

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Ilija N. Cvijetić

**HEMIJSKA I BIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA NOVOSINTETISANIH  
DERIVATA 4-ARIL-2,4-DIOKSOBUTANSKIH KISELINA I  
MOLEKULSKO MODELOVANJE U CILJU RACIONALIZACIJE  
BIOLOŠKE AKTIVNOSTI I FIZIČKO-HEMIJSKIH OSOBINA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Ilija N. Cvijetić

**CHEMICAL AND BIOLOGICAL CHARACTERIZATION OF NOVEL  
DERIVATIVES OF 4-ARYL-2,4-DIOXOBUTANOIC ACIDS, AND  
MOLECULAR MODELING FOR THE RATIONALIZATION OF  
BIOLOGICAL ACTIVITY AND PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

***Mentor:*** dr Tatjana Ž. Verbić, *docent*

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

***Članovi komisije:*** dr Mario Zlatović, *docent*

Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Mire Zloh, *full professor*

University of Hertfordshire, Hatfield, Hertfordshire, UK

***Datum odbrane doktorske teze:*** \_\_\_\_\_

## Hemijska i biološka karakterizacija novosintetisanih derivata 4-aril-2,4-dioksobutanskih kiselina i molekulsko modelovanje u cilju racionalizacije biološke aktivnosti i fizičko-hemijskih osobina

### Izvod

Rastuća otpornost bakterija prema dejstvu gotovo svih poznatih antibiotika zahteva pronalaženje novih hemijskih struktura koje efikasno deluju na multirezistentne (Multi-drug resistant, MDR) bakterije. Kao nastavak istraživanja antibakterijske aktivnosti 4-aril-2,4-dioksobutanskih kiselina (arildiketokiselina, ADK) započetih ranije u okviru naše istraživačke grupe, u okviru ove doktorske disertacije sintetisana je nova serija od dvadeset i jedne ADK (jedinjenja **1-21**) i ispitana im je antibakterijska aktivnost prema MDR sojevima bakterija. Jedinjenja sa voluminoznim alkil supstituentima u *orto*-položaju fenilnog jezgra pokazala su se najaktivnijim prema norfloksacin-rezistentnom soju bakterije *Staphylococcus aureus*, a jedinjenje **12** (4-(2,5-di-cikloheksilfenil)-2,4-dioksobutanska kiselina) je pokazalo 10-11 puta veću aktivnost prema istom soju bakterija od najaktivnijeg jedinjenja iz prethodno objavljene serije ADK, kao i 10 puta veću aktivnost od norfloksacina. Narušavanjem strukture diketo dela molekula značajno se smanjuje antibakterijska aktivnost ADK.

ADK su poznati helatori dvovalentnih metalnih jona. U vodenoj sredini na pH = 7,4 (pH vrednost krvi), ADK sa  $Zn^{2+}$  jonom pretežno gradi kompleks tipa 1:1 (ML), sa konstantom stabilnosti  $\log\beta \sim 5$ . Pored kompleksa tipa ML, na pH 7,4 moguće je postojanje i kompleksa tipa  $ML_2$ ,  $M(OH)L$  i  $M(OH)L_2$ . Uprkos dobroj sposobnosti kompleksiranja  $Zn^{2+}$  jona, ADK sintetisane u okviru ove disertacije nisu se pokazale kao efikasni inhibitori enzima karboanhidraza (KA). Iz tog razloga, polazeći od ADK sintetisana je serija aril-pirazol karboksilnih kiselina (APK, jedinjenja **25-48**), metabolički stabilnijih derivata ADK. APK su se pokazale kao selektivni inhibitori KA IX i XII, izoformi koje su značajne za medicinsku hemiju jer predstavljaju jedne od najnovije otkrivenih meta za razvoj lekova protiv čvrstih, invazivnih tumora. Jedinjenja sa voluminoznijim supstituentima u *para*-položaju fenilnog prstena inhibirala su dejstvo KA XII u niskim mikromolarnim koncentracijama, dok su jedinjenja sa alkil supstituentima u *orto*- i *meta*-položajima inhibirala KA IX u opsegu  $IC_{50}$  vrednosti od 5 do 25  $\mu M$ .

