristalov. Tališče: 174 – 176 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 0.90 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃-1), 0.94 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃-2), 2.11 (m, $J = 7.1$ Hz, 6.8 Hz, 1H, β -CH), 3.65 (s, 3H, OCH₃), 4.27 (dd, $J = 8.1$ Hz, 7.1 Hz, 1H, α -CH), 7.15 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, pirol-CH), 8.19 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, amid-NH), 12.73 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 18.79, 19.09, 29.71, 51.45, 57.86, 97.99, 105.07, 113.91, 127.31, 159.04, 172.14 ppm. IR (ATR): ν 3375, 3267, 3121, 2965, 1723, 1633, 1558, 1515, 1421, 1396, 1358, 1316, 1209, 1149, 841, 760 cm^{-1} . MS (ESI-) $m/z = 382.9$ ([MH+4]⁻, 53), 380.9 ([MH+2]⁻, 100), 378.9 ([MH]⁻, 56). HRMS (ESI-) za [C₁₁H₁₄N₂O₃Br₂]⁻: izr.: 378.9293, ugot.: 378.9299. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 40 % MeCN/H₂O do 90 % MeCN/H₂O v 15 min, nato 2.5 min pri 90 % MeCN/H₂O, v 18. minuti nazaj do 40 % MeCN/H₂O, post time 6 min; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μl ; retencijski čas: 8.3 min (99.2 % pri 220 nm, 99.1 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = -33.3$ (c 1.00, MeOH).

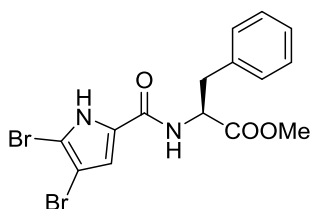
Metil (*R*)-2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-fenilpropanoat (**15c**)



Spojini **13c** (0.60 g; 2.8 mmol) in **4** (0.95 g; 2.6 mmol) natehtamo v 50 mL bučko in dodamo 15 mL acetonitrila in trietilamin (0.78 mL; 5.6 mmol) ter mešamo 3 dni v argonovi atmosferi. Reakcijski zmesi nato pod znižanim tlakom uparimo topilo, preostanek raztopimo v 50 mL etilacetata in ga speremo dvakrat s 30 mL 1M HCl. Združeni vodni fazi speremo še dvakrat s 30 mL etilacetata, nato pa združene organske faze speremo s 50 mL nasičene vodne raztopine NaCl in sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄. Po filtraciji topilo uparimo pod znižanim tlakom, rjav oljnat preostanek pa očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 7:3 + 2 % očetna kislina) in nato prekristaliziramo iz CHCl₃, da dobimo 0.77 g (70 %) belih kristalov. Tališče: 134 – 136 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.00 (dd, $J = 13.8$ Hz, 10.2 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.13 (dd, $J = 13.8$ Hz, 5.1 Hz, 1H, benzil-CH_b), 3.63 (s, 3H, CH₃), 4.61 (ddd, $J = 10.2$ Hz, 8.0 Hz, 5.1 Hz,

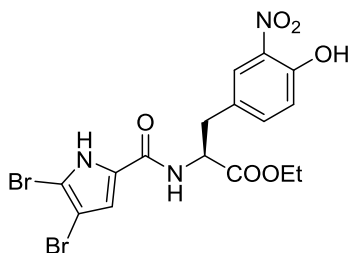
¹H, α-CH), 7.06 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, pirol-CH), 7.16-7.22 (m, 1H, benzen-4-CH), 7.24-7.30 (m, 4H, benzen-2,3,5,6-CH), 8.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, amid-NH), 12.69 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 36.40, 52.01, 53.67, 97.93, 105.21, 113.33, 126.54, 127.32, 128.27, 129.05, 137.50, 158.78, 172.11 ppm. IR (ATR): ν 3352, 3117, 2952, 2860, 1718, 1630, 1557, 1505, 1436, 1400, 1356, 1217, 1101, 974, 745, 698 cm⁻¹. MS (ESI-) *m/z* = 430.9 ([MH+4]⁻, 51), 428.9 ([MH+2]⁻, 100), 426.9 ([MH]⁻, 50). HRMS (ESI-) za [C₁₅H₁₃N₂O₃Br₂]⁻: izr.: 426.9293, ugot.: 426.9298. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 40 % MeCN/H₂O do 90 % MeCN/H₂O v 9 min, post time 6 min do 40 % MeCN/H₂O; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μl; retencijski čas: 8.0 min (99.0 % pri 220 nm, 99.9 % pri 254 nm). [α]_D = +64.3 (c 1.00, MeOH).

Metil (*S*)-2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-fenilpropanoat (**15d**)



Spojino pripravimo po postopku za sintezo spojine **15c** iz spojine **13d** (0.55 g; 2.6 mmol). Dobimo 0.80 g (80 %) belih kristalov. Tališče: 136 – 138 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.00 (dd, *J* = 13.8 Hz, 10.2 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.13 (dd, *J* = 13.8 Hz, 5.1 Hz, 1H, benzil-CH_b), 3.63 (s, 3H, CH₃), 4.61 (ddd, *J* = 10.2 Hz, 8.0 Hz, 5.1 Hz, 1H, α-CH), 7.06 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, pirol-CH), 7.16-7.22 (m, 1H, benzen-4-CH), 7.24-7.30 (m, 4H, benzen-2,3,5,6-CH), 8.51 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, amid-NH), 12.69 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 36.40, 52.01, 53.68, 97.92, 105.22, 113.34, 126.54, 127.32, 128.27, 129.06, 137.50, 158.78, 172.11 ppm. IR (ATR): ν 3350, 3115, 2952, 2859, 1718, 1630, 1557, 1505, 1436, 1400, 1356, 1216, 1102, 974, 745, 698 cm⁻¹. MS (ESI-) *m/z* = 430.9 ([MH+4]⁻, 61), 428.9 ([MH+2]⁻, 100), 426.9 ([MH]⁻, 55). HRMS (ESI-) za [C₁₅H₁₃N₂O₃Br₂]⁻: izr.: 426.9293, ugot.: 426.9302. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 40 % MeCN/H₂O do 90 % MeCN/H₂O v 15 min, nato 2.5 min pri 90 % MeCN/H₂O, v 18. minuti nazaj do 40 % MeCN/H₂O, post time 6 min; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μl; retencijski čas: 9.4 min (99.8 % pri 220 nm, 99.9 % pri 254 nm). [α]_D = -55.7 (c 1.00, MeOH).

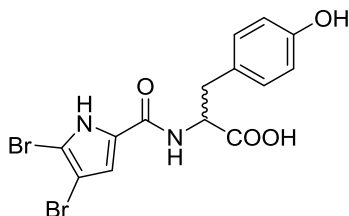
Etil (S)-2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksi-3-nitrofenil)propanoat (15e)



Spojino **6** (1.50 g; 5.6 mmol) raztopimo v 50 mL DMF in med mešanjem ohladimo na ledeni kopeli. Dodamo EDC (1.04 g; 7.0 mmol), HOBt (0.94 g; 7.0 mmol) in DIPEA (1.9 mL; 11.2 mmol) ter pustimo mešati 30 min na 0 °C. Nato dodamo etilni ester 3-nitro-L-tirozina (1.62 g; 5.6 mmol), pustimo, da se reakcijska zmes segreje na sobno temperaturo in spremljamo potek reakcije s tankoplastno kromatografijo. Naslednji dan uparimo topilo pod znižanim tlakom, preostanek raztopimo v 100 mL etilacetata in ga speremo dvakrat s 100 mL 10 % vodne raztopine citronske kisline in dvakrat s 100 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃. Združeni kisli in združeni bazični vodni fazi speremo še vsako posebej s 50 mL etilacetata, združene organske faze pa nato speremo s 100 mL nasičene vodne raztopine NaCl in sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄. Po filtraciji uparimo topilo pod znižanim tlakom, preostanek očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 2:1 + 5 % očetna kislina) in nato prekristaliziramo iz zmesi diklorometana in heksana (1:1), da dobimo 0,76 g (27 %) rumenih kristalov. Tališče: 72 – 74 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 1.15 (t, *J* = 7.1 Hz, 3H, CH₃), 2.98 (dd, *J* = 13.9 Hz, 9.9 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.11 (dd, *J* = 13.9 Hz, 5.5 Hz, 1H, benzil CH_b), 4.09 (q, *J* = 7.1 Hz, 2H, CH₂CH₃), 4.59 (ddd, *J* = 9.9 Hz, 8.0 Hz, 5.5 Hz, 1H, α-CH), 7.00 (s, 1H, pirol-CH), 7.04 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, fenol-6-CH), 7.45 (dd, *J* = 8.4 Hz, 2.3 Hz, 1H, fenol-5-CH), 7.82 (d, *J* = 2.3 Hz, 1H, fenol-3-CH), 8.50 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, amid-NH), 10.83 (s, 1H, fenol-OH), 12.71 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 14.04, 35.03, 53.48, 60.73, 97.95, 105.29, 113.37, 118.98, 125.46, 127.27, 128.62, 136.23, 136.27, 150.85, 158.83, 171.35 ppm. IR (ATR): ν 3151, 2982, 1723, 1631, 1536, 1426, 1325, 1247, 1203, 1096, 1020, 975, 822, 758 cm⁻¹. MS (ESI-): *m/z* 505.9 ([MH+4]⁻, 51), 503.9 ([MH+2]⁻, 100), 501.9 ([MH]⁻, 51), 388.2 (44), 135.0 (38), 105 (74). HRMS (ESI-) za [C₁₆H₁₄N₃O₆Br₂]⁻: izr.: 505.9249, ugot.: 505.9254. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 40 % MeCN/H₂O do 90 % MeCN/H₂O v 15 min, nato 2.5 min pri 90 % MeCN/H₂O, v 18. minuti nazaj do 40 % MeCN/H₂O, post time 6 min; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5

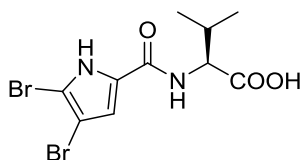
μl ; retencijski čas: 9.6 min (97.5 % pri 220 nm, 96.3 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +8.4$ (c 1.00, MeOH).

2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanojska kislina (16a)



Standardni postopek za hidrolizo estrov: Spojino **15a** (1.28 g; 2.9 mmol) raztopimo v 25 mL 1,4-dioksana, dodamo 25 mL 1M LiOH in pustimo mešati čez noč. Naslednji dan dodamo 100 mL vode in speremo s 100 mL etilacetata. Vodno fazo nato nakisamo s 5M HCl do pH = 1 in ekstrahiramo trikrat s 100 mL etilacetata. Zadnje tri organske frakcije sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄, filtriramo in uparimo topilo pod znižanim tlakom. Preostanek prekrizaliziramo iz CHCl₃, da dobimo 1.20 g (97 %) rjavkastih kristalov. Tališče: 200 – 203 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.84 (dd, $J = 13.8$ Hz, 10.4 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.02 (dd, $J = 13.8$ Hz, 4.4 Hz, 1H, benzil CH_b), 4.46 (ddd, $J = 10.4$ Hz, 8.4 Hz, 4.4 Hz, 1H, α -CH), 6.63 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-2,6-CH), 7.01 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.05 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-CH), 8.29 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, amid-NH), 9.19 (s, 1H, fenol-OH), 12.66 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, pirol-NH), 12.71 (bs, 1H, COOH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 35.75, 54.00, 97.89, 104.93, 113.22, 115.02, 127.63, 127.96, 129.99, 155.88, 158.76, 173.28 ppm. IR (ATR): ν 3266, 1720, 1626, 1554, 1511, 1416, 1210, 973, 829, 758, 646 cm⁻¹. MS (ESI-) $m/z = 432.9$ ([MH+4]⁻, 60), 430.9 ([MH+2]⁻, 100), 428.9 ([MH]⁻, 53). HRMS (ESI-) za [C₁₄H₁₁N₂O₄Br₂]: izr.: 428.9098, ugot.: 428.9094. $[\alpha]_D = +2.9$ (c 1.00, MeOH).

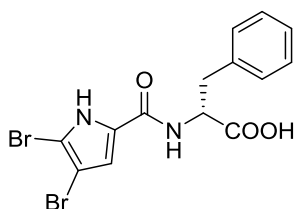
(*S*)-2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-metilbutanojska kislina (16b)



Spojino pripravimo po standardnem postopku za hidrolizo estrov iz spojine **15b** (0.77 g; 2.0 mmol). Surov produkt po ekstrakciji raztopimo v acetonitrilu in po kapljicah dodajamo vodo, da izpade 0.60 g (81 %) belih kristalov. Tališče: 140 – 144 °C. ¹H NMR (400 MHz,

DMSO- d_6): δ 0.92 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃-1), 0.93 (d, $J = 6.8$ Hz, 3H, CH₃-2), 2.13 (m, $J = 6.8$ Hz, 6.6 Hz, 1H, β -CH), 4.26 (dd, $J = 8.4$ Hz, 6.6 Hz, 1H, α -CH), 7.16 (s, 1H, pirol-CH), 8.02 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, amid-NH), 12.72 (bs, 2H, pirol-NH, COOH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 18.53, 19.28, 29.71, 57.54, 97.98, 104.84, 113.84, 127.56, 158.96, 173.09 ppm. IR (ATR): ν 3234, 2967, 1696, 1629, 1556, 1524, 1416, 1391, 1207, 979, 829, 760, 663 cm⁻¹. MS (ESI-) $m/z = 368.9$ ([MH+4]⁻, 48), 366.9 ([MH+2]⁻, 100), 364.9 ([MH]⁻, 51). HRMS (ESI-) za [C₁₀H₁₁N₂O₃Br₂]⁻: izr.: 364.9136, ugot.: 364.9132. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 30 % MeCN/H₂O do 95 % MeCN/H₂O v 5 min, nato 2 min pri 95 % MeCN/H₂O, post time 6 min do 30 % MeCN/H₂O; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μ l; retencijski čas: 1.2 min (95.1 % pri 220 nm, 95.8 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +18.4$ (c 1.00, MeOH).

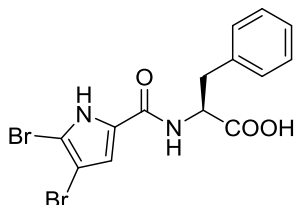
(R)-2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-fenilpropanojska kislina (16c)



Spojino pripravimo po standardnem postopku za hidrolizo estrov iz spojine **15c** (0.45 g; 1.0 mmol). Surov produkt po ekstrakciji očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 1:1 + 10 % očetna kislina) in prekrizaliziramo iz acetonitrila, da dobimo 0.35 g (81 %) rjavkastih kristalov. Tališče: 176 – 178 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.96 (dd, $J = 13.8$ Hz, 10.5 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.15 (dd, $J = 13.8$ Hz, 4.4 Hz, 1H, benzil-CH_b), 4.53 (ddd, $J = 10.5$ Hz, 7.9 Hz, 4.4 Hz, 1H, α -CH), 6.98 (s, 1H, pirol-CH), 7.13-7.21 (m, 1H, benzen-4-CH), 7.21-7.29 (m, 4H, benzen-2,3,5,6-CH), 8.33 (d, $J = 7.9$ Hz, 1H, amid-NH), 12.72 (bs, 2H, pirol-NH, COOH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 36.47, 53.62, 97.87, 104.96, 113.20, 126.41, 127.58, 128.23, 129.06, 130.00, 158.75, 173.15 ppm. IR (ATR): ν 3426, 3310, 3120, 2953, 2527, 1686, 1616, 1559, 1513, 1447, 1396, 1276, 1232, 1205, 949, 909, 813, 743, 699 cm⁻¹. MS (ESI-) $m/z = 412.9$ ([MH+4]⁻, 70), 414.9 ([MH+2]⁻, 100), 416.9 ([MH]⁻, 65). HRMS (ESI-) za [C₁₄H₁₁N₂O₃Br₂]⁻: izr.: 412.9136, ugot.: 412.9147. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 10 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N do 90 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N v 7 min, nato 2 min pri 90 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N, post time 6 min do 10 % MeCN/H₂O + 0.1

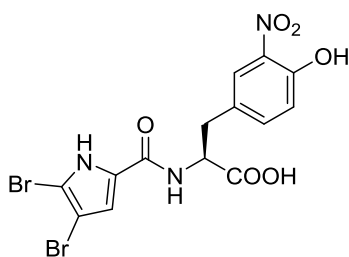
% Et₃N; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 µl; retencijski čas: 5.3 min (99.6 % pri 220 nm, 98.3 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +48.1$ (c 1.00, MeOH).

(S)-2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-fenilpropanojska kislina (16d)



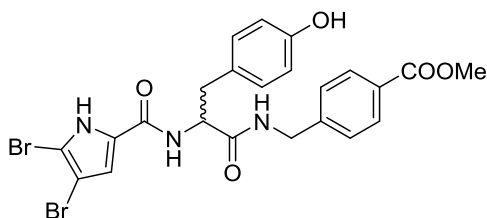
Spojino pripravimo po standardnem postopku za hidrolizo estrov iz spojine **15d** (0.77 g; 1.8 mmol). Surov produkt po ekstrakciji očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 1:1 + 10 % očetna kislina) in prekristaliziramo iz acetonitrila, da dobimo 0.69 g (93 %) rjavkastih kristalov. Tališče: 175 – 179 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.96 (dd, *J* = 13.8 Hz, 10.5 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.15 (dd, *J* = 13.8 Hz, 4.4 Hz, 1H, benzil-CH_b), 4.55 (ddd, *J* = 10.5 Hz, 8.4 Hz, 4.4 Hz, 1H, α-CH), 7.00 (s, 1H, pirol-CH), 7.14-7.21 (m, 1H, benzen-4-CH), 7.22-7.30 (m, 4H, benzen-2,3,5,6-CH), 8.36 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, amid-NH), 12.71 (bs, 2H, pirol-NH, COOH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 36.51, 53.66, 97.87, 104.94, 113.19, 126.39, 127.61, 128.22, 129.05, 138.04, 158.74, 173.18 ppm. IR (ATR): ν 3426, 3309, 3155, 2953, 2520, 1686, 1616, 1559, 1513, 1447, 1395, 1276, 1231, 1205, 940, 910, 812, 743, 698 cm⁻¹. MS (ESI-) *m/z* = 416.9 ([MH+4]⁻, 51), 414.9 ([MH+2]⁻, 100), 412.9 ([MH]⁻, 51). HRMS (ESI-) za [C₁₄H₁₁N₂O₃Br₂]⁻: izr.: 412.9136, ugot.: 412.9135. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 10 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N do 90 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N v 7 min, nato 2 min pri 90 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N, post time 6 min do 10 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 µl; retencijski čas: 5.3 min (98.0 % pri 220 nm, 99.1 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = -42.1$ (c 1.00, MeOH).

(S)-2-(4,5-Dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksi-3-nitrofenil)-propanojska kislina (16e)



Spojino pripravimo po standardnem postopku za hidrolizo estrov iz spojine **15e** (0.53 g; 1.0 mmol). Surov produkt po ekstrakciji očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza heksan, etilacetat 4:5 + 10 % očetna kislina) in prekrizaliziramo iz diklorometana, da dobimo 0.44 g (89 %) rumenih kristalov. Tališče: 99 – 101 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.93 (dd, $J = 13.9$ Hz, 10.4 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.13 (dd, $J = 13.9$ Hz, 4.4 Hz, 1H, benzil CH_b), 4.54 (ddd, $J = 10.4$ Hz, 8.4 Hz, 4.4 Hz, 1H, α -CH), 6.98 (s, 1H, pirol-CH), 7.02 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, fenol-6-CH), 7.44 (dd, $J = 8.5$ Hz, 2.2 Hz, 1H, fenol-5-CH), 7.82 (d, $J = 2.2$ Hz, 1H, fenol-3-CH), 8.37 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, amid-NH), 10.79 (s, 1H, fenol-OH), 12.67 (bs, 1H, pirol-NH), 12.86 (bs, 1H, COOH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 35.14, 53.36, 97.90, 105.06, 113.23, 118.99, 125.39, 127.51, 129.11, 136.21, 136.24, 150.87, 158.79, 172.83 ppm. IR (ATR): ν 3172, 1713, 1628, 1534, 1417, 1323, 1245, 1177, 975, 822, 759 cm^{-1} . MS (ESI-) $m/z = 477.9$ ([MH+4]⁻, 50), 475.9 ([MH+2]⁻, 100), 473.9 ([MH]⁻, 52). HRMS (ESI-) za [C₁₄H₁₀N₃O₆Br₂]: izr.: 473.8936, ugot.: 473.8946. $[\alpha]_D = -52.3$ (c 1.00, MeOH).

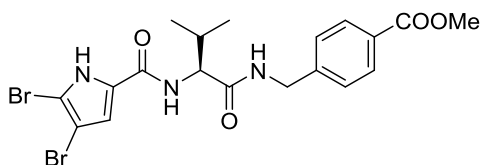
Metil 4-((2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)metil)benzoat (17a)



Standardni postopek za tvorbo amidne vezi z metil 4-(aminometil)benzoatom: Spojino **16a** (0.15 g; 0.35 mmol), TBTU (0.12 g; 0.38 mmol) in Et₃N (0.11 mL; 0.76 mmol) raztopimo v 10 mL etilacetata in mešamo 30 min. Nato dodamo spojino **14** (77 mg; 0.38 mmol) in pustimo reakcijsko zmes mešati čez noč. Naslednji dan dodamo še 0,3 ekvivalenta TBTU (33 mg) in pustimo mešati še 24 h. Nato dodamo 15 mL etilacetata in speremo dvakrat s 15 mL 10 % vodne raztopine citronske kisline in dvakrat s 15 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃. Združeni kisli in združeni bazični vodni fazi speremo še vsako z 20 mL etilacetata, združene organske faze pa nato speremo s 30 mL nasičene vodne raztopine NaCl in sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄. Pod znižanim tlakom uparimo topilo in preostanek očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 1:1 + 5 % očetna kislina) in prekrizaliziramo iz mobilne faze, da dobimo 0.14 g (70 %) rumenih kristalov. Tališče: 202 – 205 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.82 (dd, $J = 13.7$ Hz, 10.0

Hz, 1H, benzil-CH_a), 2.98 (dd, $J = 13.7$ Hz, 5.0 Hz, 1H, benzil CH_b), 3.84 (s, 3H, CH₃), 4.35 (ABXm, $J_{AB} = 16.0$ Hz, $J_{AX} = J_{BX} = 6.0$ Hz, 2H, benzilamid-CH₂), 4.59 (ddd, $J = 10.0$ Hz, 8.3 Hz, 5.0 Hz, 1H, α -CH), 6.63 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-2,6-CH), 7.04 (s, 1H, pirol-CH), 7.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-CH), 7.29 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, benzen-3,5-CH), 7.88 (d, $J = 8.4$ Hz, 2H, benzen-2,6-CH), 8.27 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, amid-NH), 8.65 (t, $J_{AX} = J_{BX} = 6.0$ Hz, 1H, benzilamid-NH), 9.19 (s, 1H, fenol-OH), 12.64 (d, $J = 2.6$ Hz, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 36.68, 41.86, 52.10, 54.90, 97.83, 104.72, 113.41, 114.94, 127.17, 127.78, 128.05, 128.13, 129.15, 130.09, 145.08, 155.83, 158.70, 166.13, 171.54 ppm. IR (ATR): ν 3401, 3244, 2952, 1662, 1623, 1562, 1514, 1423, 1283, 1229, 1109, 823, 758 cm⁻¹. MS (ESI-) $m/z = 579.9$ ([MH+4]⁻, 66), 577.9 ([MH+2]⁻, 100), 575.9 ([MH]⁻, 65), 307.1 (38). HRMS (ESI-) za [C₂₃H₂₀N₃O₅Br₂]⁻: izr.: 575.9770, ugot.: 575.9786. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 40 % MeCN/H₂O do 90 % MeCN/H₂O v 15 min, nato 2.5 min pri 90 % MeCN/H₂O, v 18. minuti nazaj do 40 % MeCN/H₂O, post time 6 min; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μ l; retencijski čas: 7.3 min (99.1 % pri 220 nm, 99.4 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +2.0$ (c 1.00, MeOH).

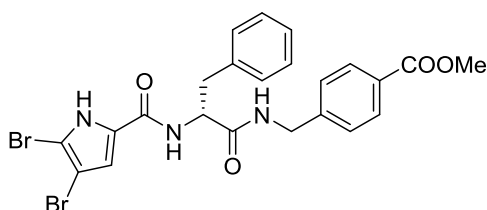
Metil (S)-4-((2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-metilbutanamido)metil)-benzoat (17b)



Spojino pripravimo po standardnem postopku za tvorbo amidne vezi z metil 4-(aminometil)benzoatom iz spojine **16b** (150 mg; 0.41 mmol). Po ekstrakciji surov produkt očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 7:1 + 5 % očetne kisline). Produkt nato še prekrizaliziramo iz etilacetata, da dobimo 120 mg (57 %) belih kristalov. Tališče: 205 – 208 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.88 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH₃-1), 0.89 (d, $J = 6.6$ Hz, 3H, CH₃-2), 2.08 (m, $J = 7.8$ Hz, 6.6 Hz, 1H, β -CH), 3.83 (s, 3H, OCH₃), 4.27 (dd, $J = 8.5$ Hz, 7.8 Hz, 1H, α -CH), 4.36 (ABXm, $J_{AB} = 16.1$ Hz, $J_{AX} = J_{BX} = 5.9$ Hz, 2H, benzilamid-CH₂), 7.13 (s, 1H, pirol-CH), 7.40 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, benzen-3,5-CH), 7.90 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, benzen-2,6-CH), 7.99 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, pirolamid-NH), 8.68 (t, $J_{AX} = J_{BX} = 5.9$ Hz, 1H, benzilamid-NH), 12.72 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 18.68, 19.35, 30.10, 41.87, 52.10, 58.48, 97.96, 104.69,

113.86, 127.43, 127.74, 128.11, 129.19, 145.17, 158.81, 166.10, 171.25 ppm. MS (ESI-) $m/z = 516.0$ ($[MH+4]^+$, 52), 514.0 ($[MH+2]^+$, 100), 512.0 ($[MH]^+$, 53). HRMS (ESI-) za $[C_{19}H_{20}N_3O_4Br_2]^-$: izr.: 511.9821, ugot.: 511.9831. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 40 % MeCN/H₂O do 90 % MeCN/H₂O v 15 min, nato 2.5 min pri 90 % MeCN/H₂O, v 18. minuti nazaj do 40 % MeCN/H₂O post time 6 min; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μ l; retencijski čas: 10.6 min (98.3 % pri 220 nm, 98.5 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +23.1$ (c 1.00, MeOH).

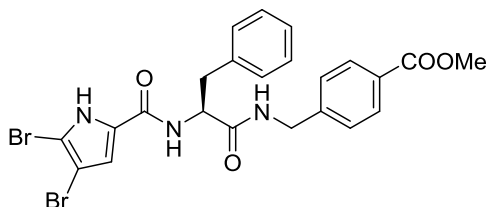
Metil (*R*)-4-((2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-fenilpropanamido)metil)-benzoat (17c)



Spojino pripravimo po standardnem postopku za tvorbo amidne vezi z metil 4-(aminometil)benzoatom iz spojine **16c** (130 mg; 0.31 mmol). Surov produkt po ekstrakciji očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 3:2) in nato še pre-kristaliziramo iz zmesi diklorometana in metanola (2:3), da dobimo 122 mg (70 %) rume-nih kristalov. Tališče: 215 – 218 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.94 (dd, $J = 13.6$ Hz, 10.2 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.11 (dd, $J = 13.6$ Hz, 4.8 Hz, 1H, benzil-CH_b), 3.84 (s, 3H, CH₃), 4.36 (d, $J = 6.0$ Hz, 2H, benzilamid-CH₂), 4.68 (ddd, $J = 10.2$ Hz, 8.3 Hz, 4.8 Hz, 1H, α -CH), 7.02 (s, 1H, pirol-CH), 7.18 (t, $J = 7.2$ Hz, 1H, Phe-4-CH), 7.25 (dd, $J = 7.9$ Hz, 7.2 Hz, 2H, Phe-3,5-CH), 7.28-7.33 (m, 4H, Phe-2,6-CH, benzen-3,5-CH), 7.88 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, benzen-2,6-CH), 8.32 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, pirolamid-NH), 8.70 (t, $J = 6.0$ Hz, 1H, benzilamid-NH), 12.28 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 37.43, 41.89, 52.11, 54.50, 97.64, 105.06, 113.37, 126.31, 127.21, 127.88, 128.06, 128.16, 129.17, 138.18, 145.07, 158.89, 166.12, 171.45 ppm. IR (ATR): ν 3382, 3243, 3074, 2949, 1716, 1657, 1618, 1558, 1419, 1275, 1104, 828, 754, 693 cm⁻¹. MS (ESI-): m/z 564.0 ($[MH+4]^+$, 64), 562.0 ($[MH+2]^+$, 100), 560.0 ($[MH]^+$, 64). HRMS (ESI-) za $[C_{23}H_{20}N_3O_4Br_2]^-$: izr.: 559.9821, ugot.: 559.9823. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 40 % MeCN/H₂O do 90 % MeCN/H₂O v 15 min, nato 2.5 min pri 90 % MeCN/H₂O, v 18. minuti nazaj do 40 % MeCN/H₂O, post time 6 min; pre-

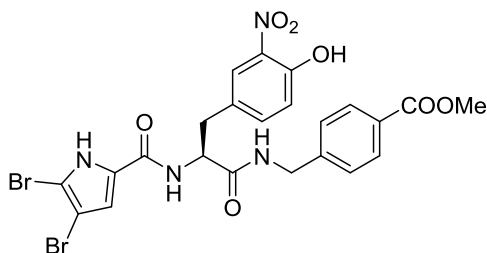
tok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μ l; retencijski čas: 11.5 min (98.4 % pri 220 nm, 98.2 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +7.1$ (c 1.00, MeOH).

Metil (S)-4-((2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-fenilpropanamido)metil)-benzoat (17d)



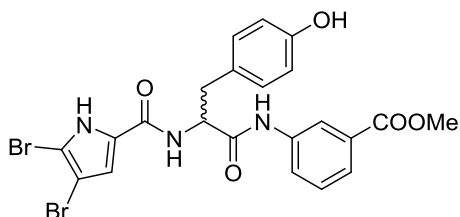
Spojino pripravimo po tipičnem postopku za tvorbo amidne vezi z metil 4-(aminometil)benzoatom iz spojine **16d** (200 mg; 0.48 mmol). Surov produkt po ekstrakciji očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 3:2) in nato še pre-kristaliziramo iz zmesi diklorometana in metanola (9:1), da dobimo 188 mg (70 %) rume-nih kristalov. Tališče: 181 – 184 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.94 (dd, $J = 13.6$ Hz, 10.3 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.12 (dd, $J = 13.6$ Hz, 4.5 Hz, 1H, benzil-CH_b), 3.84 (s, 3H, CH₃), 4.36 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H, benzilamid-CH₂), 4.68 (ddd, $J = 10.3$ Hz, 8.3 Hz, 4.5 Hz, 1H, α -CH), 7.04 (s, 1H, pirol-CH), 7.18 (t, $J = 7.1$ Hz, 1H, Phe-4-CH), 7.26 (dd, $J = 7.8$ Hz, 7.1 Hz, 2H, Phe-3,5-CH), 7.28-7.35 (m, 4H, Phe-2,6-CH, benzen-3,5-CH), 7.88 (d, $J = 8.2$ Hz, 2H, benzen-2,6-CH), 8.35 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, pirolamid-NH), 8.71 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, benzilamid-NH), 12.64 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 37.39, 41.91, 52.12, 54.55, 97.86, 104.78, 113.42, 126.32, 127.21, 127.69, 128.06, 128.16, 129.17, 138.19, 145.07, 158.73, 166.12, 171.43 ppm. IR (ATR): ν 3250, 1716, 1620, 1557, 1519, 1417, 1278, 1105, 972, 826, 752, 698 cm^{-1} . MS (ESI-): m/z 564.0 ([MH+4]⁻, 54), 562.0 ([MH+2]⁻, 100), 560.0 ([MH]⁻, 52). HRMS (ESI-) za [C₂₃H₂₀N₃O₄Br₂]⁻: izr.: 559.9821, ugot.: 559.9821. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 40 % MeCN/H₂O do 90 % MeCN/H₂O v 15 min, nato 2.5 min pri 90 % MeCN/H₂O, v 18. minuti nazaj do 40 % MeCN/H₂O, post time 6 min; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μ l; retencijski čas: 11.5 min (96.1 % pri 220 nm, 98.0 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = -5.9$ (c 1.00, MeOH).

Metil (S)-4-((2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksi-3-nitrofenil)-propanamido)metil)benzoat (17e)



Spojino pripravimo po standardnem postopku za tvorbo amidne vezi z metil 4-(aminometil)benzoatom iz spojine **16e** (0.20 g; 0.4 mmol). Po spiranju združenih organskih faz z nasičeno vodno raztopino NaCl speremo vodno fazo še z 20 mL etilacetata. Surov produkt očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 2:1 + 5 % očetna kislina), da dobimo 0.09 g (35 %) rumenih kristalov. Tališče: 198 – 201 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.90 (dd, $J = 13.7$ Hz, 10.3 Hz, 1H, benzil- CH_a), 3.08 (dd, $J = 13.7$ Hz, 4.8 Hz, 1H, benzil- CH_b), 3.84 (s, 3H, CH_3), 4.37 (d, $J = 5.9$ Hz, 2H, benzilamid- CH_2), 4.64 (ddd, $J = 10.3$ Hz, 8.5 Hz, 4.8 Hz, 1H, α -CH), 7.01 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, fenol-6-CH), 7.03 (s, 1H, pirol-CH), 7.33 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, benzen-3,5-CH), 7.46 (dd, $J = 8.5$ Hz, 2.1 Hz, 1H, fenol-5-CH), 7.87 (d, $J = 2.1$ Hz, 1H, fenol-3-CH) 7.89 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, benzen-2,6-CH), 8.36 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, pirolamid-NH), 8.72 (t, $J = 5.9$ Hz, 1H, benzilamid-NH), 10.79 (bs, 1H, fenol-OH), 12.65 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 36.07, 41.91, 52.11, 54.34, 97.85, 104.90, 113.43, 118.91, 125.44, 127.22, 127.60, 128.12, 129.19, 129.35, 136.14, 136.39, 144.97, 150.89, 158.81, 166.09, 171.10 ppm. IR (ATR): ν 3306, 2950, 1727, 1629, 1534, 1419, 1278, 1178, 1106, 973, 833, 753 cm^{-1} . MS (ESI-): m/z 625.0 ($[\text{MH}+4]^+$, 60), 623.0 ($[\text{MH}+2]^+$, 100), 621.0 ($[\text{MH}]^+$, 54), 149.0 (69). HRMS (ESI-) za $[\text{C}_{23}\text{H}_{19}\text{N}_4\text{O}_7\text{Br}_2]^+$: izr.: 620.9620, ugot.: 620.9626. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 30 % MeCN/ H_2O do 95 % MeCN/ H_2O v 15 min, nato 2.5 min pri 95 % MeCN/ H_2O , nato na 20 % MeCN/ H_2O v 0.5 min, post time 6 min; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μl ; retencijski čas: 11.1 min (97.7 % pri 220 nm, 96.7 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = -14.8$ (c 1.00, MeOH).

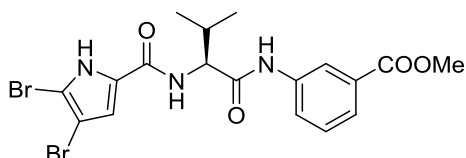
Metil 3-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)-benzoat (18a)



Standardni postopek za tvorbo amidne vezi z metil 3-aminobenzoatom: Spojino **16a** (0.18 g; 0.42 mmol), TBTU (0.15 g; 0.46 mmol) in Et₃N (0.13 mL; 0.92 mmol) raztopimo v 12 mL etilacetata in mešamo 30 min. Nato dodamo spojino **1** (85 mg; 0.56 mmol) in pustimo reakcijsko zmes mešati čez noč. Naslednji dan dodamo še 0,3 ekvivalenta TBTU (41 mg) in pustimo mešati še 24 h. Nato dodamo 15 mL etilacetata in speremo dvakrat s 15 mL 10 % vodne raztopine citronske kisline in dvakrat s 15 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃. Združeni kisli in združeni bazični vodni fazi speremo še vsako posebej z 20 mL etilacetata, združene organske faze pa nato speremo s 30 mL nasičene vodne raztopine NaCl in sušimo nad brezvodnim Na₂SO₄. Po filtriranju uparimo topilo pod znižanim tlakom in preostanek očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 1:1 + 5 % očetna kislina) in prekristaliziramo iz mobilne faze, da dobimo 0.14 g (70 %) rumenih kristalov.. Tališče: 134 – 136 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.88 (dd, *J* = 13.7 Hz, 10.1 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.01 (dd, *J* = 13.7 Hz, 4.7 Hz, 1H, benzil-CH_b), 3.85 (s, 3H, CH₃), 4.69 (ddd, *J* = 10.1 Hz, 8.0 Hz, 4.7 Hz, 1H, α-CH), 6.64 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, fenol-2,6-OH), 7.07 (s, 1H, pirol-CH), 7.14 (d, *J* = 8.4 Hz, 2H, fenol-3,5-OH), 7.47 (dd, *J* = 8.1 Hz, 7.8 Hz, 1H, benzen-5-CH), 7.65 (dm, *J* = 7.8 Hz, 1.4 Hz, 1.0 Hz, 1H, benzen-4-CH), 7.86 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 2.1 Hz, 1.0 Hz, 1H, benzen-6-CH), 8.26 (dd, *J* = 2.1 Hz, 1.4 Hz, 1H, benzen-2-CH), 8.37 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, pirolamid-NH), 9.19 (s, 1H, fenol-OH), 10.39 (s, 1H, anilid-NH), 12.64 (s, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 36.54, 52.26, 55.67, 97.89, 104.93, 113.50, 114.94, 119.89, 123.83, 124.02, 127.62, 127.84, 129.31, 130.10, 130.13, 139.24, 155.86, 158.87, 166.07, 170.81 ppm. IR (ATR): ν 3311, 2915, 2848, 1710, 1636, 1554, 1515, 1470, 1299, 1240, 1204, 1114, 970, 821, 749, 717 cm⁻¹. MS (ESI-): *m/z* 566.0 ([MH+4]⁻, 54), 564.0 ([MH+2]⁻, 100), 562.0 ([MH]⁻, 55). HRMS (ESI-) za [C₂₂H₁₈N₃O₅Br₂]: izr.: 561.9613, ugot.: 561.9621. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 40 % MeCN/H₂O do 90 % MeCN/H₂O v 15 min, nato 2.5 min pri 90 % MeCN/H₂O, v 18. minuti nazaj do 40 % MeCN/H₂O, post

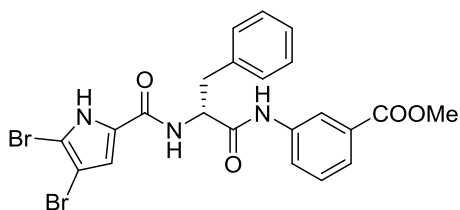
time 6 min; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μ l; retencijski čas: 10.2 min (95.8 % pri 220 nm, 96.8 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +2.0$ (c 1.00, MeOH).