U okviru ove disertacije eksperimentalno su određeni još neki važni fizičko-hemijski parametri ADK i APK. Rastvorljivost ADK značajno raste sa porastom pH (0,02 mg/ml na pH = 1 do 1,43 mg/ml na pH 7,4).  $pK_a$  vrednosti ADK nalaze se u opsegu 1,96-2,34 za  $pK_{a1}$ , odnosno 6,50-7,61 za  $pK_{a2}$ . U jako kiseljoj sredini dominantan je molekulski ( $H_2A$ ) oblik ADK (na pH 1 više od 90%), dok su na pH 7,4 zastupljena dva oblika ( $HA^-$  i  $A^{2-}$ ) u promenljivom odnosu.  $pK_{a1}$  vrednosti APK su u opsegu 4,03-4,65 a disocijacija drugog protona nije primećena čak ni na pH = 11,5. Na pH 7,4 dominira monoanjonski ( $HA^-$ ) oblik APK. U okviru ove doktorske disertacije, 2D NMR spektroskopijom i kvantno-mehaničkim izračunavanjima proučavano je tautomerno ponašanje ADK i APK u rastvoru. Relativna stabilnost tautomera ADK izračunata uzimajući u obzir eksplicitno vodonično vezivanje ADK i rastvarača odgovara eksperimentalnim podacima. Dominantni tautomerni oblik APK u DMSO-u identičan je obliku nađenom u kristalnoj strukturi ovih jedinjenja. Takođe su proučavane i redoks osobine metil-supstituisanih ADK pomoću ciklične voltometrije i diferencijalne pulsne polarografije. ADK pokazuju ireverzibilne ciklovoltamograme pri svim ispitivanim brzinama skeniranja, što ukazuje na nedovoljnu stabilnost radikal-katjona nastalog jednoelektronskom oksidacijom ADK. Redukcioni potencijali ADK, određeni diferencijalno pulsnom polarografijom, zavise od stanja protonovanosti ADK. Energija LUMO orbitala, kao i indikatorska varijabla koja kvantifikuje sterne uticaje supstituenata, pokazale su statistički značajnu korelaciju sa redukcionim potencijalima ADK i mogu se iskoristiti za predviđanje redukcionih osobina strukturno sličnih jedinjenja.

Racionalizacija odnosa između strukture i biološke aktivnosti i dizajn novih, aktivnijih struktura, mogući su primenom različitih tehnika molekuskog modelovanja. Radi ispitivanja primenljivosti GRIND metodologije u dizajnu lekova zasnovanom na strukturi liganada (Ligand-based drug design, LBDD), kao test set upotrebljene su strukture i antiproliferativne aktivnosti već poznatih jedinjenja tetroksanskog tipa. S obzirom da je kritični korak u svakoj 3D QSAR analizi odabir odgovarajuće, *aktivne* konformacije molekula, konformaciono kruti molekuli kao što su tetroksani predstavljali su odličan model sistem za proučavanje 3D QSAR metode. GRIND metodologija se pokazala kao veoma korisna u slučajevima kada tačna meta biološkog

dejstva nije poznata već su jedino poznati podaci o biološkoj aktivnosti prema celim ćelijama.

U cilju racionalizacije antibakterijske aktivnosti ADK prema MDR sojevima bakterija primenjene su različite tehnike molekuskog modelovanja. Preklapanjem struktura ADK sa strukturom norfloksacina po kriterijumima oblika i farmakoforne sličnosti, pokazano je da je preklapanje po kriterijumu oblika najbolje kod najaktivnijih ADK, dok je istovremeno preklapanje farmakofornih tačaka najaktivnijih ADK i norfloksacina bilo najmanje. Ovo ukazuje na drugačiji mehanizam antibakterijskog delovanja ADK od mehanizma dejstva norfloksacina. 3D QSAR zasnovan na GRIND metodologiji pokazao se veoma korisnim u pronalaženju farmakofornih tačaka neophodnih za antibakterijsku aktivnost ADK. Dobijen je statistički značajan model koji može biti iskorišćen za dizajn aktivnijih struktura na bazi ADK, kao i za virtuelni skrining većih baza podataka radi nalaženja novih tipova struktura sa sličnim biološkim dejstvom.