Metil (S)-3-(2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-metilbutanamido)benzoat (18b)



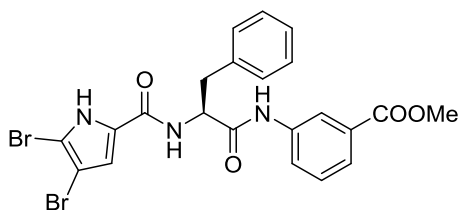
Spojino pripravimo po standardnem postopku za tvorbo amidne vezi z metil 3-aminobenzoatom iz spojine **16b** (0.15 g; 0.42 mmol). Po ekstrakciji surov produkt očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 5:1 + 5 % oetne kisline), da dobimo 143 mg (68 %) rjavkastih kristalov. Tališče: 191 – 195 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 0.95 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH₃-1), 0.96 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH₃-2), 2.13 (m, $J = 8.2$ Hz, 6.7 Hz, 1H, β -CH), 3.85 (s, 3H, OCH₃), 4.36 (dd, $J = 8.3$ Hz, 8.2 Hz, 1H, α -CH), 7.16 (d, $J = 2.3$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.46 (dd, $J = 8.1$ Hz, 7.8 Hz, 1H, benzen-5-CH), 7.65 (ddd, $J = 7.8$ Hz, 1.5 Hz, 1.1 Hz, 1H, benzen-4-CH), 7.86 (ddd, $J = 8.1$ Hz, 2.1 Hz, 1.1 Hz, 1H, benzen-6-CH), 8.15 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, amid-NH), 8.30 (dd, $J = 2.1$ Hz, 1.5 Hz, 1H, benzen-2-CH), 10.41 (s, 1H, anilid-NH), 12.72 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 18.94, 19.21, 30.21, 52.24, 59.41, 98.00, 104.85, 113.91, 119.81, 123.80, 124.05, 127.56, 129.31, 130.13, 139.10, 158.95, 166.06, 170.67 ppm. IR (ATR): ν 3301, 2966, 1681, 1630, 1556, 1524, 1420, 1287, 1230, 1198, 1111, 974, 752, 682 cm^{-1} . MS (ESI-) $m/z = 502.0$ ([MH+4]⁺, 50), 500.0 ([MH+2]⁺, 100), 498.0 ([MH]⁺, 52). HRMS (ESI-) za [C₁₈H₁₈N₃O₄Br₂]⁺: izr.: 497.9664, ugot.: 497.9656. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 40 % MeCN/H₂O do 90 % MeCN/H₂O v 15 min, nato 2.5 min pri 90 % MeCN/H₂O, v 18. minuti nazaj do 40 % MeCN/H₂O post time 6 min; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μ l; retencijski čas: 11.6 min (98.5 % pri 220 nm, 97.7 % pri 254 nm).

**Metil (*R*)-3-(2-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-fenilpropanamido)benzoat
(18c)**



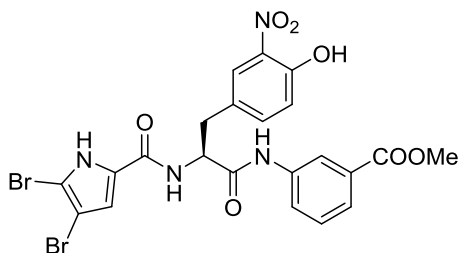
Spojino pripravimo po standardnem postopku za tvorbo amidne vezi z metil 3-aminobenzoatom iz spojine **16c** (0.14 g; 0.34 mmol). Surov produkt po ekstrakciji očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 3:1 + 2.5 % očetne kisline) in nato še prekristaliziramo iz mobilne faze, da dobimo 140 mg (75 %) belih kristalov. Tališče: 135 – 138 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 3.00 (dd, *J* = 13.8 Hz, 10.0 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.14 (dd, *J* = 13.8 Hz, 4.7 Hz, 1H, benzil-CH_b), 3.86 (s, 3H, CH₃), 4.78 (ddd, *J* = 10.0 Hz, 8.2 Hz, 4.7 Hz, 1H, α-CH), 7.07 (d, *J* = 2.5 Hz, 1H, pirol-CH), 7.18 (t, *J* = 7.3 Hz, 1H, Phe-4-CH), 7.27 (dd, *J* = 7.8 Hz, 7.3 Hz, 2H, Phe-3,5-CH), 7.36 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, Phe-2,6-CH), 7.47 (dd, *J* = 8.1 Hz, 7.7 Hz, 1H, benzen-5-CH), 7.65 (ddd, *J* = 7.7 Hz, 1.6 Hz, 0.9 Hz, 1H, benzen-4-CH), 7.87 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 1.9 Hz, 0.9 Hz, 1H, benzen-6-CH), 8.26 (dd, *J* = 1.9 Hz, 1.6 Hz, 1H, benzen-2-CH), 8.45 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, pirolamid-NH), 10.44 (s, 1H, anilid-NH), 12.65 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 37.24, 52.25, 55.29, 97.91, 104.96, 113.52, 119.91, 123.85, 124.06, 126.43, 127.54, 128.16, 129.19, 129.31, 130.11, 137.87, 139.19, 158.87, 166.05, 170.63 ppm. IR (ATR): ν 3272, 3109, 2950, 1710, 1674, 1616, 1562, 1413, 1299, 1240, 1205, 1081, 974, 834, 754, 698 cm⁻¹. MS (ESI⁻): *m/z* 550.0 ([MH+4]⁻, 51), 548.0 ([MH+2]⁻, 100), 546.0 ([MH]⁻, 52), 22.8 (31). HRMS (ESI⁻) za [C₂₂H₁₈N₃O₄Br₂]⁻: izr.: 545.9664, ugot.: 545.9655. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 40 % MeCN/H₂O do 90 % MeCN/H₂O v 9 min, post time 6 min do 40 % MeCN/H₂O; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μl; retencijski čas: 8.2 min (95.1 % pri 220 nm, 95.7 % pri 254 nm). [α]_D = +6.7 (c 1.00, MeOH).

Metil (S)-3-(2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-fenilpropanamido)benzoat (18d)



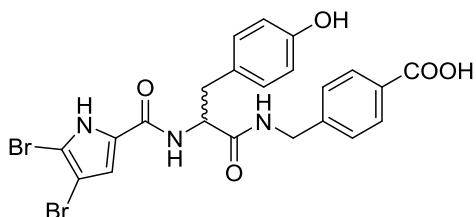
Spojino pripravimo po standardnem postopku za tvorbo amidne vezi z metil 3-aminobenzoatom iz spojine **16d** (0.20 g; 0.48 mmol). Surov produkt po ekstrakciji očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 3:1 + 2.5 % očetne kisline) in nato še prekrizaliziramo iz mobilne faze, da dobimo 194 mg (73 %) belih kristalov. Tališče: 132 – 136 °C. ^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 3.00 (dd, $J = 13.7$ Hz, 10.3 Hz, 1H, benzil- CH_a), 3.14 (dd, $J = 13.7$ Hz, 4.7 Hz, 1H, benzil- CH_b), 3.86 (s, 3H, CH_3), 4.78 (ddd, $J = 10.3$ Hz, 8.1 Hz, 4.7 Hz, 1H, α -CH), 7.07 (d, $J = 2.5$ Hz, 1H, pirol-CH), 7.18 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, Phe-4-CH), 7.27 (dd, $J = 7.8$ Hz, 7.3 Hz, 2H, Phe-3,5-CH), 7.37 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, Phe-2,6-CH), 7.47 (dd, $J = 8.1$ Hz, 7.8 Hz, 1H, benzen-5-CH), 7.66 (ddd, $J = 7.7$ Hz, 1.5 Hz, 1.0 Hz, 1H, benzen-4-CH), 7.87 (ddd, $J = 8.1$ Hz, 2.1 Hz, 1.0 Hz, 1H, benzen-6-CH), 8.26 (dd, $J = 2.1$ Hz, 1.5 Hz, 1H, benzen-2-CH), 8.45 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, pirolamid-NH), 10.44 (s, 1H, anilid-NH), 12.65 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$): δ 37.25, 52.26, 55.30, 97.91, 104.98, 113.52, 119.91, 123.86, 124.07, 126.44, 127.54, 128.17, 129.19, 129.32, 130.11, 137.87, 139.20, 158.88, 166.06, 170.64 ppm. IR (ATR): ν 3360, 3279, 3108, 1731, 1672, 1613, 1557, 1489, 1416, 1295, 1235, 1199, 1107, 1081, 751, 699 cm^{-1} . MS (ESI $^-$): m/z 550.0 ($[\text{MH}+4]^-$, 64), 548.0 ($[\text{MH}+2]^-$, 100), 546.0 ($[\text{MH}]^-$, 65), 361.1 (36), 265.1 (57). HRMS (ESI $^-$) za $[\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4\text{Br}_2]^-$: izr.: 545.9664, ugot.: 545.9666. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 40 % MeCN/ H_2O do 90 % MeCN/ H_2O v 15 min, nato 2.5 min pri 90 % MeCN/ H_2O , v 18. minuti nazaj do 40 % MeCN/ H_2O post time 6 min; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μl ; retencijski čas: 12.4 min (97.2 % pri 220 nm, 96.5 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = -6.7$ (c 1.00, MeOH).

Metil (S)-3-(2-(4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksi-3-nitrofenil)propanamido)benzoat (18e)



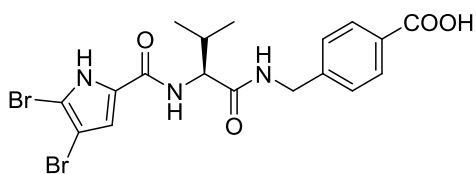
Spojino pripravimo po standardnem postopku za tvorbo amidne vezi z metil 3-aminobenzoatom iz spojine **16e** (0.20 g; 0.42 mmol). Surov produkt po ekstrakciji očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 3:1 + 5 % očetna kislina) in prekristaliziramo iz mobilne faze, da dobimo 0.19 g (74 %) rumenih kristalov. Tališče: 126 – 128 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.96 (dd, *J* = 13.8 Hz, 4.6 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.12 (dd, *J* = 13.8 Hz, 10.7 Hz, 1H, benzil-CH_b), 3.86 (s, 3H, CH₃), 4.74 (ddd, *J* = 10.7 Hz, 8.2 Hz, 4.6 Hz, 1H, α-CH), 7.02 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, fenol-6-CH), 7.05 (s, 1H, pirol-CH), 7.48 (dd, *J* = 8.1 Hz, 7.7 Hz, 1H, benzen-5-CH), 7.50 (dd, *J* = 8.5 Hz, 2.1 Hz, 1H, fenol-5-CH), 7.66 (ddd, *J* = 7.7 Hz, 1.6 Hz, 1.0 Hz, 1H, benzen-4-CH), 7.85 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 2.1 Hz, 1.0 Hz, 1H, benzen-6-CH), 7.94 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, fenol-3-CH), 8.25 (dd, *J* = 2.1 Hz, 1.6 Hz, 1H, benzen-2-CH), 8.45 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, pirolamid-NH), 10.44 (s, 1H, anilid-NH), 10.80 (bs, 1H, fenol-OH), 12.66 (bs, 1H, pirol-NH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 35.91, 52.26, 55.17, 97.90, 105.13, 113.51, 118.99, 119.90, 123.84, 124.13, 125.47, 127.49, 129.00, 129.35, 130.13, 136.18, 136.44, 139.10, 151.09, 158.98, 166.03, 170.31 ppm. IR (ATR): ν 3264, 1681, 1617, 1559, 1536, 1490, 1420, 1298, 1238, 1198, 1082, 972, 834, 752, 666 cm⁻¹. MS (ESI-) *m/z* = 610.9 ([MH+4]⁺, 57), 608.9 ([MH+2]⁺, 100), 606.9 ([MH]⁺, 58). HRMS (ESI-) za [C₂₂H₁₉N₄O₇Br₂]⁺: izr.: 608.9623, ugot.: 608.9620. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 40 % MeCN/H₂O do 90 % MeCN/H₂O v 9 min, post time 6 min do 40 % MeCN/H₂O; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μl; retencijski čas: 7.9 min (100.0 % pri 220 nm, 99.7 % pri 254 nm). [α]_D = +18.0 (c 1.00, MeOH).

4-((2-(4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)metil)benzojska kislina (19a)



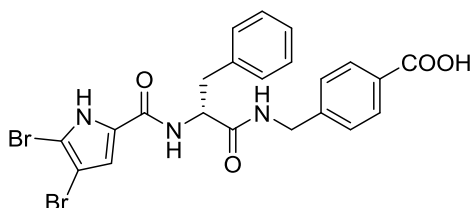
Spojino pripravimo po standardnem postopku za hidrolizo estrov iz spojine **17a** (0.10 g; 0.17 mmol). Po nakisanju s 5M HCl izpadejo sivkasto beli kristali, ki jih odnučamo in posušimo. Dobimo 50 mg (51 %) produkta. Tališče: 179 – 183 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.82 (dd, $J = 13.7$ Hz, 10.1 Hz, 1H, benzil- CH_a), 2.98 (dd, $J = 13.7$ Hz, 4.9 Hz, 1H, benzil CH_b), 4.34 (ABXm, $J_{AB} = 16.0$ Hz, $J_{AX} = J_{BX} = 6.0$ Hz, 2H, benzilamid- CH_2), 4.58 (ddd, $J = 10.1$ Hz, 8.3 Hz, 4.9 Hz, 1H, α -CH), 6.63 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-2,6-CH), 7.04 (s, 1H, pirol-CH), 7.08 (d, $J = 8.5$ Hz, 2H, fenol-3,5-CH), 7.26 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, benzen-3,5-CH), 7.86 (d, $J = 8.3$ Hz, 2H, benzen-2,6-CH), 8.32 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, amid-NH), 8.67 (t, $J_{AX} = J_{BX} = 6.0$ Hz, 1H, benzilamid-NH), 9.21 (s, 1H, fenol-OH), 12.17-13.12 (bs, 2H, pirol-NH, COOH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 36.69, 41.88, 55.01, 97.85, 104.64, 113.49, 114.94, 127.01, 127.80, 128.14, 129.21, 129.31, 130.09, 144.51, 155.84, 158.66, 167.21, 171.55 ppm. IR (ATR): ν 3252, 3065, 2925, 1658, 1610, 1565, 1513, 1405, 1268, 1180, 1113, 1052, 837, 753 cm^{-1} . MS (ESI-) $m/z = 566.0$ ($[\text{MH}+4]^-$, 52), 564.0 ($[\text{MH}+2]^-$, 100), 562.0 ($[\text{MH}]^-$, 51). HRMS (ESI-) za $[\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_5\text{Br}_2]^-$: izr.: 561.9613, ugot.: 561.9615. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 30 % MeCN/ H_2O do 95 % MeCN/ H_2O v 5 min, nato 2 min pri 95 % MeCN/ H_2O , post time 6 min do 30 % MeCN/ H_2O ; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μl ; retencijski čas: 1.5 min (95.9 % pri 220 nm, 94.9 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +3.7$ (c 1.00, MeOH).

(S)-4-((2-(4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-metilbutanamido)metil)benzojska kislina (19b)



Spojino pripravimo po standardnem postopku za hidrolizo estrov iz spojine **17b** (60 mg; 0.13 mmol). Surov produkt po ekstrakciji prekrizaliziramo iz zmesi acetonitrila in vode, da dobimo 32 mg (55 %) belih kristalov. Tališče: 244 – 248 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 0.88 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃-1), 0.89 (d, *J* = 6.7 Hz, 3H, CH₃-2), 2.09 (m, *J* = 7.7 Hz, 6.7 Hz, 1H, β-CH), 4.28 (dd, *J* = 8.6 Hz, 7.7 Hz, 1H, α-CH), 4.36 (ABXm, *J*_{AB} = 16.0 Hz, *J*_{AX} = *J*_{BX} = 6.1 Hz, 2H, benzilamid-CH₂), 7.13 (s, 1H, pirol-CH), 7.37 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, benzen-3,5-CH), 7.87 (d, *J* = 8.3 Hz, 2H, benzen-2,6-CH), 7.98 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, pirolamid-NH), 8.66 (t, *J*_{AX} = *J*_{BX} = 6.1 Hz, 1H, benzilamid-NH), 12.73 (s, 1H, pirol-NH), 12.88 (bs, 1H, COOH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 18.67, 19.36, 30.13, 41.89, 58.45, 97.97, 104.66, 113.87, 127.26, 127.73, 129.27, 129.35, 144.64, 158.79, 167.19, 171.21 ppm. IR (ATR): ν 3293, 3117, 2955, 1702, 1636, 1582, 1556, 1525, 1411, 1259, 1216, 1177, 973, 821, 749, 722, 617 cm⁻¹. MS (ESI⁻): *m/z* 502.0 ([MH+4]⁻, 53), 500.0 ([MH+2]⁻, 100), 498.0 ([MH]⁻, 36), 265.1 (76). HRMS (ESI⁻) za [C₁₈H₁₈N₃O₄Br₂]⁻: izr.: 497.9664, ugot.: 497.9650. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 10 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N do 90 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N v 7 min, nato 2 min pri 90 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N, post time 6 min do 10 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μl; retencijski čas: 4.5 min (94.5 % pri 220 nm, 100.0 % pri 254 nm). [α]_D = +58.5 (c 1.00, MeOH).

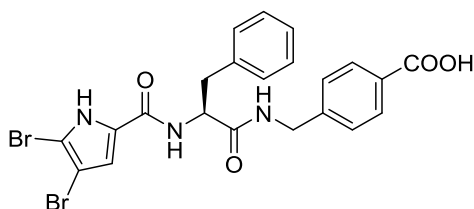
(R)-4-((2-(4,5-Dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-fenilpropanamido)metil)-benzojska kislina (19c)



Spojino pripravimo po standardnem postopku za hidrolizo estrov iz spojine **17c** (50 mg; 0.09 mmol). Po ekstrakciji dobimo 45 mg (92 %) rjavkastih kristalov zadovoljive čistosti, ki jih posušimo na vakuumski črpalki. Tališče: 204 – 208 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.94 (dd, *J* = 13.5 Hz, 10.5 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.12 (dd, *J* = 13.5 Hz, 4.6 Hz, 1H, benzil-CH_b), 4.36 (d, *J* = 6.0 Hz, 2H, benzilamid-CH₂), 4.68 (ddd, *J* = 10.5 Hz, 8.3 Hz, 4.6 Hz, 1H, α-CH), 7.04 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, pirol-CH), 7.14-7.34 (m, 7H, Phe-2,3,4,5,6-CH, benzen-3,5-CH), 7.86 (d, *J* = 8.2 Hz, 2H, benzen-2,6-CH), 8.35 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, pirolamid-NH), 8.70 (t, *J* = 6.0 Hz, 1H, benzilamid-NH), 12.64 (s, 1H, pirol-NH), 12.86 (bs, 1H,

COOH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 37.41, 41.93, 54.54, 97.85, 104.76, 113.42, 126.32, 127.04, 127.70, 128.16, 129.17, 129.21, 129.33, 138.20, 144.54, 158.72, 167.20, 171.39 ppm. IR (ATR): ν 3263, 3110, 2930, 1699, 1651, 1594, 1555, 1520, 1407, 1256 1178, 1111, 975, 823, 748, 700 cm^{-1} . MS (ESI-) m/z = 550.0 ($[\text{MH}+4]^-$, 42), 548.0 ($[\text{MH}+2]^-$, 77), 546.0 ($[\text{MH}]^-$, 40), 268.9 (51), 266.9 (100), 264.9 (55). HRMS (ESI-) za $[\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4\text{Br}_2]^-$: izr.: 545.9664, ugot.: 545.9650. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 10 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N do 90 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N v 7 min, nato 2 min pri 90 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N, post time 6 min do 10 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μl ; retencijski čas: 5.5 min (99.4 % pri 220 nm, 98.0 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +12.0$ (c 1.00, MeOH).

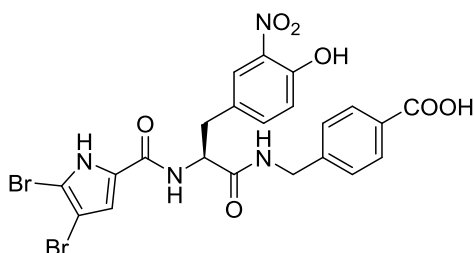
(S)-4-((2-(4,5-Dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-fenilpropanamido)metil)-benzojska kislina (19d)



Spojino pripravimo po standardnem postopku za hidrolizo estrov iz spojine **17d** (0.10 g; 0.17 mmol). Surov produkt po ekstrakciji očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 2:1 + 5 % očetne kisline) in nato še prekristaliziramo iz mobilne faze, da dobimo 65 mg (50 %) belih kristalov. Tališče: 205 – 209 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.94 (dd, J = 13.5 Hz, 10.5 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.12 (dd, J = 13.5 Hz, 4.6 Hz, 1H, benzil-CH_b), 4.36 (d, J = 6.0 Hz, 2H, benzilamid-CH₂), 4.68 (ddd, J = 10.5 Hz, 8.3 Hz, 4.6 Hz, 1H, α -CH), 7.04 (s, 1H, pirol-CH), 7.18 (t, J = 7.2 Hz, 1H, Phe-4-CH), 7.22-7.33 (m, 6H, Phe-2,3,5,6-CH, benzen-3,5-CH), 7.86 (d, J = 8.2 Hz, 2H, benzen-2,6-CH), 8.35 (d, J = 8.3 Hz, 1H, pirolamid-NH), 8.70 (t, J = 6.0 Hz, 1H, benzilamid-NH), 12.64 (s, 1H, pirol-NH), 12.88 (bs, 1H, COOH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 37.41, 41.93, 54.54, 97.85, 104.76, 113.41, 126.31, 127.03, 127.70, 128.15, 129.16, 129.22, 129.33, 138.20, 144.54, 158.72, 167.20, 171.39 ppm. IR (ATR): ν 3294, 3066, 2942, 1696, 1664, 1611, 1560, 1530, 1446, 1407, 1374, 1269, 1224, 1044, 887, 857, 834, 725, 699 cm^{-1} . MS (ESI-): m/z 550.0 ($[\text{MH}+4]^-$, 58), 548.0 ($[\text{MH}+2]^-$, 100), 546.0 ($[\text{MH}]^-$, 57), 265.1 (80). HRMS (ESI-) za $[\text{C}_{22}\text{H}_{18}\text{N}_3\text{O}_4\text{Br}_2]^-$: izr.: 545.9664, ugot.: 545.9653. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 10 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N do

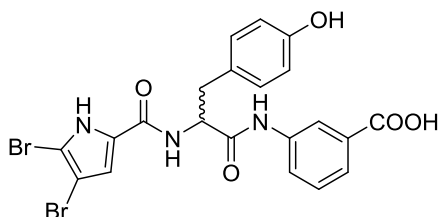
90 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N v 7 min, nato 2 min pri 90 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N, post time 6 min do 10 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μ l; retencijski čas: 5.4 min (95.7 % pri 220 nm, 96.9 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = -13.5$ (c 1.00, MeOH).

(S)-4-((2-(4,5-Dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksi-3-nitrofenil)propanamido)metil)benzojska kislina (19e)



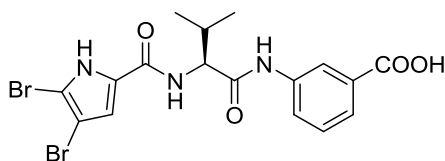
Spojino pripravimo po standardnem postopku za hidrolizo estrov iz spojine **17e** (67 mg; 0.11 mmol). Po nakisanju s 5M HCl (aq) izpadejo oranžni kristali, ki jih odnučamo in posušimo. Dobimo 42 mg (65 %) produkta. Tališče: 161 – 164 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.84 (dd, $J = 13.7$ Hz, 9.7 Hz, 1H, benzil-CH_a), 2.97 (dd, $J = 13.7$ Hz, 5.1 Hz, 1H, benzil-CH_b), 4.30 (ABX_m, $J_{AB} = 16.8$ Hz, $J_{AX} = J_{BX} = 5.9$ Hz, 2H, benzilamid-CH₂), 4.61 (ddd, $J = 9.7$ Hz, 8.6 Hz, 5.1 Hz, 1H, α -CH), 6.82 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, fenol-6-CH), 6.85 (s, 1H, pirol-CH), 7.18 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, benzen-3,5-CH), 7.28 (dd, $J = 8.7$ Hz, 2.0 Hz, 1H, fenol-5-CH), 7.76 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, fenol-3-CH), 7.79 (d, $J = 8.1$ Hz, 2H, benzen-2,6-CH), 8.24-8.43 (bs, 1H, pirolamid-NH), 8.62 (t, $J_{AX} = J_{BX} = 5.9$ Hz, 1H, benzilamid-NH) (kislinski protonov zaradi večje količine vode v vzorcu ne vidimo). ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 36.37, 42.00, 54.55, 97.33, 105.41, 113.52, 120.85, 125.56, 126.39, 126.59, 128.30, 129.21, 133.39, 136.01, 136.14, 142.40, 155.11, 159.20, 168.70, 171.24 ppm. IR (ATR): ν 3263, 3113, 3063, 2943, 1696, 1613, 1534, 1402, 1317, 1247, 1178, 1113, 974, 838, 762, 750 cm⁻¹. MS (ESI-) $m/z = 610.9$ ([MH+4]⁻, 52), 608.9 ([MH+2]⁻, 100), 606.9 ([MH]⁻, 52). HRMS (ESI-) za [C₂₂H₁₇N₄O₇Br₂]: izr.: 606.9464, ugot.: 606.9462. $[\alpha]_D = -16.1$ (c 1.00, MeOH).

3-(2-(4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksifenil)propanamido)-benzojska kislina (20a)



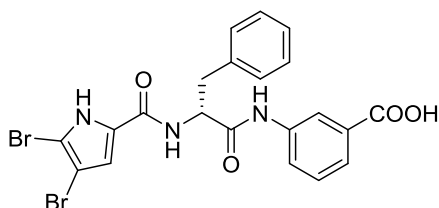
Spojino pripravimo po standardnem postopku za hidrolizo estrov iz spojine **18a** (0.11 g; 0.19 mmol). Surov produkt po ekstrakciji prekrizalziramo iz etilacetata, da dobimo 92 mg (88 %) belih kristalov. Tališče: 228 – 231 °C. ¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 2.88 (dd, *J* = 13.8 Hz, 10.0 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.01 (dd, *J* = 13.8 Hz, 4.7 Hz, 1H, benzil-CH_b), 4.69 (ddd, *J* = 10.0 Hz, 8.2 Hz, 4.7 Hz, 1H, α-CH), 6.64 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenol-2,6-OH), 7.07 (s, 1H, pirol-CH), 7.14 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, fenol-3,5-OH), 7.43 (dd, *J* = 8.1 Hz, 7.8 Hz, 1H, benzen-5-CH), 7.63 (dm, *J* = 7.8 Hz, 1.5 Hz, 1.0 Hz, 1H, benzen-4-CH), 7.84 (ddd, *J* = 8.1 Hz, 2.1 Hz, 1.0 Hz, 1H, benzen-6-CH), 8.22 (dd, *J* = 2.1 Hz, 1.5 Hz, 1H, benzen-2-CH), 8.38 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, pirolamid-NH), 9.19 (s, 1H, fenol-OH), 10.36 (s, 1H, anilid-NH), 12.65 (s, 1H, pirol-NH), 12.97 (bs, 1H, COOH) ppm. ¹³C NMR (100 MHz, DMSO-*d*₆): δ 36.56, 55.67, 97.91, 104.90, 113.50, 114.94, 120.13, 123.47, 124.23, 127.62, 127.88, 129.07, 130.14, 131.30, 139.10, 155.86, 158.85, 167.15, 170.76 ppm. IR (ATR): ν 3297, 3119, 1669, 1558, 1514, 1437, 1398, 1299, 1237, 1203, 975, 814, 758 cm⁻¹. MS (ESI-): *m/z* 551.9 ([MH+4]⁺, 33), 549.9 ([MH+2]⁺, 61), 547.9 ([MH]⁺, 34), 389.2 (37), 388.1 (100). HRMS (ESI-) za [C₂₁H₁₆N₃O₅Br₂]⁺: izr.: 547.9457, ugot.: 547.9446. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 10 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N do 90 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N v 7 min, nato 2 min pri 90 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N, post time 6 min do 10 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μl; retencijski čas: 4.9 min (98.4 % pri 220 nm, 98.8 % pri 254 nm). [α]_D = +3.9 (c 1.00, MeOH).

(S)-3-(2-(4,5-Dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)-3-metilbutanamido)benzojska kislina (20b)



Spojino pripravimo po standardnem postopku za hidrolizo estrov iz spojine **18b** (91 mg; 0.18 mmol). Surov produkt po ekstrakciji prekristaliziramo iz etilacetata, da dobimo 61 mg (69 %) rjavkastih kristalov. Tališče: 256 – 260 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 0.95 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH₃-1), 0.96 (d, $J = 6.7$ Hz, 3H, CH₃-2), 2.13 (m, $J = 8.2$ Hz, 6.7 Hz, 1H, β -CH), 4.37 (dd, $J = 8.3$ Hz, 8.2 Hz, 1H, α -CH), 7.16 (s, 1H, pirol-CH), 7.43 (dd, $J = 8.1$ Hz, 7.8 Hz, 1H, benzen-5-CH), 7.63 (ddd, $J = 7.8$ Hz, 1.4 Hz, 1.1 Hz, 1H, benzen-4-CH), 7.84 (ddd, $J = 8.1$ Hz, 2.2 Hz, 1.1 Hz, 1H, benzen-6-CH), 8.16 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, amid-NH), 8.25 (dd, $J = 2.2$ Hz, 1.4 Hz, 1H, benzen-2-CH), 10.37 (s, 1H, anilid-NH), 12.72 (bs, 1H, pirol-NH), 12.96 (bs, 1H, COOH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 18.96, 19.21, 30.23, 59.40, 97.99, 104.84, 113.91, 120.09, 123.44, 124.25, 127.58, 129.06, 131.35, 138.94, 158.93, 167.14, 170.60 ppm. IR (ATR): ν 3343, 3262, 3120, 2955, 1702, 1652, 1586, 1554, 1526, 1453, 1403, 1265, 1241, 869, 823, 773, 744 cm^{-1} . MS (ESI-) $m/z = 488.0$ ([MH+4]⁺, 53), 486.0 ([MH+2]⁺, 100), 484.0 ([MH]⁺, 53). HRMS (ESI-) za [C₁₇H₁₆N₃O₄Br₂]⁺: izr.: 483.9508, ugot.: 483.9518. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 10 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N do 90 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N v 7 min, nato 2 min pri 90 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N, post time 6 min do 10 % MeCN/H₂O + 0.1 % Et₃N; pretok: 1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μl ; retencijski čas: 4.9 min (96.4 % pri 220 nm, 100.0 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +33.7$ (c 1.00, DMSO).

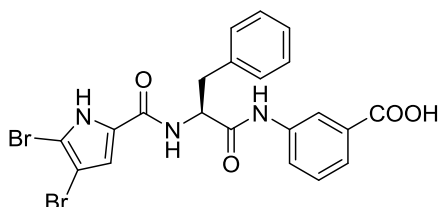
(R)-3-(2-(4,5-Dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-fenilpropanamido)benzojska kislina (20c)



Spojino pripravimo po standardnem postopku za hidrolizo estrov iz spojine **18c** (70 mg; 0.13 mmol). Surov produkt po ekstrakciji prekristaliziramo iz etilacetata, da dobimo 36 mg (53 %) belih kristalov. Tališče: 211 – 215 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.00 (dd, $J = 13.7$ Hz, 10.3 Hz, 1H, benzil-CH_a), 3.14 (dd, $J = 13.7$ Hz, 4.6 Hz, 1H, benzil-CH_b), 4.78 (ddd, $J = 10.3$ Hz, 8.2 Hz, 4.6 Hz, 1H, α -CH), 7.07 (s, 1H, pirol-CH), 7.18 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, Phe-4-CH), 7.27 (dd, $J = 7.7$ Hz, 7.3 Hz, 2H, Phe-3,5-CH), 7.37 (d, $J = 7.7$ Hz, 2H, Phe-2,6-CH), 7.44 (dd, $J = 8.1$ Hz, 7.8 Hz, 1H, benzen-5-CH), 7.64 (ddd, $J = 7.8$ Hz, 1.5 Hz, 1.0 Hz, 1H, benzen-4-CH), 7.85 (ddd, $J = 8.1$ Hz, 2.1 Hz, 1.0 Hz, 1H, benzen-6-

CH), 8.22 (dd, $J = 2.1$ Hz, 1.5 Hz, 1H, benzen-2-CH), 8.46 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, pirolamid-NH), 10.40 (s, 1H, anilid-NH), 12.65 (bs, 1H, pirol-NH), 12.99 (bs, 1H, COOH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 37.27, 55.30, 97.91, 104.95, 113.51, 120.15, 123.48, 124.27, 126.43, 127.55, 128.16, 129.08, 129.20, 131.31, 137.91, 139.05, 158.87, 167.14, 170.58 ppm. IR (ATR): ν 3290, 3117, 3062, 2952, 1735, 1677, 1592, 1548, 1526, 1438, 1398, 1232, 1083, 1045, 847, 753, 654 cm^{-1} . MS (ESI-) $m/z = 535.8$ ($[\text{MH}+4]^-$, 55), 533.8 ($[\text{MH}+2]^-$, 100), 531.8 ($[\text{MH}]^-$, 50), 224.7 (32), 222.7 (42), 220.7 (18). HRMS (ESI-) za $[\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4\text{Br}_2]^-$: izr.: 531.9508, ugot.: 531.9502. $[\alpha]_D = +9.1$ (c 1.00, MeOH).

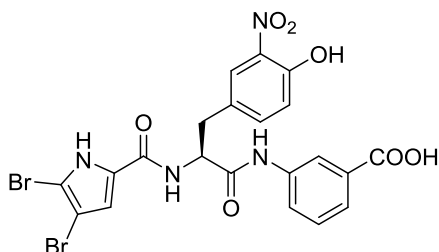
(S)-3-(2-(4,5-Dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-fenilpropanamido)benzojska kislina (20d)



Spojino pripravimo po standardnem postopku za hidrolizo estrov iz spojine **18d** (56 mg; 0.10 mmol). Surov produkt po ekstrakciji prekrizaliziramo iz etilacetata, da dobimo 32 mg (58 %) belih kristalov. Tališče: 214 – 218 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 3.00 (dd, $J = 13.7$ Hz, 10.3 Hz, 1H, benzil- CH_a), 3.14 (dd, $J = 13.7$ Hz, 4.5 Hz, 1H, benzil- CH_b), 4.78 (ddd, $J = 10.3$ Hz, 8.2 Hz, 4.5 Hz, 1H, α -CH), 7.07 (s, 1H, pirol-CH), 7.18 (t, $J = 7.3$ Hz, 1H, Phe-4-CH), 7.27 (dd, $J = 7.8$ Hz, 7.3 Hz, 2H, Phe-3,5-CH), 7.38 (d, $J = 7.8$ Hz, 2H, Phe-2,6-CH), 7.44 (dd, $J = 8.1$ Hz, 7.7 Hz, 1H, benzen-5-CH), 7.64 (ddd, $J = 7.7$ Hz, 1.5 Hz, 1.0 Hz, 1H, benzen-4-CH), 7.85 (ddd, $J = 8.1$ Hz, 2.0 Hz, 1.0 Hz, 1H, benzen-6-CH), 8.22 (dd, $J = 2.0$ Hz, 1.5 Hz, 1H, benzen-2-CH), 8.46 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, pirolamid-NH), 10.40 (s, 1H, anilid-NH), 12.65 (bs, 1H, pirol-NH), 12.99 (bs, 1H, COOH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 37.27, 55.29, 97.90, 104.95, 113.50, 120.14, 123.47, 124.26, 126.43, 127.55, 128.16, 129.07, 129.20, 131.30, 137.90, 139.04, 158.85, 167.13, 170.57 ppm. IR (ATR): ν 3299, 3117, 3058, 2936, 1698, 1678, 1592, 1527, 1436, 1398, 1242, 1229, 1082, 975, 863, 752, 655 cm^{-1} . MS (ESI-) $m/z = 535.9$ ($[\text{MH}+4]^-$, 50), 533.9 ($[\text{MH}+2]^-$, 100), 531.9 ($[\text{MH}]^-$, 45). HRMS (ESI-) za $[\text{C}_{21}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_4\text{Br}_2]^-$: izr.: 531.9508, ugot.: 531.9495. HPLC: Agilent EclipsePlus C18 kolona (150 x 4.6 mm); mobilna faza: 10 % MeCN/ H_2O + 0.1 % Et_3N do 90 % MeCN/ H_2O + 0.1 % Et_3N v 7 min, nato 2 min pri 90 % MeCN/ H_2O + 0.1 % Et_3N , post time 6 min do 10 % MeCN/ H_2O + 0.1 % Et_3N ; pretok:

1.0 ml/min; volumen injiciranja: 5 μ l; retencijski čas: 5.5 min (97.1 % pri 220 nm, 99.1 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = -11.0$ (c 1.00, MeOH).

(S)-3-(2-(4,5-Dibromo-1H-pirol-2-karboksamido)-3-(4-hidroksi-3-nitrofenil)propan-amido)benzojska kislina (20e)



Spojino pripravimo po standardnem postopku za hidrolizo estrov iz spojine **18e** (176 mg; 0.29 mmol). Surov produkt po ekstrakciji očistimo s kolonsko kromatografijo (mobilna faza = heksan, etilacetat 7:3 + 10 % očetna kislina), da dobimo 72 mg (42 %) rumenih kristalov. Tališče: 228 – 230 °C. ^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 2.96 (dd, $J = 13.7$ Hz, 10.5 Hz, 1H, benzil- CH_a), 3.12 (dd, $J = 13.7$ Hz, 4.3 Hz, 1H, benzil- CH_b), 4.74 (ddd, $J = 10.5$ Hz, 8.3 Hz, 4.3 Hz, 1H, α -CH), 7.03 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H, fenol-6-CH), 7.06 (s, 1H, pirol-CH), 7.44 (dd, $J = 8.1$ Hz, 7.7 Hz, 1H, benzen-5-CH), 7.51 (dd, $J = 8.5$ Hz, 2.0 Hz, 1H, fenol-5-CH), 7.64 (ddd, $J = 7.7$ Hz, 1.4 Hz, 1.0 Hz, 1H, benzen-4-CH), 7.83 (ddd, $J = 8.1$ Hz, 2.1 Hz, 1.0 Hz, 1H, benzen-6-CH), 7.94 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, fenol-3-CH), 8.21 (dd, $J = 2.1$ Hz, 1.4 Hz, 1H, benzen-2-CH), 8.47 (d, $J = 8.3$ Hz, 1H, pirolamid-NH), 10.41 (s, 1H, anilid-NH), 10.83 (bs, 1H, fenol-OH), 11.92-13.47 (bs, 2H, pirol-NH, COOH) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ 35.93, 55.18, 97.92, 105.09, 113.52, 118.95, 120.13, 123.40, 124.34, 125.47, 127.49, 129.09, 129.11, 131.51, 136.19, 136.46, 138.95, 151.01, 158.97, 167.18, 170.25 ppm. IR (ATR): ν 3310, 3169, 1680, 1632, 1535, 1489, 1413, 1300, 1234, 1083, 973, 834, 748 647 cm^{-1} . MS (ESI-): m/z 596.9 ($[\text{MH}+4]^-$, 36), 594.9 ($[\text{MH}+2]^-$, 65), 592.9 ($[\text{MH}]^-$, 37), 265.1 (100). HRMS (ESI-) za $[\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{N}_4\text{O}_7\text{Br}_2]^-$: izr.: 592.9307, ugot.: 592.9301. $[\alpha]_D = +19.0$ (c 1.00, MeOH).