Doking studije APK i sistematsko poređenje MIF-ova aktivnih mesta izoformi KA I, II, IX i XII pokazale su da je deo aktivnog mesta KA sa nepolarnim aminokiselinskim ostacima oko položaja 130 (130's segment) bitan za ostvarivanje izoformske selektivnosti inhibitora. Rezultati ove studije mogu se iskoristiti u svrhu dizajna novih, selektivnijih inhibitora KA IX i XII, povećavanjem broja i energije interakcija sa 130's segmentom a istovremeno zadržavajući polarnu „glavu“ molekula radi kompleksiranja sa  $Zn^{2+}$  jonom.

Arildiketo kiseline i aril-pirazol karboksilne kiseline proučavane u okviru ove disertacije pokazale su pogodne biološke i fizičko-hemijske karakteristike koje ih čine dobrim polaznim jedinjenjima (lead compounds) za dalji razvoj antibakterijskih agenasa aktivnih prema MDR sojevima bakterija i selektivnih inhibitora izoformi IX i XII enzima KA. Tehnike molekuskog modelovanja zasnovane na MIF-ovima pokazale su se kao izuzetno korisne za racionalizaciju odnosa strukture i biološke aktivnosti različitih klasa jedinjenja u LBDD, kada tačna biološka meta dejstva nije sa sigurnošću utvrđena.

**Ključne reči:** arildiketo kiseline, aril-pirazol karboksilne kiseline, multirezistentne *Staphylococcus aureus* bakterije, karboanhidraze, određivanje fizičko-hemijskih karakteristika jedinjenja, 3D QSAR, GRIND metodologija.

# Chemical and biological characterization of novel derivatives of 4-aryl-2,4-dioxobutanoic acids, and molecular modeling for the rationalization of biological activity and physico-chemical properties

## Abstract

Growing bacterial resistance toward almost all known antibiotics demands rapid discovery of the novel chemical entities active toward multidrug resistant (MDR) bacterial strains. As a continuation of research on antibacterial activity of 4-aryl-2,4-dioxobutanoic acids (ADK), synthesis and antibacterial activity of twenty one novel ADKs (compounds **1-21**) are reported in this thesis. Compounds bearing bulky alkyl substituents in *ortho*-position on phenyl ring were the most active against norfloxacin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. Compound **12** was 10-11 times more potent than the most potent ADK from previously published set of compounds, and also 10 times more potent than norfloxacin tested against the same bacterial strain. Diketo moiety was proven to be essential for antibacterial activity of ADK

ADKs are well-known chelators of divalent metal ions. In water at pH 7,4 (blood pH value) ADK and  $Zn^{2+}$  predominantly form 1:1 type of complex (ML), with stability constant  $\log\beta \sim 5$ . Besides ML, existence of  $ML_2$ ,  $M(OH)L$  i  $M(OH)L_2$  type of complexes is also possible at pH 7,4.

Although ADK show good  $Zn^{2+}$  complexation ability, these compounds were not efficient inhibitors of carboanhydrases (CA, metalloenzymes with  $Zn^{2+}$  as a cofactor). The series of metabolically more stable derivatives of ADK, aryl-pyrazole carboxylic acids (APK, compounds **25-48**), was synthesized and their inhibitory activity toward CA tested. APK show good CA inhibitory activity, selectively targeting isoforms IX and XII. Compounds bearing bulky substituents in *para*-position on phenyl ring inhibited CA XII in low micromolar concentrations, while compounds having the alkyl substituents in *ortho*- and *meta*-positions preferentially inhibited CA IX ( $IC_{50}$  values from 5 to 25  $\mu M$ ).

Within this dissertation, some important physico-chemical parameters of ADK and APK were experimentally determined. Solubility of ADK increases significantly

with the pH increase (from 0.02 mg/ml at pH = 1 to 1.43 mg/ml at pH 7.4).  $pK_a$  values of ADK are in range 1.96-2.34 for  $pK_{a1}$ , and 6.50-7.61 for  $pK_{a2}$ . In highly acidic media molecular ( $H_2A$ ) form of ADK is predominant (more than 90% at pH 1), while two forms ( $HA^-$  and  $A^{2-}$  in various proportions) are present at pH 7.4.  $pK_{a1}$  values of APK are in range 4.03-4.65, and dissociation of second proton is not observed even at pH = 11.5. At pH 7.4, monoanionic ( $HA^-$ ) is the dominant form of APK.