5. Rezultati bioloških testiranj

Preglednica I: Rezultati bioloških testiranj

| Spojina | Zaviralno delovanje na <i>E. Coli</i> DNA GyrB | Protibakterijsko delovanje |
|---------|---|--|
| 11a | Neaktivna | / |
| 11b | Neaktivna | / |
| 11c | IC ₅₀ = 40,1 μM (supercoiling) Kd = 45,7 μM (SPR) | <i>E. coli</i> : MIC ₉₀ > 256 μg/mL <i>S. aureus</i> : MIC ₉₀ = 14 μg/mL <i>E. faecalis</i> : MIC ₉₀ = 14 μg/mL <i>E. coli tolC</i> : MIC > 256 μg/mL <i>E. coli impA</i> : MIC > 256 μg/mL |
| 11d | Neaktivna | / |
| 11e | IC ₅₀ > 50 μM | / |
| 11f | Neaktivna | Rezultati testiranja na <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> in <i>E. faecalis</i> še niso znani. <i>E. coli tolC</i> : MIC = 32 μg/mL <i>E. coli impA</i> : MIC = 16 μg/mL |
| 12a | Neaktivna | / |
| 12b | Neaktivna | / |
| 12c | IC ₅₀ = 16,1 μM | <i>E. coli</i> : neaktivna <i>S. aureus</i> : neaktivna <i>E. faecalis</i> : neaktivna <i>E. coli tolC</i> : MIC > 256 μg/mL <i>E. coli impA</i> : MIC > 256 μg/mL |
| 12d | Neaktivna | / |
| 12e | IC ₅₀ > 50 μM | / |
| 12f | IC ₅₀ = 23,6 μM | <i>E. coli</i> : neaktivna <i>S. aureus</i> : MIC ₉₀ = 14 μg/mL <i>E. faecalis</i> : MIC ₉₀ = 14 μg/mL |
| 15a | IC ₅₀ ~ 100 μM | / |
| 15b | Neaktivna | / |
| 15c | Neaktivna | / |

| | | |
|------------|-----------------------------|--|
| 15d | Neaktivna | / |
| 15e | Neaktivna | / |
| 16a | IC ₅₀ ~ 150 µM | / |
| 16b | Neaktivna | / |
| 16c | Neaktivna | / |
| 16d | Neaktivna | / |
| 16e | Neaktivna | / |
| 17a | IC ₅₀ ~ 100 µM | / |
| 17b | Neaktivna | / |
| 17c | Neaktivna | / |
| 17d | IC ₅₀ ~ 20 µM | / |
| 17e | IC ₅₀ = 0,522 µM | Rezultati testiranja na <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> in <i>E. faecalis</i> še niso znani. |
| 18a | IC ₅₀ = 4,78 µM | Rezultati testiranja na <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> in <i>E. faecalis</i> še niso znani. |
| 18b | IC ₅₀ ~ 50 µM | / |
| 18c | IC ₅₀ ~ 20 µM | / |
| 18d | IC ₅₀ = 8,07 µM | Rezultati testiranja na <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> in <i>E. faecalis</i> še niso znani. |
| 18e | IC ₅₀ = 1,73 µM | Rezultati testiranja na <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> in <i>E. faecalis</i> še niso znani. |
| 19a | IC ₅₀ = 0,453 µM | Rezultati testiranja na <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> in <i>E. faecalis</i> še niso znani. |
| 19b | IC ₅₀ ~ 20 µM | / |
| 19c | IC ₅₀ = 12,9 µM | Rezultati testiranja na <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> in <i>E. faecalis</i> še niso znani. |
| 19d | IC ₅₀ = 0,830 µM | Rezultati testiranja na <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> in <i>E. faecalis</i> še niso znani. |
| 19e | IC ₅₀ = 0,633 µM | Rezultati testiranja na <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> in <i>E. faecalis</i> še niso znani. |
| 20a | IC ₅₀ = 1,22 µM | Rezultati testiranja na <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> in <i>E. faecalis</i> še niso znani. |

| | | |
|------------|-------------------------|--|
| 20b | $IC_{50} \sim 20 \mu M$ | / |
| 20c | $IC_{50} = 2,38 \mu M$ | Rezultati testiranja na <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> in <i>E. faecalis</i> še niso znani. |
| 20d | $IC_{50} = 41,1 \mu M$ | / |
| 20e | $IC_{50} = 1,13 \mu M$ | Rezultati testiranja na <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> in <i>E. faecalis</i> še niso znani. |

6. Razprava

6.1. Kemijski del

6.1.1 Priprava substituiranih pirolnih gradnikov

Kemijske reakcije, ki so bile uporabljene pri sintezi pirolnih derivatov L-tirozina lahko v grobem razdelimo na tri skupine – reakcije za pripravo ustrezno substituiranih pirolnih gradnikov, tvorbe amidne vezi in hidrolize estrske vezi. Edini reakciji, ki ju v to razdelitev ne moremo uvrstiti, sta zaščita L-tirozina z Boc zaščitno skupino in nato odščita le-te.

Funkcionalizacijo pirola smo začeli s pripravo trikloroacetilnega derivata na mestu C2. Pirol zaradi delokalizacije prostega elektronskega para na dušikovem atomu po celotnem heterocikličnem obroču spada med aromatske spojine s povečano elektronsko gostoto, zato je zelo dober substrat za izvedbo različnih elektrofilnih aromatskih substitucij. Najbolj reaktivno mesto za reakcije z elektrofilom pa je prav mesto C2, saj je nastali σ -kompleks v tem primeru zaradi večje delokalizacije pozitivnega naboja stabilnejši kot pa v primeru reakcije na mestu C3 [29].

Pri nadaljnjih pretvorbah smo nato morali upoštevati, da bo prisotnost trikloroacetilne skupine zaradi svojega elektronprivlačnega učinka vplivala na reaktivnost molekule ter da bomo v primeru monosubstitucije lahko dobili zmes produktov na mestih C4 in C5. To smo tudi izkoristili pri reakciji nitriranja, kjer smo z eno samo reakcijo pripravili tako 4- kot tudi 5-nitropirolni derivat. Za 5-členske heterocikle, kot je pirol, je znano, da lahko poteka nitriranje le z uporabo HNO_3 in Ac_2O pri nizkih temperaturah. Tu *in situ* tvorimo acetil nitrat (MeCOONO_2), ki je učinkovit nitrirni reagent [29]. Pri uporabi klasičnih reakcijskih pogojev za nitriranje z močnimi kislinami, kot sta koncentrirana HNO_3 ali zmes $\text{HNO}_3/\text{H}_2\text{SO}_4$, namreč zaradi velike reaktivnosti pirola pride do polimerizacije in tvorbe rjavih produktov [29] [30]. Glede na literaturne podatke na regioselektivnost nitriranja 2-trikloroacetilpirola v veliki meri vpliva temperatura, saj lahko pri nižji temperaturi reakcijo usmerjamo predvsem k tvorbi kinetičnega produkta na mestu C5, medtem ko višanje reakcijske temperature vodi k večjemu deležu termodinamskega produkta na mestu C4 [31]. Sodeč po razmerju dobljenih produktov (3,3:1 v korist 5-nitro derivata) smo izbrali nekoliko prenizko temperaturo ($-55\text{ }^\circ\text{C}$), saj smo reakcijo razmeroma selektivno vodili v nitriranje na mesto C5. Ker smo uspeli izolirati zadovoljivo količino 4-nitro derivata, reakcije nismo ponavljali pri višji temperaturi. Polisubstitucija je bila pri tako milih pogojih malo verjetna, saj prisotnost dveh elektronprivlačnih skupin močno zmanjša reaktivnost sistema za nadaljnje elektrofilne aromatske substitucije [32].

V primeru bromiranja in kloriranja na pirolu in substituiranih derivatih pa je verjetnost polisubstitucije mnogo večja, kar smo tudi izkoristili za pripravo dihalogeniranih derivatov na mestu C4 in C5 [29]. Reagent za bromiranje je bil v našem primeru kar Br₂, za kloriranje pa smo uporabili sulfuri klorid (SO₂Cl₂), ki je mnogo primernejši za uporabo v kemijski sintezi kot pa plinasti Cl₂. Pri tem smo pazili, da smo odmerili le malo več kot 2 ekvivalenta ustreznih reagentov, da ne bi prišlo do morebitne trisubstitucije.

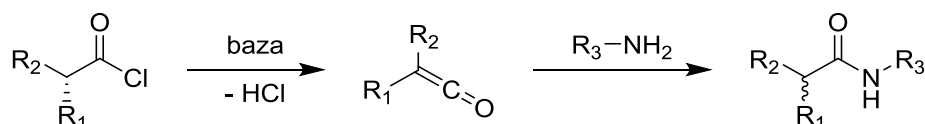
Ker so se trikloroacetilni derivati kljub veliki elektrofilnosti karbonilnega ogljika v nekaterih reakcijah z amini izkazali kot premalo reaktivni, smo dibromo in dikloro derivata tudi pretvorili do ustreznih karboksilnih kislin. Reakcija je potekala v alkalnem mediju (2M NaOH) in je analogna drugi stopnji t.i. haloformske reakcije, kjer lahko iz karbonilnih spojin z metilno skupino na α mestu s halogeniranjem in odcepom *in situ* tvorjene trihalogenirane metilne skupine v prisotnosti hidroksilnih ionov pripravimo karboksilne kisline in ustrezen haloform [29]. V našem primeru je tako kot stranski produkt reakcije nastal CHCl₃.

6.1.2 Tvorba amidne vezi med L-tirozinom in 3-aminobenzojsko kislino

Povezavo ključnih strukturnih fragmentov do končnih spojin smo dosegli s tvorbo dveh amidnih vezi. Prvo amidno vez smo tvorili med spojinama **1** in **9**, drugo amidno vez pa nato med spojino **10** in ustrežno substituiranimi pirolu oz. indolom in indazolom. Pri tvorbi prve amidne vezi je bilo zelo pomembno, da smo na oba gradnika najprej uvedli ustrezni zaščitni skupini. Oba gradnika namreč vsebujeta tako karboksilno skupino kot amino skupino, zato bi brez zaščitnih skupin lahko dobili zmes različnih amidnih produktov.

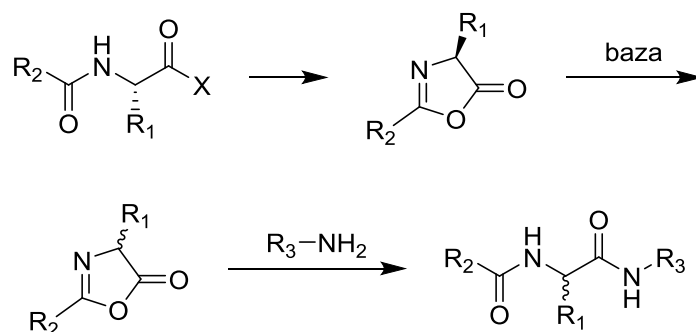
Za tvorbo prve amidne vezi smo se primarno želeli izogniti ostrim reakcijskim pogojem, pri katerih bi lahko prišlo do racemizacije α ogljika na L-tirozinu in s tem izgube optične čistote. Možnosti za tvorbo amidne vezi je veliko, praktično vse pa vključujejo aktivacijo karboksilne kisline v reaktivnejši derivat, ki nato reagira z amino skupino. Najpogostejši načini aktivacije so preko acil halidov, acil azidov, acil imidazolov, anhidridov ter estrov [33]. Najenostavnejša in najbolj ekonomična možnost bi bila *in situ* pretvorba spojine **9** v kislinski klorid, ki bi bil nato dovolj reaktiven za reakcijo z metil 3-aminobenzoatom. Težava pri uporabi kislinskih kloridov pa je prav njihova visoka reaktivnost in posledična možnost stranskih reakcij (racemizacije, hidrolize, odščite in različne druge reakcije, npr. v našem primeru aciliranje fenolne OH skupino, ki je sicer slabši nukleofil od aromatske amino skupine). Eden izmed poglobitnih razlogov za tvorbo stranskih produktov je sproš-

čanje HCl pri reakciji, kar zahteva prisotnost baze za nevtralizacijo reakcijske zmesi. Kombinacija visoke reaktivnosti kislinskega klorida in baze lahko v vodnem mediju vodi do hidrolize kislinskega klorida, pri uporabi organske baze v nevodnem mediju pa preko odcepa protona na α mestu in tvorbe prav tako reaktivnega ketenskega intermedata sicer tvorimo želeno amidno vez, a pri tem pride do racemizacije, saj nukleofilni napad amina na keten in vezava protona potekata nestereoselektivno (slika 11) [34].



Slika 11: Možni mehanizem racemizacije na α mestu pri uporabi kislinskih kloridov. V drugi stopnji lahko amski nukleofil napade planarno ketensko skupino tako z zgornje kot s spodnje strani, kar vodi v izgubo optične čistote. Prirejeno po [34].

Da bi se temu izognili, smo se odločili za uporabo sklopitvenih reagentov, s katerimi *in situ* pretvorimo karboksilno kislino do aktiviranega estra, ki nato reagira z aminom [35]. Odločili smo se za uporabo sklopitvenega reagenta DCC (dicikloheksilkarbodiimid) in pomožnega nukleofila/katalizatorja HOBt (1-hidroksibenzotriazol). Tudi za karbodiimide je značilno, da so zelo reaktivni in zato lahko tudi pri njih pride do stranskih reakcij (npr. tvorbe gvanidinskega derivata, *N*-acil sečnine) in racemizacije izhodnih spojin. Pri racemizaciji lahko preko ciklizacije in tvorbe oksazolonskega intermedata sodeluje tudi zaščitena amino skupino, zato je bilo zelo pomembno, da smo izbrali Boc zaščitno skupino, saj je karbonilni kisik zaradi prisotnosti elektronegativnega kisikovega atoma manj nukleofilen (slika 12) [35].



Slika 12: Možni mehanizem racemizacije na α mestu pri aktivaciji karboksilne kisline ob prisotnosti acilamino skupine. Če je R_2 substituent kisikov atom, je ta reakcija manj verjetna. Prirejeno po [35].

Z uporabo pomožnega nukleofila HOBt pa pretvorimo iz DCC in karboksilne kisline nastalo O-acilsečnino v aktiviran ester med karboksilno kislino in HOBt, ki pa ni tako reaktiven, zato lahko dosežemo boljšo selektivnost reakcije z zmanjšanjem tvorbe stranskih produktov in večjo ohranitev kiralne čistote [35]. Manjša težava pri reakciji se je izkazala v zelo počasni tvorbi aktiviranega estera in posledično tudi produkta, saj smo tudi po celodnevem poteku reakcije z uporabo tankoplastne kromatografije še vedno zaznali prisotnost obeh izhodnih spojin v kar veliki meri. Druga težava, ki se je pojavila pri uporabi sklopitvenih reagentov v splošnem, pa je potreba po uporabi kolonske kromatografije pri izolaciji produkta. Poleg omenjene prisotnosti nezreagiranih izhodnih spojin smo s TLC zaznali tudi nekatere ostale spojine, za katere smo predpostavili, da gre za nezreagiran aktiviran ester in razne stranske produkte. Prav tako pa je produkt reakcij z DCC dicikloheksilsečnina, ki jo zaradi slabe topnosti tako v vodi kot tudi v organskih topilih navadno težko povsem odstranimo samo z ekstrakcijo in/ali kristalizacijo [35]. Z namenom olajšanja izolacije smo se zato pri nadaljnjih reakcijah namesto DCC odločili za uporabo sklopitvenega reagenta EDC. Le-ta ima v stranski verigi terciarno aminske skupino, zato lahko prebitni reagent in nastalo sečnino zaradi bazičnih lastnosti odstranimo z ekstrakcijo v kislno vodno fazo [35].

6.1.3 Odščita Boc zaščitne skupine

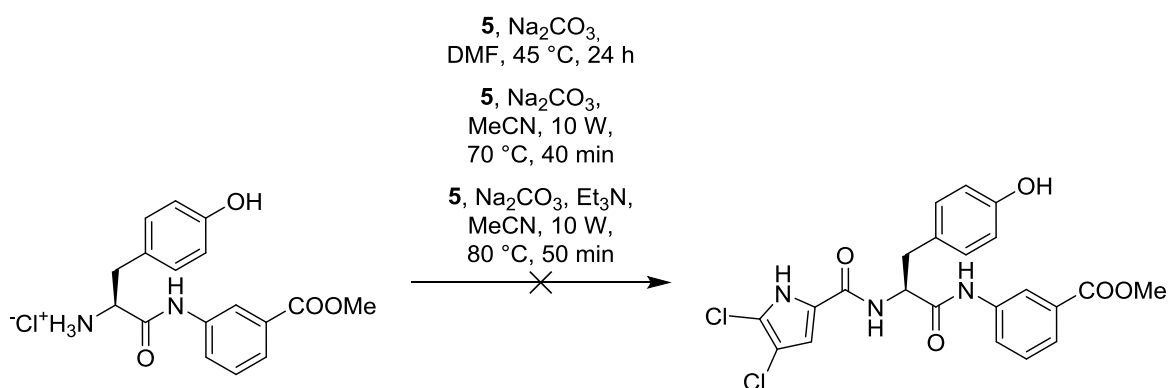
Boc zaščitno skupino na intermediatu **9** smo nato odstranili z acidolizo. Poskusili smo tako postopka z uporabo plinastega HCl v THF pri 0 °C kot tudi uporabo trifluoroocetne kisline v diklorometanu pri sobni temperaturi. Za primernejši postopek se je izkazal prvi, saj je reakcija potekla hitreje (30 min napram 2,5 ure), enostavnejša pa je bila tudi izolacija, saj

smo reakcijski zmesi le dodali Et₂O, da so izpadli kristali produkta. V primeru uporabe trifluoroocetne kisline se tovrsten način izolacije ni izkazal za uspešnega niti pri poskusu kristalizacije v zmrzovalniku, zato smo morali najprej pod nižanim tlakom upariti topilo in nato oljnati produkt spirati z Et₂O, da smo dobili trden produkt. Po drugi strani pa je prednost drugega postopka v tvorbi trifluoroacetatne soli amina, ki se je izkazala za manj higroskopsko kot sol amina s klorovodikovo kislino, kar bi nam nekoliko olajšalo rokovanje z intermediatom.

6.1.4 Tvorba amidne vezi s heterocikličnimi gradniki

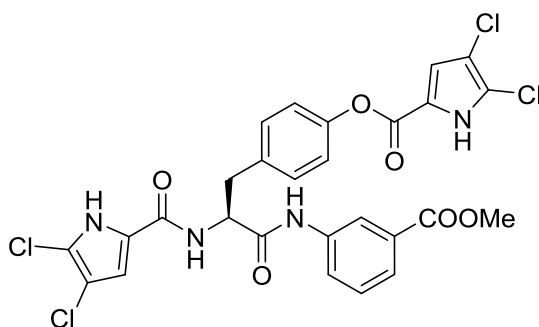
Amidno vez med intermediatom **10** in ustreznimi heterocikličnim gradniki – štirimi sintetiziranimi in dvema kupljenima – smo pripravili na dva različna načina. Z vsemi sintetiziranimi gradniki smo najprej poskusili tvoriti amid direktno iz trikloroacetilne funkcionalne skupine, kar je ponovno analogno drugi stopnji haloformske reakcije, le da je tokrat vlogo nukleofila namesto hidroksilnega iona igrala amino skupina spojine **10**. Tu smo zaradi nevtralizacije soli amina reakcijski zmesi dodali bazo. Glede na reakcijski mehanizem, kjer prisotnost baze ni potrebna za potek reakcije, smo sklepali, da bo dovolj le en ekvivalent, kar se je pokazalo za resnično. Reakcijo z obema nitro derivatoma **3a** in **3b** smo izvedli kar z zmesjo obeh izomerov in nato s kromatografsko ločbo šele po tvorbi amidne vezi izolirali oba produkta. Reakcija je z obema nitro spojinama potekala zelo dobro, saj glede na TLC izhodnih spojin pred izolacijo praktično ni bilo več prisotnih v reakcijski zmesi. K navedenima izkoristkoma je tu zato botrovalo predvsem dejstvo, da nam s kolonsko kromatografijo obeh izomerov ni uspelo ločiti povsem v celoti. Nekoliko slabše je reakcija potekala z dibromo derivatom **4**, kjer smo sicer uspeli pripraviti in izolirati željen produkt, vendar z zelo nizkim izkoristkom, obe izhodni spojini pa sta bili prisotni v nekoliko večji količini. Še slabše pa je tvorba amidne vezi na omenjen način potekala z dikloro derivatom **5** (slika 8). Pri enakih reakcijskih pogojih nam v prvem poskusu ni uspelo izolirati produkta **11f**, v drugem poskusu pa le 5 mg (izkoristek 2,8 %). Izhodni spojini sta bili še vedno prisotni v večini (spojino **10** smo sicer odstranili pri ekstrakciji), stranskih produktov (ostalih lis na TLC) pa je bilo razmeroma malo, kar kaže na to, da je dikloro derivat mnogo manj reaktiven od ostalih analogov. Naša naslednja ideja je bila poizkusiti reakcijo v mikrovalovnem reaktorju v acetonitrilu kot topilu, a sta bili tudi v tem primeru po končani reakciji v zmesi prisotni le izhodni spojini. Tudi ponovitev reakcije z večjo količino baze (2,5 ekvivalenta Na₂CO₃) ni prinesla izboljšanja v poteku reakcije. Posumili smo, da je morda težava v top-

nosti Na_2CO_3 v acetonitrilu, in da je amin še vedno prisoten v obliki soli, kar mu zaradi protoniranega prostega elektronskega para na dušikovem atomu močno zmanjša nukleofilnost. Poleg Na_2CO_3 smo zato poskusili reakcijo še z nekaj kapljicami trietilamina v acetonitrilu pri nekoliko ostrejših pogojih. Večina izhodnih spojin je v tem primeru zreagirala in opazili smo pojav nove lise na TLC, a po izolaciji se je izkazalo, da omenjena spojina ni ustrežna, njene identitete pa sprva z uporabo NMR spektroskopije nismo uspeli določiti.



Slika 13: Neuspešni poskusi tvorbe amidne vezi med spojinama **10** in **5**.

Tvorbe amidne vezi z dikloro derivatom smo se zato lotili po drugi poti, in sicer tako, da smo trikloroacetilno skupino najprej pretvorili v karboksilno skupino ter nato poskusili pripraviti želeno spojino iz spojine **7** z uporabo sklopitvenega reagenta. Ta način se je izkazal za najboljšega, saj smo uspeli izolirati pravo spojino v zadostni količini. Z namenom enostavnejše izolacije produkta smo uporabili EDC, a je kljub temu postopek zaradi prisotnosti različnih stranskih produktov vključeval kolonsko kromatografijo. Po primerjavi NMR spektrov spojine **11f** in produkta zadnje reakcije z mikrovalovi smo predpostavili, da je pri slednjem sicer uspešno potekla tvorba amidne vezi, a je s pirolnim gradnikom reagirala tudi fenolna OH skupina, tako da smo dobili na tirozinskem fragmentu ester z dikloropirolnim gradnikom. Hipotezo smo preverili tako, da smo spojino izpostavili kar tipičnim reakcijskim pogojem za hidrolizo metilnih estrov. Predvidevali smo, da se bo pri danih pogojih hidroliziral poleg metilnega tudi fenolni ester. Naša hipoteza se je izkazala za pravilno, saj smo tudi v tem primeru kot produkt dobili spojino **12f**.



Slika 14: Predvidena struktura glavnega produkta reakcije v mikrovalovnem reaktorju ob prisotnosti Na_2CO_3 in Et_3N .

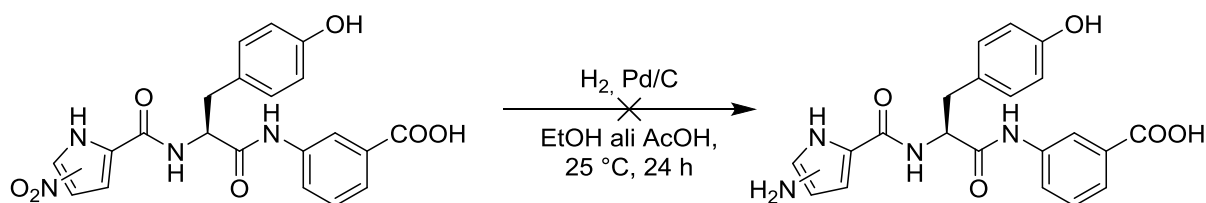
Iz danih rezultatov lahko sklepamo, da različna substitucija pirola ključno vpliva na reaktivnost trikloroacetilne skupine. Prisotnost elektronprivlačnih skupin, kot je nitro skupina, ki ima negativni induktivni in negativni resonančni efekt, preko večje odtegnitve elektronov s karbonilnega ogljika poveča njegovo elektrofilitnost in s tem dovzetnost za nukleofilni napad. Prisotnost halogenov, ki imajo negativen induktivni in pozitiven resonančni efekt zmanjša reaktivnost karbonilnega ogljika v reakcijah z nukleofili. Vpliv klorovih atomov je pri tem bolj izražen kot pa vpliv bromovih atomov, kar bi lahko razložili z močnejšim pozitivnim resonančnim efektom klorovih atomov. Klorovi atomi imajo sicer tudi močnejše izražen negativni induktivni efekt, a je ta zaradi oddaljenosti 3 atomov od karbonilnega ogljika verjetno izražen v manjši meri, tako da zaradi popolne konjugacije prevlada resonančni efekt [29]. Aktivacijska energija za tvorbo ustreznega tetraedričnega intermedata po nukleofilnem napadu amino skupine na spojino **5** je zato presežena šele pri zelo visoki temperaturi, kjer pa reakcija postane neselektivna, saj je dovolj močan nukleofil pri teh pogojih tudi fenolna OH skupina. Razlog za to bi lahko bila tudi količina dodane baze, saj je poleg trietilamina v reakcijski zmesi prisotnih še 3,5 ekvivalenta Na_2CO_3 . Preveč bazičen medij bi lahko preko tvorbe fenolatnega aniona iz sicer šibke kisle fenolne OH skupine ojačal nukleofilnost le-te, kar bi povečalo kompetitivnost pri reakciji. Pri pretvorbi do karboksilne kisline in uporabi sklopitvenega reagenta pa zaradi velike reaktivnosti EDC in nastalih O-acil sečnine in estrskega intermedata s HOBt razlike v substituiranosti pirolovega obroča niso več bistvenega pomena, ampak postane potek reakcije odvisen predvsem od reaktivnosti nukleofila.

V reakcijah s kupljenima gradnikoma indol-2-karboksilno kislino in indazol-3-karboksilno kislino smo prav tako tvorili amidno vez z uporabo EDC/HOBt. V primeru sinteze spojine

11d je bilo produkt možno očistiti tudi brez uporabe kolonske kromatografije, saj je TLC analiza že po ekstrakciji pokazala, da je produkt skoraj povsem čist, dodatno pa smo ga nato očistili še s prekristalizacijo.

6.1.5 Poskus sinteze aminopirolnih derivatov

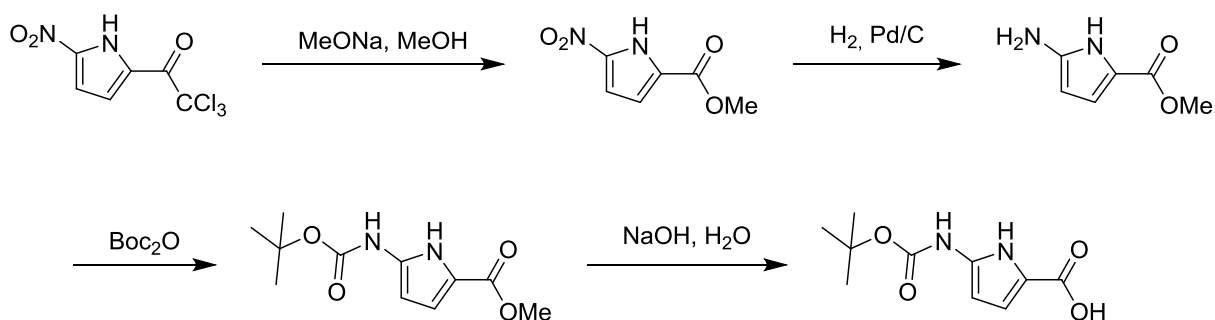
Obe končni spojini z nitro skupino (**12a** in **12b**) smo želeli z redukcijo pretvoriti tudi do ustreznih aminopirolnih derivatov. Pri tem smo se poslužili katalitskega hidrogeniranja v H₂ atmosferi z uporabo Pd na aktiviranem oglju kot katalizatorja. Spojini **12a** in **12b** smo poskusili reducirati tako v etanolu kot tudi v očetni kislini, a smo bili v vseh primerih neuspešni, saj nam želenih spojin ni uspelo izolirati, čeprav je TLC analiza reakcijskih zmesi pokazala izginotje izhodnega materiala. Sodeč po NMR spektrih izoliranih produktov po filtraciji katalizatorja in uparevanju reakcijskega topila smo dobili kompleksno zmes različnih produktov (slika 10).



Slika 15: Neuspešni poskusi priprave aminopirolovihih derivatov.

Za pripravo ustreznih končnih spojin bi zato veljalo poskusiti z drugačnim pristopom, npr. s poskusom redukcije končnih metilnih estrov **11a** in **11b**. Ena izmed možnih razlag za slab potek reakcije bi lahko bila ta, da sta oba želena produkta sicer nastala pri reakciji, a sta bila zaradi prisotnosti tako kisle karboksilne skupine kot šibko bazične amino skupine slabo topna v topilu in sta se oborila oz. se celo adsorbirala na aktivno oglje. Ker je postopek izolacije vključeval filtracijo, smo zato morda oba produkta izgubili na tej stopnji, v filtratu pa so se nahajali le različni stranski produkti.

Druga možnost, na katero smo sicer pomislili že na začetku našega dela, pa bi bila redukcija nitro skupine pri osnovnem nitropirolnem gradniku, a bi nastalo amino skupino morali nato zaščititi (npr. z Boc zaščitno skupino) in nato po tvorbi amidne vezi še odščititi (slika 11).



Slika 16: Možen postopek priprave aminopirrolskih gradnikov. Analogen postopek bi lahko uporabili tudi za 4-nitro derivat oz. za zmes obeh izomerov. Prirejeno po [31].

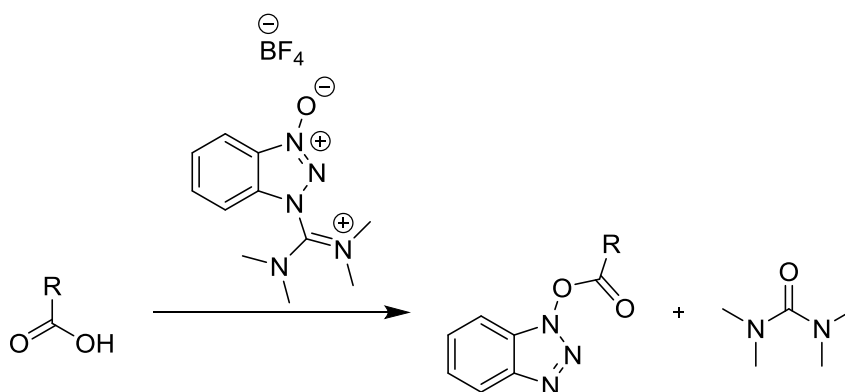
Žal se zaradi pomanjkanja časa nismo lotili nobenega od omenjenih pristopov, vendar bi bilo v prihodnje zaradi testiranja biološke aktivnosti smiselno pripraviti tudi tovrstne spojine.

6.1.6 Tvorba amidne vezi med 4,5-dibromopirrolnim gradnikom in različnimi aminokislinami

Reakcije za pripravo druge serije spojin lahko v grobem razdelimo na štiri skupine – zaščito karboksilnih skupin bifunkcionalnih gradnikov (aminokislin in derivatov benzojske kisline), tvorbo prve amidne vezi med dibromopirrolnim gradnikom in aminokislinskim gradnikom, tvorbo druge amidne vezi z derivatom benzojske kisline in hidrolizo estrov po obeh tvorbah amidne vezi. Vrstni red medsebojnega povezovanja gradnikov je bil tako ravno obraten kot pri sintezi prve serije spojin.

Tvorbe amidne vezi med pirrolnim gradnikom in aminokislinskim gradnikom smo se tudi tokrat lotili na dva načina – direktno preko trikloroacetilnega derivata in preko karboksilne kisline z uporabo sklopitvenih reagentov. Kljub razmeroma uspešni direktni reakciji z dibromopirrolnim derivatom pri prvi seriji spojin, smo se tokrat zaradi morebitnega izboljšanja izkoristka odločili najprej poizkusiti izvesti reakcijo preko karboksilne kisline. Z L-nitrotirozinskim derivatom je reakcija z uporabo EDC/HOBt potekla brez večjih težav, več težav smo imeli pri reakcijah z L-valinskim, 4-hidroksi-L-prolinskim in DL-tirozinskim gradnikom, kjer reakcija tudi po več dneh mešanja na sobni temperaturi in dodatkih EDC ni potekla do konca, saj so bile na TLC ploščici še vedno vidne lise tako izhodnih spojin kot tudi (predvsem) aktiviranega estra s HOBt. Reakcijo smo uspeli pospešiti šele s segrevanjem reakcijske zmesi na 75 °C čez noč, kar pa se kljub dejstvu, da je ves izhodni mate-

rial na ta način zreagiraj, ni izkazalo za dobro odločitev, saj se je pri tem selektivnost reakcije močno zmanjšala, kar je vodilo v veliko število stranskih produktov. Ena izmed možnih razlag za dano obnašanje reakcijske zmesi bi lahko tičala v manjši nukleofilnosti amino skupine zaradi prisotnosti elektronprivlačne estrske skupine. Pri sintezi prve serije spojin je bila na intermediatu **10** namesto estrske skupine prisotna amidna skupina. Zaradi večje elektronegativnosti kisikovega atoma ($\chi = 3,50$) napram dušikovem ($\chi = 3,07$), je estrska skupina bolj elektronprivlačna in ima zato večji vpliv na reaktivnost amino skupine [36]. Ker je kljub dodajanju EDC (dodali smo tudi po cel dodaten ekvivalent) v reakcijsko zmes izhodna karboksilna kislina še vedno ostala prisotna v reakcijski zmesi, smo sklepali, da tiči težava tudi v sami aktivaciji karboksilne kisline. Predvidevali smo, da je aromatske karboksilne kisline težje aktivirati z uporabljenim reagentom kot pa alifatske (težav pri aktivaciji spojine **9** namreč nismo imeli), zato smo se odločili, da bomo poskusili reakcijo izvesti z drugim sklopitvenim reagentom. Odločili smo se za TBTU, ki v svoji strukturi ne vsebuje karbodiimidne skupine, ampak gre za direktno sklopljen HOBt s tetrametilsečnin-skim fragmentom (slika 12).

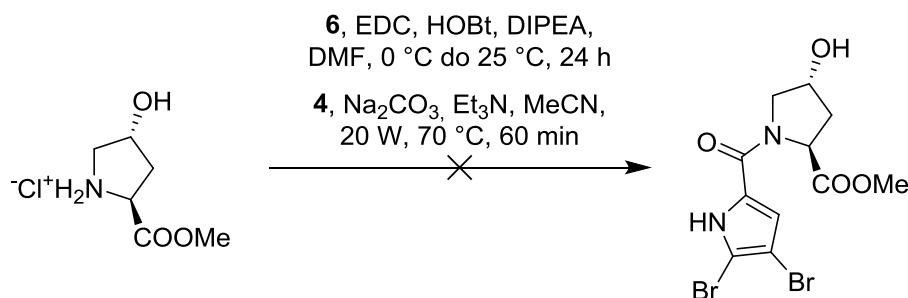


Slika 17: Shema aktivacije karboksilne kisline s TBTU. Struktura aktiviranega estra je identična tistemu ob uporabi HOBt kot pomožnega nukleofila. Prirejeno po [33].

Dodatna prednost TBTU je tudi v tem, da je bilo pri delu drugih diplomantov v laboratoriju preizkušeno, da reakcija poteka ugodno tudi ob uporabi etilacetata kot topila. Le to nam precej olajša izolacijo produkta, saj smo etil acetat uporabljali tudi kot organsko fazo pri ekstrakciji. Težava pri uporabi DMF je namreč v tem, da zaradi visoke polarnosti moti ekstrakcijo, saj se dobro topi tako v organski kot v vodni fazi, kar lahko vpliva na porazdelitev spojin med obe fazi. Pred ekstrakcijo je zato DMF vedno potrebno čim bolj upariti pod znižanim tlakom, kar pa je zaradi njegovega visokega vrelišča (153 °C) precej zamu-

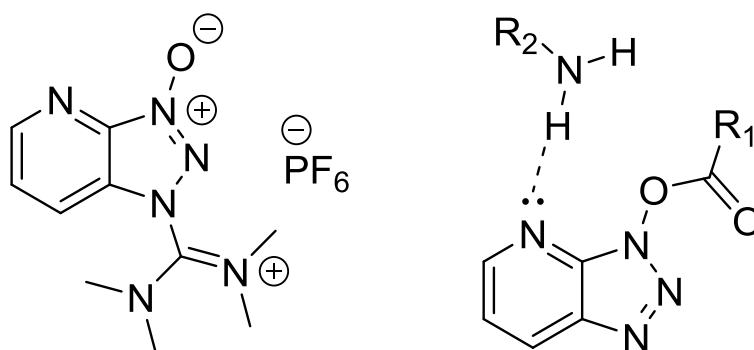
den proces [37]. Z uporabo TBTU smo nato brez večjih težav uspeli pripraviti intermedata **16a** in **16b** – aktivacija karboksilne kisline je bila tokrat mnogo hitrejša in popolnejša, poleg produkta pa nam je uspelo izolirati še manjšo količino aktiviranega estra, kar dodatno potrjuje dejstvo, da nukleofilnost amino skupine pri metilnih estrih aminokislin ni tako visoka, da bi aminoliza aktiviranih estrov potekla popolnoma. Kljub temu smo se odločili, da bomo pri tvorbi druge amidne vezi uporabili TBTU, saj je reakcija še vedno potekla v mnogo večjem obsegu kot z uporabo EDC/HOBt, mnogo boljše pa je bila tudi selektivnost, saj je bilo ostalih stranskih produktov zelo malo in smo jih brez težav odstranili z uporabo kolonske kromatografije.