Tautomeric preferences of ADK and APK in solution were studied by 2D NMR spectroscopy and quantum-mechanical calculations. Relative stability of ADK tautomers, calculated with explicit hydrogen bonding of compounds with solvent taken into consideration, corresponds to the experimental results. Dominant tautomer of APK in DMSO was found to be the same as the one obtained from crystal structure determination. Redox properties of methyl-substituted ADK (compounds **1-3**, **5-7**, **22-24**) were studied using cyclic voltammetry and differential pulse polarography. Irreversible electrochemical behaviour of these compounds was observed at all scan rates, indicating the instability of radical-cation generated during one-electron oxidation of ADK. Reduction potentials were dependent on ADK protonation state. The energies of frontier molecular orbitals and descriptors which quantify steric influence of substituents are well correlated with the reduction potentials of ADK, and might be used for the prediction of redox properties of structurally similar compounds.

The rationalization of structure-activity relationships and design of novel, more active compounds, may be done using many different molecular modeling techniques. In order to examine the applicability of GRIND methodology in LBDD, structures and antiproliferative activities of previously known compounds bearing tetraoxane ring were used as a test set. Considering the fact that the critical point of every 3D QSAR analysis is the choice of proper (*bioactive*) conformation, rigid molecules like tetraoxanes represent excellent model system for studying 3D QSAR method. GRIND methodology proved to be very useful in cases when exact biological target in cell is not known, but only ligand structures and activities toward the whole cell.

The rationalization of antibacterial activity of ADK toward MDR bacterial strains was attempted using different molecular modeling techniques. Overlapping the structure of ADKs and norfloxacin using the criteria of shape and pharmacophoric



similarity, it was shown that the most active ADKs show the highest shape overlap, but at the same time the lowest overlap of pharmacophoric points. This points out that the mechanism of action is different than with norfloxacin. 3D QSAR based on GRIND methodology proved to be very useful in finding pharmacophoric hot spots necessary for the antibacterial activity of ADK. Obtained model might be used for the design of more active structures based on ADK scaffold, as well as for virtual screening of large databases for finding novel scaffolds with similar biological activity.

Docking studies of APK and systematic comparison of the active site MIFs of isoforms CA I, II, IX and XII, showed that the part of the CA active site around residue 130 (130's segment) with exclusively non-polar amino acid residues is important for establishing isoform selectivity. Novel, more selective inhibitors of CA IX and XII might be prepared by increasing the number of interactions of molecule with the 130's segment and at the same time retaining zinc binding group as a polar head of molecule.

Aryldiketo acids and aryl-pyrazole carboxylic acids studied within this dissertation show biological and physico-chemical properties to be the lead compounds for further development of antibacterial agents active toward MDR bacterial strains and selective inhibitors of CA isoforms IX and XII. Molecular modeling techniques based on molecular interaction fields proved to be extremely useful for rationalization of structure-activity relationship of structurally different compounds, in cases when the exact biological target of compound is not known (ligand-based drug design).

**Keywords:** aryldiketo acids, aryl-pyrazole carboxylic acids, Multidrug resistant bacteria, carboanhydrases, physico-chemical profiling of compounds, 3D QSAR, GRIND methodology