Edina reakcija, pri kateri pa nam žal ni uspelo izolirati zelenega produkta, je bila tvorba amidne vezi z metilnim estrom 4-hidroksi-L-prolina. Kljub popolnem izginotju izhodne karboksilne kisline, smo uspeli izolirati le aktivirani ester s HOBt, kar je bila tudi najmočnejša lisa na TLC. Iz tega smo sklepali, da je nukleofilnost amino skupine v prolinskem derivatu prenizka, da bi lahko prišlo do aminolize aktiviranega estra in s tem tvorbe amidne vezi. Vzrok za to bi lahko bile predvsem sterične lastnosti spojine. Večja sterična oviranost nukleofila, ki je pri sekundarnih aminih večja kot pri primarnih, bi lahko onemogočala zadosten dostop nukleofila do karboksilnega ogljika v aktiviranem estru in s tem tvorbe tetraedričnega intermedata. Odločili smo se, da reakcije ne bomo ponovili s TBTU, saj smo predvidevali, da počasna aktivacija tu ni ključni problem, ampak da bomo poskusili izvesti reakcijo neposredno s trikloroacetilnim derivatom z mikrovalovi, saj bi pri višji temperaturi lahko reaktantom dovedli dovolj energije, da bi kljub steričnim oviram nukleofila reakcija lahko potekla. Reakcijo smo izvajali z dodatkom enega ekvivalenta Na_2CO_3 in Et_3N v acetonitrilu 20 min pri $70\text{ }^\circ\text{C}$ v mikrovalovnem reaktorju. Sodeč po TLC analizi je zreagirale le majhen delež izhodne spojine, a obenem precej neselektivno, saj se je pojavilo večje število novih lis. Reakcijo smo ponovili pri enakih pogojih, le da smo jo izvajali 60 min. Tokrat je zreagirale praktično ves izhodni material, novonastalim lisam pa se je intenziteta povečala precej enakomerno, številne izmed njih pa so na zraku hitro potemnele. Podobno kot pri poskusu priprave **11f** z mikrovalovi je možno, da je bila ena izmed težav prisotnost sterično manj ovirane hidroksilne skupine kot kompetitivnega nukleofila pri visokih temperaturah. Produkta tako tudi v tem primeru nismo uspeli izolirati (slika 13).



Slika 18: Neuspela poskusa tvorbe amine vezi s prolinskim derivatom.

Možni alternativni, ki se lahko uporabljata pri tvorbi amidnih vezi z aminokislinami s sterično ovirano amino skupino, bi bili aktivacija karboksilne kisline v obliki kislinskega fluorida ter uporaba »coupling reagenta« HATU. S kislinskimi fluorida, ki so stabilnejši od svojih kloridnih analogov in mnogo manj nagnjeni k racemizaciji, lahko aktiviramo karboksilno kislino v obliki mnogo manjše molekule, kot je aktivirani ester s HOBT, zato reakcija s sterično oviranimi nukleofili poteče lažje. Učinkovitost HATU leži predvsem v enostavnejši tvorbi tetraedričnega prehodnega stanja zaradi interakcije aminskega nukleofila in dušikovega atoma na mestu 7 preko tvorbe vodikove vezi (slika 14) [38], [39].



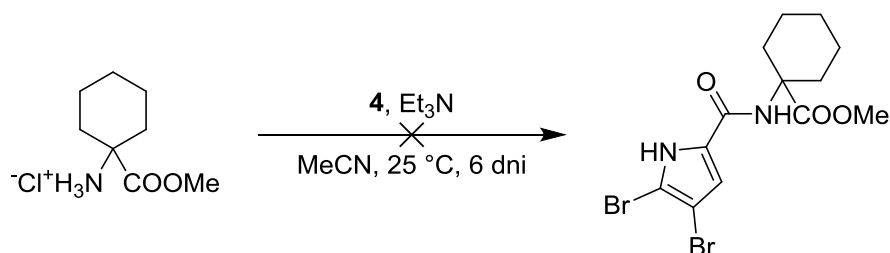
Slika 19: Struktura HATU in prikaz vloge 7-aza strukturnega fragmenta pri aminolizi aktiviranega estera. Prirejeno po [39].

Ker bi tvorba amidne vezi s prolinskim derivatom zahtevala temeljito nadaljnjo optimizacijo, smo se jo zaradi časovne stiske odločili opustiti.

Zaradi porabe celotne količine gradnika **6**, smo se odločili, da bomo tvorbo amidne vezi z obema fenilalaninskima derivatom poskusili kar direktno iz trikloroacetilnega derivata na sobni temperaturi, saj nas je obenem tudi zanimalo, kako poteka reakcija pri tovrstnih pogojih. Predvidevali smo, da bi ob dovolj dolgem poteku (vsaj 2 dni) le-ta lahko potekla

zelo selektivno in dovolj kvantitativno tudi pri tako milih pogojih. Reakcijo smo pustili mešati 3 dni v argonovi atmosferi in nato izolirali želen produkt **16c** s 70 % izkoristkom. Stranskih produktov pri reakciji je bilo zanemarljivo malo, čiščenje s kolonsko kromatografijo je bilo potrebno izključno za odstranitev nezreagirane izhodnega pirolovega gradnika. V primeru, da smo reakcijsko zmes pustili mešati na sobni temperaturi 4 dni, smo izolirali produkt s kar 80 % izkoristkom (**16d**). Le-to kaže na dejstvo, da je trikloroacetilni derivat dibromopirola za reakcije s sterično neoviranimi primarnimi amini dovolj reaktiven.

Zaradi dobrih rezultatov pri neposredni tvorbi amidne vezi smo poskusili pripraviti tudi intermediat med dibromopirolnim gradnikom in metil 1-aminocikloheksan-1-karboksilat. Kljub temu, da vsebuje spojina primarno amino skupino, smo zaradi sterične oviranosti predvidevali, da bi reakcija lahko povzročala težave. Reakcijsko zmes smo pustili mešati na sobni temperaturi kar 6 dni, a kljub temu je bila sodeč po TLC analizi, še vedno večinoma prisotna le izhodna spojina, za edino ostalo liso, ki smo jo uspeli izolirati, pa smo z NMR spektroskopijo ugotovili, da ne gre za želen produkt (slika 15).



Slika 20: Neuspeli poskus tvorbe amidne vezi z metil 1-aminocikloheksan-1-karboksilat.

Ob ustreznem povišanju temperature (npr. na 45 °C kot uporabili pri sintezi prve serije spojin) predvidevamo, da bi reakcija najverjetneje potekala precej bolje. Prav tako pa bi verjetno pri rahlo povišani temperaturi tudi obe reakciji s fenilalaninskima gradnikoma potekli v zadovoljivem obsegu že po 1 dnevu. Zaradi časovne stiske žal tega nismo uspeli preveriti.

6.1.7 Tvorbe amidne vezi z derivatoma benzojske kisline

Pri tvorbi druge amidne vezi smo uporabili TBTU, saj se je izmed vseh uporabljenih sklopitvenih reagentov pri predhodni uporabi izkazal za najboljšega tako zaradi hitre in popol-

ne aktivacije karboksilne kisline kot tudi zaradi nizke tvorbe stranskih produktov. Tudi pri tvorbi druge amidne vezi je tvorba aktiviranega estra navadno potekla v celoti, pri čemer pa je vseeno potekala počasneje kot pri tvorbi prve amidne vezi, saj smo v večini primerov s tankoplastno kromatografijo tudi po enem dnevu poteka reakcije še vedno zaznali prisotnost karboksilne kisline. Pri nekaterih reakcijah je le-ta po dodatku še 0,3 ekvivalenta TBTU nato naslednji dan popolnoma zreagirala, v določenih primerih, med drugim npr. pri tvorbi **17b** in **18b**, pa je manjša količina še vedno ostala nezreagirana. Razlog za počasnejšo tvorbo aktiviranega estra bi lahko tičal v večji sterični oviranosti intermediatov **15a-e** napram spojini **6**. Izrazit primer tega bi bila spojina **16b**, ki kot derivat L-valina vsebuje voluminozno izopropilno skupino, kar sodeč po poteku reakcije otežuje tvorbo aktiviranega estra. Podatke o manjši reaktivnosti valinskih derivatov v tovrstnih reakcijah smo našli tudi v literaturi [40]. Druga težava, ki pa se je pojavila pri večini reakcij, je bila razmeroma počasna aminoliza aktiviranega estra z amino derivatom benzojske kisline. S primerjavo TLC ploščic reakcij, pri katerih smo uporabili enak izhodni material, smo lahko prepoznali razmeroma lipofilno liso, ki je pripadala aktiviranemu estru. Intenziteta lise je bila po nekaj urah navadno še precej šibka, kar sovpada z dejstvom, da je aktivacija karboksilne kisline potekala precej počasi, po enem dnevu reakcije pa je bila po intenziteti ta lisa najmočnejša, kar priča o tem, da je tvorba aktiviranega estra vseeno potekala nekoliko hitreje kot pa njegova aminoliza.

Razlogov za tovrstno obnašanje bi bilo lahko več. Prvi potencialen razlog bi tudi tu lahko ležal v steričnih ovirah, saj so bili vsi aktivirani estri razmeroma velike molekule, kjer je bil dostop nukleofila do elektrofilnega ogljikovega atoma zaradi velikih stranskih verig (benzenov obroč oz. izopropilna skupina) zagotovo precej bolj otežen kot pa npr. pri aktiviranih dibromopirolnih derivatih. Reakcijo bi tudi najverjetneje lahko pospešili z uporabo drugačnega sklopitvenega reagenta, npr. preko kislinskega fluorida ali pa z uporabo HATU. Ker smo uporabili tako alifatski kot tudi aromatski amin, ki se v osnovi razlikujeta v svoji nukleofilnosti, smo zato lahko iz primerjave poteka reakcij z enim in drugim ocenili tudi vpliv naraveaminskega nukleofila. Ker smo zaradi delokalizacije prostega elektronskega para v aromatskem obroču predvidevali, da bo nukleofilnost aromatskega amina nižja, smo pri vseh reakcijah z metil 3-aminobenzoatom uporabili 1,33 ekvivalenta amina napram karboksilni kislini, medtem ko je bil pri reakcijah z metil 4-(aminometil)benzoatom uporabljen prebitek amina le 0,1 ekvivalenta. Nekoliko presenetljivo so reakcije z obema aminoma potekale zelo podobno, tudi izkoristki izoliranih produ-

ktov so bili povsem primerljivi, kar nakazuje, da nukleofilnost amina ne igra tu tako pomembne vloge kot sterična oviranost aktiviranega intermedijata. Pomembno vlogo bi predvsem z vidika njegove polarnosti lahko igrala tudi izbira topila. Aminoliza aktiviranega estra poteka preko tetraedričnega prehodnega stanja, katerega tvorbo bi lahko uporaba bolj polarnega topila preko stabilizacije le tega nekoliko olajšala. Izbira etilacetata zato morebiti ni bila najbolj primerna za to reakcijo in bi veljajo reakcijo poskusiti v polarnejšem DMF. Ker smo pomislili, da bi morda tvorba produkta lahko potekla hitreje pri višji temperaturi, smo pri sintezah spojin **17b** in **18b** drugi dan poteka reakcije temperaturo povišali na 55 °C, kar pa ni prineslo želenih rezultatov, saj se je pri višji temperaturi selektivnost reakcije zelo znižala, tako da smo uspeli izolirati le manjšo količino produkta, prisotnih pa je bilo zelo veliko stranskih produktov. Obe reakciji smo zato ponovili po standardnem postopku za tvorbo druge amidne vezi.

6.1.8 Racemizacija in optična čistota

Eden izmed glavnih razlogov za uporabo sklopitvenih reagentov pri tvorbi amidnih vezi je bil prav njihov potek pri milih pogojih, ki omogočajo čim večjo selektivnost reakcij in ohranitev optične čistote izhodnih spojin. Slednjega žal z razpoložljivimi analitskimi metodami nismo uspeli ustrezno preučiti. Optično čistoto lahko izračunamo po naslednji enačbi, kjer je $[\alpha]_{obs}$ izmerjena specifična sučnost, $[\alpha]_{max}$ pa specifična sučnost čistega enantiomera [29]:

$$\text{optična čistota} = \frac{[\alpha]_{obs}}{[\alpha]_{max}} \times 100 \% = \% \text{ enant. } A - \% \text{ enant. } B$$

Čeprav smo sintetiziranim spojinam pomerili specifično sučnost, nam vrednost le-te za posamezno sintetizirano spojino ne pove nič o deležu posameznega enantiomera, saj ne poznamo specifične sučnosti optično čistih spojin. Vrednosti optične sučnosti za derivate DL-tirozina so sicer bile vse blizu 0, kar bi pričakovali za racemno zmes, kjer sta oba enantiomera zastopana v enaki množini in se njuni sučnosti izničita [29]. Po drugi strani pa tudi vrednosti blizu 0 ne pomenijo nujno, da spojina ne bi mogla biti optično povsem čista, le da je specifična sučnost čistih enantiomerov nizka. Prav tako so si bile absolutne vrednosti sučnosti derivatov D- in L-fenilalanina (**16c-d** – **20c-d**) precej podobne, kar bi pomenilo, da so pari spojin med seboj res nasprotni enantiomerne sestave. Da bi natančno določili, kakšna je bila izguba optične čistote pri posameznih reakcijah, bi morali tako kiralne

izhodne spojine kot produkte analizirati npr. s HPLC na kiralno modificirani stacionarni fazi, kjer bi lahko ločili oba posamezna enantiomera in tako iz površin kromatografskih vrhov določili razmerje med obema [41]. Druga možnost pa bi bila, da bi spojine derivatizirali z ustreznimi kiralno čistimi reagenti in tako dobili zmes diastereomerov. Delež posameznega diastereomera bi nato lahko določili z uporabo npr. NMR spektroskopije ali plinske kromatografije [29][42].

6.2. Biološki del

6.2.1 Heterociklični derivati L-tirozina

Tekom magistrskega dela smo pripravili 32 končnih spojin, katerim je bila določena inhibitorna aktivnost na bakterijsko DNA girazo B. Prav tako pa smo inhibitorno aktivnost določili vsem intermediatom iz druge serije spojin, kar pomeni, da smo inhibitorno delovanje določili 42 spojinam. Izmed njih so najboljšim 14 zaviralcem določili tudi protibakterijsko delovanje.

Iz prve serije spojin so inhibitorno delovanje pokazale 3 spojine, oba derivata dibromopiro-la **11c** in **12c** ter kislinski derivat dikloropiro-la **12f**, pri čemer je bil slednji nekoliko manj aktiven kot njegov bromirani analog. Ker je bil metilni ester dibromo derivata manj aktiven kot pripadajoči kislinski derivat, ester dikloro derivata pa ni pokazal vidnega inhibitornega delovanja, vidimo, da je naša hipoteza o pomenu prisotnosti kisline, pri fiziološkem pH negativno nabite karboksilne kisline, pravilna, a kljub temu ne ključna za inhibitorno delovanje teh spojin. Sklepali smo namreč, da bi zaradi tvorbe ionskih interakcij oz. solnih mostičkov med karboksilno kislino in Arg¹³⁶ kislinski derivati izkazali za vsaj en velikostni razred večjo inhibitorno aktivnost napram metilnim estrom, kjer tovrstnih interakcij nismo pričakovali. Predvsem v primeru bromiranih derivatov se to ni izkazalo za povsem resnično, saj je bila razlika v aktivnosti le približno 2,5-kratna. Verjetno pride pri metilnih estrih vseeno do tvorbe vodikovih vezi, ki omogočajo dovolj dobro vezavo tudi teh spojin. Manjšo aktivnost kloriranih derivatov v primerjavi z bromiranimi si lahko razlagamo z manjšo velikostjo klora v primerjavi z bromom, zaradi česar se slednji bolje prilega vezavnemu mestu na encimu. Ostalih 8 spojin ni izkazalo vidnejšega inhibitornega delovanja. Za neaktivnost nitriranih derivatov je verjetno krivo pomanjkanje ugodnih interakcij z vezavnim mestom na pirolnem delu. Predvidevamo, da bi prisotnost amino skupine namesto nitro skupine preko tvorbe dodatnih interakcij z aminokislinskimi preostanki v vezavnem mestu

pozitivno vplivala na aktivnost spojin. Oba derivata indola in indazola pa sta za ugodno vezavo najverjetneje nekoliko prevelika.

Vsem trem aktivnim spojinam ter tudi metilnemu estru dikloro derivata so določili protibakterijsko aktivnost na treh različnih vrstah bakterij, poleg tega pa še na dveh modificiranih sevih *E. coli* *tolC* in *impA*, pri katerih je bodisi zmanjšano črpanje spojin iz bakterijske celice oz. olajšano prehajanje v celice. S primerjavo rezultatov testiranja na teh dveh sevih napram nespremenjenemu sevu smo sklepali, da bomo tako lahko tudi ocenili, kako pomembno vlogo igra aktivno črpanje naših spojin iz bakterijske celice oz. oteženo prehajanje preko celične membrane pri njihovem protibakterijskem delovanju. Spojina **12c**, ki je med spojinami iz prve serije izkazala najboljše encimsko inhibitorno delovanje, sploh ni izkazala protibakterijskega delovanja na vseh treh bakterijskih vrstah. Po drugi strani pa je njen metilni ester **11c** pokazal zelo dobro protibakterijsko delovanje na obeh po Gramu pozitivnih bakterijah z razmeroma nizko minimalno inhibitorno koncentracijo 14 µg/mL. Iz teh rezultatov smo sklepali, da je za protibakterijsko delovanje prisotnost kisle pri fiziološkem pH negativno nabite karboksilne kisline neugodna zaradi slabega prehajanja spojin v bakterijsko celico. Pri metilnemu estru, ki je pri fiziološkem pH nevtralna in bolj nepolarna molekula, pa je pri po Gramu pozitivnih bakterijah prehajanje v bakterijsko celico enostavnejše. Prav tako lahko vidimo, da spojin nista aktivni na obeh modificiranih sevih *E. coli*, iz česar sklepamo, da olajšano prehajanje spojin v bakterijsko celico ne prispeva k izboljšanju njunega protibakterijskega delovanja. Dobro protibakterijsko delovanje na obeh spremenjenih sevih *E. coli* je bilo prisotno tudi pri spojin **11f**, kar nas je nekoliko presenetilo, saj spojina sploh ni izkazala inhibitornega delovanja na DNA girazo B. Iz tega lahko sklepamo, da je pri tej spojin (in morebiti tudi pri ostalih) prisoten še kak drug mehanizem protibakterijskega delovanja. Zanimivo pa je tudi to, da je spojina **12f** prav tako izkazala zelo dobro protibakterijsko delovanje na *S. aureus* in *E. faecalis*, primerljivo spojin **11c**. Možno bi bilo, da je spojina **12f** zaviralec DNA giraze B omenjenih bakterij, a rezultati testiranja na encimih teh bakterij še niso znani.

6.2.2 Aminokislinski derivati 4,5-dibromopirola

Pri drugi seriji spojin smo najprej želeli preveriti, če je prisotnost benzoatnega fragmenta sploh potrebna za inhibitorno delovanje pripravljenih spojin. Ker vseh 10 intermediatov (tako estri kot karboksilne kisline) ni izkazalo inhibitornega delovanja, smo sklepali, da je manjkajoči fragment vseeno potreben za njihovo delovanje. Izmed končnih spojin le dve –

17b in **17c** – nista izkazali nikakršnega inhibitornega delovanja. Najboljše delovanje je izkazala spojina **19a**, derivat racemnega tirozina, z IC_{50} vrednostjo le 0,453 $\mu\text{mol/L}$. Tudi oba tirozinska derivata 3-aminobenzojske kisline, **18a** in **20a**, sta izkazala delovanje v nizkem mikromolarnem območju, pri čemer velja poudariti, da je bila njuna aktivnost za približno faktor 10 boljša od njunih kiralno čistih derivatov L-tirozina (**11c** in **12c**). Iz tega lahko sklepamo, da so derivati D-tirozina aktivnejši enantiomeri (eutomeri), zato bi veljajo v prihodnosti pripraviti oz. izolirati tudi kiralno čiste spojine, saj je njihova predvidena aktivnost še precej višja.

V splošnem so sicer najboljšo inhibitorno aktivnost pokazale spojine z 3-nitro-L-tirozinskim fragmentom, saj sta derivata 4-aminometilbenzojske kisline izkazala delovanje v nanomolarnem, derivata 3-aminobenzojske kisline pa v nizkem mikromolarnem območju. Ker bistvenih razlik v aktivnosti obeh estrov ter karboksilnih kislin ni bilo, sklepamo, da je za aktivnost ključen predvsem nitrotirozinski fragment. Prisotnost nitro skupine na orto mestu glede na fenolno OH skupino poveča kislost slednje za približno 1000-krat (pK_a (nitrotirozin) = 7,3; pK_a (tirozin) = 10,3), kar pomeni, da je le ta pri fiziološkem pH v več kot 50 % prisotna v deprotonirani obliki [43]. Dobro inhibitorno delovanje bi lahko zato razložili s tvorbo ionskih interakcij fenolatnega aniona z različnimi aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu. Sodeč po inhibitornih aktivnostih derivatov racemnega tirozina bi bilo smiselno v prihodnosti pripraviti tudi derivate 3-nitro-D-tirozina.

Za razliko od derivatov tirozina pa pri derivatih fenilalanina vidimo, da so večinoma bolj aktivni L-enantiomeri, kar nas je nekoliko presenetilo. Prav tako vidimo, da so aktivnejši derivati 4-aminometilbenzojske kisline, aktivnost pa poveča tudi prisotnost karboksilne kisline namesto metilnega estra. Edina spojina, ki ne ustreza tem opažanjem, je **20d**, katere IC_{50} je kar 41,1 $\mu\text{mol/L}$, čeprav bi pričakovali, da bo spojina aktivnejša tako od svojega enantiomera **20c**, kot tudi od 4-(aminometil)benzojskega analoga **19d**, katerega IC_{50} je že v nanomolarnem območju (0,83 $\mu\text{mol/L}$). Možno je, da je prišlo do napake v določanju vrednosti IC_{50} , zato bi bilo določitev zaviralne aktivnosti smiselno ponoviti. Sodeč po dejstvu, da spojine tudi brez prisotne OH skupine še vedno izkazujejo dobro zaviralno delovanje, le ta očitno ni nujno potrebna za aktivnost spojin.

Za najslabše aktivne spojine so se izkazali derivati L-valina, čeprav sta obe spojini s prostimi karboksilnimi kislinami izkazali solidno inhibitorno delovanje z IC_{50} okrog 20 $\mu\text{mol/L}$. Prisotnost lipofilne, a v primerjavi z aromatskim obročem manjše izopropilne skupine na aminokislinskem preostanku, je verjetno kriva za slabšo vezavo spojin v aktiv-

no mesto, zato predvidevamo, da bi morda boljši učinek dosegli npr. z nekoliko večjim fragmentom (npr. z uporabo L-levcina ali L-izolevcina). Ena izmed razlag pa bi tudi bila, da je za ojačanje aktivnosti ključna prisotnost aromatskega obroča preko ustreznih π - π in kation- π interakcij z aminokislinskimi preostanki v vezavnem mestu.

Rezultati protibakterijskih testiranj za drugo serijo spojin še niso znani.

6.2.3 Odnos med strukturo in delovanjem

Ključne ugotovitve, ki smo jih pridobili s sintezo in vrednotenjem zaviralne aktivnosti naših spojin so naslednje:

- Substituenti na pirolnem fragmentu močno vplivajo na vezavo spojin, saj so spojine s prevelikimi fragmenti oz. takšnimi substituenti, ki ne tvorijo ustreznih interakcij z vezavnim mestom, neaktivne.
- Prisotnost benzojske kisline oz. njenega metilnega estra je prav tako potrebna za delovanje spojin, saj so intermediati brez teh fragmentov neaktivni. V odvisnosti od aminokislinskega fragmenta so bolj aktivni bodisi kislinski derivati, bodisi je aktivnost kislin in estrov primerljiva.
- S substitucijo na aminokislinskem fragmentu lahko vplivamo na jakost vezave spojin, pri čemer najboljše delovanje izkazujeta DL-tirozinski in 3-nitro-L-tirozinski fragment. Derivati L-fenilalanina so aktivnejši kot njihovi D- analogi, medtem ko je pri tirozinu trend ravno obraten. Prisotnost alifatske stranske verige zmanjša aktivnost spojin.

Sodeč po tem je iz danih rezultatov težko nedvoumno določiti odnos med strukturo in delovanjem spojin (SAR). Obstaja tudi verjetnost, da se spojine vežejo v aktivno mesto na različne načine, kar bi verjetno bilo odvisno predvsem od tega, kakšen je njihov aminokislinski fragment. Izboljšano aktivnost DL-tirozina napram L- analogu bi lahko razložili npr. prav s tem, da bi se fenolni del vezal v adeninski žep, pirolamidni del pa v fosfatni žep, kar bi bilo morebiti za aktivnost lahko celo ugodneje. Možnost različne vezave spojin nam je potrdilo tudi molekulska sidranje spojin v aktivno mesto encima s programom Discovery Studio, pri katerem smo za različne spojine dobili zelo različne načine vezave v aktivno mesto. Nadaljnja optimizacija spojin bi zato morala slediti cilju, da bi bila struktura spojin čim bolj rigidna, da bi tako omejili možnost različnih načinov vezave in tako poskusili izluščiti najugodnejšo prostorsko razporeditev posameznih gradnikov. Čeprav smo z metodo SPR potrdili, da je vezava spojine **11c** na DNA girazo B specifična, pri čemer je bila

določena tudi K_d vrednost, nas možnost različnih načinov vezave vseeno navdaja z določeno mero skeptičnosti, da bi spojine lahko izkazale neselektivno vezavo na druge tarče tako v bakterijskih kot tudi v sesalskih celicah. Le-to pa bi bilo z vidika selektivne toksičnosti, ki je pri razvoju novih protibakterijskih učinkovin ključnega pomena, skrb vzbujajoče dejstvo.

7. Sklep

Tekom magistrskega dela smo z modifikacijo strukture morskega alkaloida oroidina načrtovali in sintetizirali 32 končnih spojin in ovrednotili njihovo zaviralno aktivnost na *E. coli* DNA girazo B. Pri načrtovanju smo se opirali na ključne strukturne fragmente nekaterih znanih zaviralcev encima, prav tako pa smo preučili tudi kristalne strukture DNA giraze B z vezanim nativnim ligandom in nekaterimi zaviralci.

Sintezo spojin smo z namenom izbire najbolj optimalne strukture tako pirolamidnega fragmenta kot tudi aminokislinskega fragmenta razdelili na dve seriji. Pri sintezi spojin smo se spoznali s pretvorbami pirola, zaščitnimi skupinami za amino in karboksilno skupino ter tvorbo amidne vezi z uporabo sklopitvenih reagentov. Kljub številnim prednostim sklopitvenih reagentov v primerjavi z agresivnejšimi metodami, kot je uporaba kislinskih kloridov, lahko trdimo, da gre kljub temu za reakcije, kjer je možnost nastanka različnih stranskih produktov še vedno precej velika. Da bi delež le-teh čim bolj zmanjšali, bi jih bilo vsekakor potrebno precej optimizirati z vidika razmerij med reagenti, vrstnega reda dodajanja reagentov (npr. koliko časa kasneje dodati v reakcijsko zmes amin), izbire prave kombinacije topila in sklopitvenega reagenta za dano kombinacijo karboksilne kisline in amina. Pomembno vlogo pri naših končnih spojinah je igrala tudi ustrezna optična čistota, katere pa z razpoložljivimi metodami nismo mogli dobro ovrednotiti. Posledično tudi nismo mogli ovrednotiti vpliva različnih pogojev tvorbe amidne vezi na racemizacijo izhodnih spojin. Opazili smo, da igrata strukturi karboksilne kisline in amina pomembno vlogo pri poteku reakcije tako zaradi steričnih kot tudi elektronskih učinkov. Določenih spojin nam kljub večim poskusom z različnimi metodami ni uspelo pripraviti.

Rezultati vrednotenja zaviralne aktivnosti kažejo, da smo uspeli pripraviti nekaj dobrih zaviralcev giraze B, med katerimi najboljši izkazujejo aktivnost tudi v nanomolarnem koncentracijskem območju. Najboljšim spojinam iz prve serije smo ovrednotili tudi protibakterijsko delovanje, kjer se je pokazalo, da so nekatere izmed spojin tudi učinkovite protibakterijske učinkovine. Jakost protibakterijskega delovanja in zaviralne aktivnosti na *E. coli* DNA girazo B pri nekaterih spojinah nista povsem skladni, kar nakazuje, da igrajo pomembno vlogo pri protibakterijskem delovanju spojin tako permeabilnost učinkovin v bakterijsko celico kot tudi verjetnost delovanja na druge tarče v celici.

Rezultati dela lahko služijo kot dobra osnova za nadaljnjo optimizacijo strukture spojin na osnovi pirolamidnega ter aminokislinskega fragmenta. Predvsem bi bilo v nadaljevanju potrebno čim bolj podrobno določiti način vezave spojin in na osnovi tega v prihodnosti

pripraviti ustrezno rigidizirane analoge, ki bodo potencialno še močnejši zaviralci giraze B. Pri tem bi bilo zelo koristno pridobiti kristalno strukturo encima z eno izmed najboljših sintetiziranih spojin, saj bi tako lahko poleg ustrezne orientacije spojine določili tudi ključne interakcije z ustreznimi aminokislinskimi ostanki v vezavnem mestu. Prav tako pa bo pri nadaljnjem načrtovanju potrebno v čim večji meri upoštevati fizikalno-kemijske lastnosti spojin z namenom doseganja čim boljše permeabilnosti spojin v bakterijsko celico tako po Gramu pozitivnih kot tudi po Gramu negativnih bakterij, obenem pa tudi spremljati selektivno toksičnost spojin.

8. Literatura

- [1] J. M. A. Blair, M. A. Webber, A. J. Baylay, D. O. Ogbolu in L. J. V. Piddock: Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat. Rev. Microbiol.*, 2015, **13**: 42–51.
- [2] H. P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter, R. J. Flower in G. Henderson: Rang & Dale's Pharmacology, 7. izdaja. Churchill Livingstone, 2011.
- [3] C.-R. Lee, J. H. Lee, L.-W. Kang, B. C. Jeong in S. H. Lee: Educational Effectiveness, Target, and Content for Prudent Antibiotic Use. *Biomed Res. Int.*, 2015, **2015**: 1–13.
- [4] J. L. Martinez: General principles of antibiotic resistance in bacteria. *Drug Discov. Today Technol.*, 2014, **11**(1): 33–39.
- [5] C. R. Lee, I. H. Cho, B. C. Jeong in S. H. Lee: Strategies to minimize antibiotic resistance. *Int. J. Environ. Res. Public Health*, 2013, **10**: 4274–4305.
- [6] B. G. Bell, F. Schellevis, E. Stobberingh, H. Goossens in M. Pringle: A systematic review and meta-analysis of the effects of antibiotic consumption on antibiotic resistance. *BMC Infect. Dis.*, 2014, **14**: 13.
- [7] R. L. Finley, P. Collignon, D. G. J. Larsson, S. a. McEwen, X. Z. Li, W. H. Gaze, R. Reid-Smith, M. Timinouni, D. W. Graham in E. Topp: The scourge of antibiotic resistance: The important role of the environment. *Clin. Infect. Dis.*, 2013, **57**(5): 704–710.
- [8] D. I. Andersson in D. Hughes: Evolution of antibiotic resistance at non-lethal drug concentrations. *Drug Resist. Updat.*, 2012, **15**(3): 162–172.
- [9] A. H. Melnyk, A. Wong in R. Kassen: The fitness costs of antibiotic resistance mutations. *Evol. Appl.*, 2015, **8**(3): 273–283.
- [10] S. J. Hearnshaw, T. T.-H. Chung, C. E. M. Stevenson, A. Maxwell in D. M. Lawson, The role of monovalent cations in the ATPase reaction of DNA gyrase, *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*, **71**(4), 996–1005, 2015.
- [11] T. Tomašić in L. P. Mašič, Prospects for developing new antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases., *Curr. Top. Med. Chem.*, **14**(1), 130–51, 2014.
- [12] R. J. Reece in A. Maxwell, DNA Gyrase: Structure and Function, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **26**, 335–375, 1991.
- [13] M. H. O'Dea, J. K. Tamura in M. Gellert, Mutations in the B subunit of Escherichia coli DNA gyrase that affect ATP-dependent reactions., *J. Biol. Chem.*, **271**(16), 9723–9729, 1996.

- [14] E. C. Engle, S. H. Manes in K. Drlica, Differential effects of antibiotics inhibiting gyrase, *J. Bacteriol.*, **149**(1), 92–98, 1982.
- [15] C. H. Gross, J. D. Parsons, T. H. Grossman, P. S. Charifson, S. Bellon, J. Jernee, M. Dwyer, S. P. Chambers, W. Markland, M. Botfield in S. a. Raybuck: Active-site residues of Escherichia coli DNA gyrase required in coupling ATP hydrolysis to DNA supercoiling and amino acid substitutions leading to novobiocin resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2003, **47**(3): 1037–1046.
- [16] A. Gubaev in D. Klostermeier: DNA-induced narrowing of the gyrase N-gate coordinates T-segment capture and strand passage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2011, **108**(34): 14085–14090.
- [17] V. Škedelj, T. Tomašić, L. P. Mašič in A. Zega: ATP-binding site of bacterial enzymes as a target for antibacterial drug design. *J. Med. Chem.*, 2011, **54**(4): 915–929.
- [18] N. Zidar, S. Montalvão, Ž. Hodnik, D. a. Nawrot, A. Žula, J. Ilaš, D. Kikelj, P. Tammela in L. P. Mašič: Antimicrobial activity of the marine alkaloids, clathrocin and oroidin, and their synthetic analogues. *Mar. Drugs*, 2014, **12**(2): 940–963.
- [19] M. S. Laport, O. C. S. Santos in G. Muricy: Marine sponges: potential sources of new antimicrobial drugs. *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 2009, **10**(1): 86–105.
- [20] B. Forte, B. Malgesini, C. Piutti, F. Quartieri, A. Scolaro in G. Papeo: A submarine journey: The pyrrole-imidazole alkaloids. *Mar. Drugs*, 2009, **7**(4): 705–753.
- [21] M. Uria-Nickelsen, A. Blodgett, H. Kamp, A. Eakin, B. Sherer in O. Green: Novel DNA gyrase inhibitors: Microbiological characterisation of pyrrolamides. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 2013, **41**(1): 28–35.
- [22] B. a. Sherer, K. Hull, O. Green, G. Basarab, S. Hauck, P. Hill, J. T. Loch, G. Mullen, S. Bist, J. Bryant, A. Boriack-Sjodin, J. Read, N. Degrace, M. Uria-Nickelsen, R. N. Illingworth in A. E. Eakin: Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: Optimization of antibacterial activity and efficacy. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2011, **21**(24): 7416–7420.
- [23] J. I. Manchester, D. D. Dussault, J. a. Rose, P. A. Boriack-Sjodin, M. Uria-Nickelsen, G. Ioannidis, S. Bist, P. Fleming in K. G. Hull: Discovery of a novel azaindole class of antibacterial agents targeting the ATPase domains of DNA gyrase and Topoisomerase IV. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2012, **22**(15): 5150–5156.
- [24] M. Brvar, A. Perdih, V. Hodnik, M. Renko, G. Anderluh, R. Jerala in T. Šolmajer: In silico discovery and biophysical evaluation of novel 5-(2-hydroxybenzylidene) rhodanine inhibitors of DNA gyrase B. *Bioorganic Med. Chem.*, 2012, **20**(8): 2572–2580.

- [25] M. Brvar, A. Perdih, M. Oblak, L. P. Mašič in T. Šolmajer: In silico discovery of 2-amino-4-(2,4-dihydroxyphenyl)thiazoles as novel inhibitors of DNA gyrase B. *Bioorganic Med. Chem. Lett.*, 2010, **20**(3): 958–962.
- [26] T. Lindel, G. Breckle, M. Hochgürtel, C. Volk, A. Grube in M. Köck: Decomposition of oroidin in DMSO/TFA. *Tetrahedron Lett.*, 2004, **45**(44): 8149–8152.
- [27] H. I. Zgurskaya, G. Krishnamoorthy, A. Ntrel in S. Lu: Mechanism and function of the outer membrane channel TolC in multidrug resistance and physiology of enterobacteria. *Front. Microbiol.*, 2011, **2**: 189.
- [28] M. P. Bos, B. Tefsen, J. Geurtsen in J. Tommassen: Identification of an outer membrane protein required for the transport of lipopolysaccharide to the bacterial cell surface. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 2004, **101**(25): 9417–9422.
- [29] M. Tišler: Organska kemija, 3. izdaja. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2005.
- [30] J. Clayden, N. Greeves in S. Warren: Organic Chemistry, 2. izdaja. OUP Oxford, 2012.
- [31] C. Schmuck in J. Dudaczek: New guanidinium-based carboxylate receptors derived from 5-amino-pyrrole-2-carboxylate: Synthesis and first binding studies. *Tetrahedron Lett.*, 2005, **46**(42): 7101–7105.
- [32] M. B. Smith in J. March: March's Advanced Organic Chemistry: Reactions, Mechanisms, and Structure, 6. izdaja. Wiley-Interscience, 2007.
- [33] C. a G. N. Montalbetti in V. Falque: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 2005, **61**(46): 10827–10852.
- [34] L. Zhang, X. J. Wang, J. Wang, N. Grinberg, D. Krishnamurthy in C. H. Senanayake: An improved method of amide synthesis using acyl chlorides. *Tetrahedron Lett.*, 2009, **50**(24): 2964–2966.
- [35] A. El-Faham in F. Albericio: Peptide coupling reagents, more than a letter soup. *Chem. Rev.*, 2011, **111**(11): 6557–6602.
- [36] F. Lazarini in J. Brenčič: Splošna in anorganska kemija, 3. izdaja. Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, 2011.
- [37] W. L. F. Almarego in C. Chai: Purification of Laboratory Chemicals, 6. izdaja. Butterworth-Heinemann, 2009.
- [38] S. Y. Han in Y. A. Kim: Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron*, 2004, **60**(11): 2447–2467.

- [39] M. M. Joullié in K. M. Lassen: Evolution of amide bond formation. *Arkivoc*, **2010**(8), 189–250, 2010.
- [40] M. Bodanszky: Principles of Peptide Synthesis, 1. izdaja. Springer, 2012.
- [41] Y. V. Kazakevich in R. LoBrutto: HPLC for Pharmaceutical Sciences, 1. izdaja. Wiley-Interscience, 2007.
- [42] J. Jacobus in M. Raban: An NMR determination of optical purity: An advanced undergraduate laboratory experiment. *J. Chem. Educ.*, 1969, **46**(6): 351.
- [43] R. L. Lunblad: Chemical Reagents for Protein Modification, 4. izdaja. CRC Press, 2014.