# Sadržaj

<b>1. Uvod</b> .....	1
<b>2. Opšti deo</b> .....	4
<b>2.1. Arildiketo kiseline</b> .....	4
2.1.1. <i>Biološka aktivnost arildiketo kiselina</i> .....	4
2.1.2. <i>Sinteza arildiketo kiselina</i> .....	5
2.1.3. <i>Antibakterijska aktivnost i mogući mehanizmi dejstva ADK</i> .....	7
<b>2.2. 5-Aril-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline</b> .....	15
2.2.1. <i>Biološka aktivnost 5-aril-1H-pirazol-3-karboksilnih kiselina</i> .....	15
2.2.2. <i>Sinteza aril-pirazol karboksilnih kiselina</i> .....	15
<b>2.3. Inhibicija dejstva enzima karboanhidraza</b> .....	16
<b>2.4. Fizičko-hemijska karakterizacija potencijalnih lekova</b> .....	22
2.4.1. <i>Određivanje pK<sub>a</sub> vrednosti</i> .....	22
2.4.2. <i>Određivanje konstante stabilnosti kompleksa, kompleksiranje ADK sa metalnim jonima</i> .....	28
2.4.3. <i>Tautomerija arildiketo kiselina i aril-pirazol-karboksilnih kiselina</i> .....	32
2.4.4. <i>Elektrohemijsko ponašanje diketokiselina i jedinjenja tipa β-diketona</i> .....	34
<b>2.5. Analiza odnosa strukture i aktivnosti jedinjenja – QSAR metode</b> .....	36
2.5.1. <i>Izračunavanje polja molekulskih interakcija</i> .....	40
2.5.2. <i>GRIND deskriptori</i> .....	41
2.5.3. <i>Trodimenzionalna analiza odnosa strukture i aktivnosti (3D QSAR) zasnovana na poljima molekulskih interakcija</i> .....	44
2.5.4. <i>Interpretacija PLS modela</i> .....	48
<b>3. Naši radovi</b> .....	50
<b>3.1. Arildiketo kiseline</b> .....	50
3.1.1. <i>Sinteza arildiketo kiselina</i> .....	50
3.1.2. <i>Antibakterijsko dejstvo arildiketo kiselina</i> .....	52
<b>3.2. Neke fizičko-hemijske karakteristike važne za biološku aktivnost ADK</b> .....	55
3.2.1. <i>Protolitičke ravnoteže u rastvorima arildiketo kiselina</i> .....	55
3.2.2. <i>Kompleksiranje ADK sa dvovalentnim metalnim jonima</i> .....	59
3.2.3. <i>Tautomerija ADK u vodenoj sredini</i> .....	70
3.2.3.1. <i>Kvantno-hemijsko proučavanje stabilnosti različitih oblika jedinjenja 1 u rastvoru</i> .....	71
3.2.4. <i>Elektrohemijske osobine ADK</i> .....	74
<b>3.3. Inhibitorna aktivnost ADK i APK prema humanim karboanhidrazama</b> .....	80
3.3.1. <i>Sinteza aril-pirazol karboksilnih kiselina</i> .....	82

3.3.2. <i>Inhibitorna aktivnost aril-pirazol karboksilnih kiselina prema karboanhidrazama</i> .....	84
<b>3.4. Fizičko-hemijsko profilisanje APK</b> .....	87
3.4.1. <i>Tautomerija aril-pirazol-karboksilnih kiselina</i> .....	87
3.4.2. <i>Protolitičke ravnoteže aril-pirazol karboksilnih kiselina</i> .....	92
<b>3.5. Tehnike molekuskog modelovanja u cilju racionalizacije odnosa između strukture i biološke aktivnosti</b> .....	96
3.5.1. <i>Ispitivanje primenljivosti 3D QSAR metode izvedene iz polja molekulskih interakcija (GRIND metodologije)</i> .....	96
3.5.1.1. 3D QSAR .....	97
3.5.2. <i>Proučavanje odnosa između strukture i antibakterijske aktivnosti ADK</i> .....	105
3.5.2.1. <i>Analiza glavne komponente (PCA)</i> .....	106
3.5.2.2. <i>Regresiona analiza PLS metodom</i> .....	107
3.5.3. <i>Analiza odnosa između strukture APK i inhibitorne aktivnosti prema KA</i> .....	112
<b>4. Materijali i metode</b> .....	122
<b>4.1. Sinteza i karakterizacija jedinjenja</b> .....	122
4.1.1. <i>Opšte napomene</i> .....	122
4.1.2. <i>Sinteza i karakterizacija arildiketo kiselina (1-21)</i> .....	123
4.1.2.1. <i>Karakterizacija arildiketo kiselina (1-21), polaznih acetofenona i aroil-propanskih kiselina (1a-3a)</i> .....	124
4.1.3. <i>Tipična eksperimentalna procedura za sintezu aril-pirazol karboksilnih kiselina</i> .....	129
4.1.3.1. <i>Karakterizacija aril-pirazol karboksilnih kiselina</i> .....	130
<b>4.2. Određivanje biološke aktivnosti jedinjenja</b> .....	136
4.2.1. <i>Antibakterijska aktivnost ADK i derivata</i> .....	136
4.2.2. <i>Inhibicija dejstva karboanhidraza</i> .....	137
<b>4.3. Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika jedinjenja</b> .....	137
4.3.1. <i>Spektrofotometrijsko određivanje konstanti kiselosti arildiketo kiselina</i> ..	137
4.3.2. <i>Potenciometrijsko određivanje konstanti kiselosti arildiketo kiselina</i> .....	138
4.3.3. <i>Određivanje konstanti kiselosti aril-pirazol karboksilnih kiselina</i> .....	139
4.3.4. <i>Spektrofotometrijsko određivanje sastava i konstante stabilnosti kompleksa ADK sa Zn<sup>2+</sup> jonom</i> .....	140
4.3.5. <i>Potenciometrijsko određivanje sastava i konstante stabilnosti kompleksa ADK sa Zn<sup>2+</sup> jonom</i> .....	140
4.3.6. <i>Elektrohemijsko proučavanje arildiketo kiselina</i> .....	141
<b>4.4. Molekulsko modelovanje</b> .....	142
4.4.1. <i>Kvantno-hemijsko proučavanje stabilnosti tautomera jedinjenja I</i> .....	142
4.4.2. <i>Kvantno-hemijsko proučavanje stabilnosti metil-supstituisanih arildiketo kiselina</i> .....	142

4.4.3. 3D QSAR modelovanje zasnovano na deskriptorima izvedenim iz MIF-ova primenjeno na antiproliferativnu aktivnost jedinjenja tetoksanskog tipa.....	142
4.4.4. 3D QSAR modelovanje zasnovano na deskriptorima izvedenim iz MIF-ova primenjeno na antibakterijsku aktivnost arildiketo kiselina ...	143
4.4.5. Doking aril pirazol karboksilnih kiselina u strukture karboanhidraza.....	144
<b>5. Zaključak</b> .....	146
<b>6. Literatura</b> .....	151
<b>7. Prilog</b> .....	167
<b>Prilog 2.</b> NMR spektri ADK.....	211
<b>Prilog 3.</b> NMR spektri APK.....	226
<b>Prilog 4.</b> Slike NMR spektara aroilpropanskih kiselina i acetofenona ( <b>1a-5a</b> ) ..	244

# 1. Uvod

4-Aril-2,4-dioksobutanske kiseline (arildiketo kiseline, ADK) ispoljavaju čitav niz različitih bioloških aktivnosti. Najpoznatije je ipak delovanje ADK kao inhibitora HIV-1 integraze, enzima koji je važan u procesu replikacije HIV virusa u ćelijama domaćina. Njihova aktivnost često je posledica dobro poznate sposobnosti ADK da kompleksiraju dvovalentne metalne jone koji su kofaktori u mnogim enzimima. U prethodnim radovima pokazano je da ADK ispoljavaju i antibakterijsku aktivnost prema nekim sojevima bakterije *Staphylococcus aureus* otpornim na dejstvo poznatih antibiotika.<sup>1</sup>

Jedan od ciljeva ove disertacije bio je dizajn i sinteza derivata ADK sa poboljšanom antibakterijskom aktivnošću. Sintetisana je kongenerna serija ADK i ispitana je njihova antibakterijska aktivnost prema bakterijama otpornim na meticilin i druge antibiotike (Multidrug Resistant, MDR) sojevi *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* i *Bacillus subtilis*). Ispitivanjem antibakterijske aktivnosti analoga ADK sa narušenom strukturom diketo dela, pokazano je da je ovaj strukturni fragment esencijalan za antibakterijsku aktivnost ADK. S obzirom da je diketo deo molekula važan i za kompleksiranje dvovalentnih metalnih jona, mehanizam dejstva ADK kao antibakterijskih agenasa verovatno uključuje i interakciju sa bakterijskim enzimima koji u aktivnom mestu sadrže  $M^{2+}$  jon.

Pored ispitivanja antibakterijske aktivnosti ADK, u okviru ove disertacije ispitivana je i inhibitorna aktivnosti ADK prema nekoliko izoformi enzima humane karboanhidraze (hKA, KA). Ovi enzimi u aktivnom mestu sadrže jedan jon  $Zn^{2+}$  i katalizuju reakciju pretvaranja  $CO_2$  u  $HCO_3^-$ . Inhibitori KA se koriste u terapiji različitih patoloških stanja i najveći problem kod terapije ovim agensima predstavlja njihova neselektivnost. U ljudskom organizmu ima najmanje 16 različitih izoformi KA koje su specifične za određena tkiva i neselektivni inhibitori KA često dovode do nuspojava. Izoforme KA IX i XII su posebno interesantne jer predstavljaju nove mete u terapiji čvrstih tumora. Razvoj selektivnih, potentnih i izoformsko specifičnih inhibitora KA IX i XII predstavlja novi pristup u razvoju antitumorskih agenasa. Kako je  $Zn^{2+}$  jon važan za aktivnost enzima KA, jedan od ciljeva ove disertacije bio je i proučavanje

sastava i stabilnosti kompleksa ADK sa  $Zn^{2+}$  jonom u simuliranim fiziološkim uslovima.

S obzirom na poznatu metaboličku labilnost jedinjenja sa 1,3-diketo fragmentom, u okviru ove disertacije sintetisana je i serija metabolički stabilnijih derivata ADK – 5-aril-1*H*-pirazol-3-karboksilnih kiselina (APK) i ispitana je i njihova inhibitorna aktivnost prema nekoliko izoformi KA. Ova serija jedinjenja pokazala je veću aktivnost prema enzimima KA u odnosu na ADK, uz izraženu izoformsku selektivnost prema izoformama KA IX i XII.

Konstante kiselosti biološki aktivnih molekula su veoma važne za tačno utvrđivanje stanja protonovanosti molekula na različitim pH vrednostima, što ima veliki značaj u određivanju i predviđanju njihovih ADMET osobina (apsorpcija, distribucija, metabolizam, eliminacija i toksičnost). U okviru ove disertacije, eksperimentalno su određene konstante kiselosti serije jedinjenja iz klasa ADK i APK.

ADK, kao i APK, u rastvoru mogu postojati u nekoliko različitih tautomernih oblika. U prethodnim istraživanjima naše grupe dokazan je dominantni tautomerni oblik ADK u vodenoj, kao i nevodenoj sredini, upotrebom NMR spektroskopije. U okviru ove disertacije, kvantno-hemijskim izračunavanjima predviđen je redosled stabilnosti tautomera ADK u vodenoj sredini. NMR spektroskopijom takođe je utvrđen i dominantni tautomerni oblik APK u DMSO-u. U okviru ove disertacije proučavane su i elektrohemijske osobine ADK kao važnog parametra u fizičko-hemijskoj karakterizaciji biološki aktivnih jedinjenja i funkcionalnih materijala. Redoks osobine ADK korelisane su sa kvantno-mehanički izračunatim deskriptorima polazeći u izračunavanjima od strukture najstabilnijeg tautomera.

U okviru ove disertacije posebna pažnja posvećena je primeni tehnika molekuskog modelovanja zasnovanih na poljima molekulskih interakcija (Molecular Interaction Fields, MIF) u svrhu objašnjavanja i racionalizacije rezultata bioloških ispitivanja i dizajna aktivnijih jedinjenja. Za korelaciju između strukture i biološke aktivnosti korišćen je 3D QSAR metod (Quantitative Structure-Activity Relationship) zasnovan na molekulskim deskriptorima nezavisnim od međusobnog prostornog svrstavanja molekula (Alignment-independent descriptors, GRIND metod). Kritični korak većine poznatih 3D QSAR metoda predstavlja upravo međusobno prostorno poravnavanje struktura. Poravnavanje se uglavnom izvodi po kriterijumu zajedničkog

strukturnog fragmenta ali ne postoje tačno utvrđena pravila, što unosi dozu subjektivnosti u krajnji rezultat. Takođe, ove metode su ograničene na strukturno jako slične molekule čime se sužava domen primenljivosti. GRIND metod je razvijen u svrhu prevazilaženja svih ovih ograničenja. Kao model set za proveru ove metodologije korišćena su konformaciono kruta jedinjenja tetroksanskog tipa i njihove antiproliferativne aktivnosti prema dve ćelijske linije kancera. Ovom studijom potvrđeno je da 3D QSAR metode nezavisne od međusobnog prostornog svrstavanja molekula mogu biti korisne u dizajnu novih lekova čak i u slučaju kada tačna meta biološkog dejstva jedinjenja nije poznata (takozvani dizajn lekova zasnovan na strukturi liganada, ligand-based drug design, LBDD). Ista metodologija je zatim iskorišćena za nalaženje strukturnih karakteristika važnih za antibakterijsku aktivnost ADK prema MDR sojevima bakterija. U oba slučaja tačna biološka meta dejstva nije poznata. Kao baza za modelovanje korišćeni su zbirni podaci o antibakterijskim aktivnostima ADK iz prethodne<sup>1</sup> i ove studije, kao i aktivnosti komercijalno dostupnih antibiotika floksacinskog tipa. Na osnovu dobijenog modela izvedeni su zaključci o farmakofornim tačkama važnim za antibakterijsku aktivnost ADK.

Polja molekulskih interakcija iskorišćena su i za objašnjavanje izoformske selektivnosti APK kao inhibitora enzima karboanhidraze. Uočene razlike u MIF-ovima aktivnih mesta četiri izoforme KA, zajedno sa doking analizom APK u aktivna mesta KA, dovele su do korisnih informacija o strukturnim karakteristikama koje doprinose aktivnosti i selektivnosti APK.

## 2. Opšti deo

### 2.1. Arildiketo kiseline

#### 2.1.1. Biološka aktivnost arildiketo kiselina

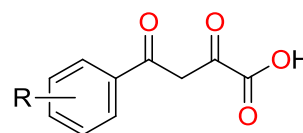
Zbog raznovrsnosti ispoljenih bioloških dejstava, arildiketo kiseline (ADK, **Slika 1**) predstavljaju zanimljivu klasu organskih molekula sa stanovišta razvoja novih lekova. Ova jedinjenja koordinativno vezuju dvovalentne metalne jone pa mogu inhibirati dejstvo enzima koji kao kofaktor sadrže ove jone.<sup>2,3</sup>

ADK su najpoznatije kao inhibitori HIV-1 integraze (IN). IN je retrovirusni enzim koji je esencijalan za integrisanje genetskog materijala virusa u DNK domaćina i dalju virusnu replikaciju. Odsustvo sličnog enzima kod ljudi čini IN zanimljivom metom za dizajn

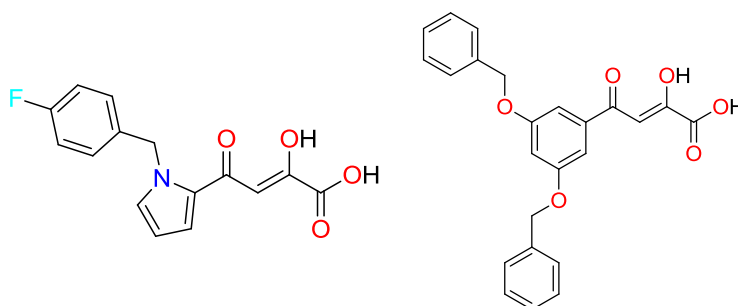
anti-HIV lekova. ADK su najefikasniji inhibitori IN i preferencijalno inhibiraju korak integracije provirusne DNK u DNK ćelije domaćina (strand transfer, ST), bez uticaja na proces obrade 3' kraja provirusne DNK (3' - processing). Prvi objavljeni inhibitori ST pripadaju klasi β-diketo kiselina (**Slika 2**), sa IC<sub>50</sub> vrednostima oko 100 nM.<sup>4,5</sup>

Trenutno na tržištu postoje tri inhibitora IN odobrena od strane Agencije za hranu i lekove (Food and Drug Administration, FDA): raltegravir, elvitegravir i dolutegravir (**Slika 3**).<sup>6-8</sup> Oni se koriste

kao dopuna visoko aktivne antiretroviralne terapije (HAART) u koktelu sa drugim anti-HIV lekovima. Elvitegravir i dolutegravir sadrže diketo fragment. Treba napomenuti da postoje i inhibitori ST koji sadrže i druge strukturne fragmente koji su često modifikacija diketo kiselina.<sup>9</sup>



**Slika 1.** Opšta formula 4-aril-2,4-dioksobutanskih kiselina.



**Slika 2.** Strukture L-731,988 (levo) i L-708,906 (desno), prvih inhibitora ST koraka HIV-1 integraze.



Diketo kiseline su takođe opisane kao dualni inhibitori IN i ribonukleaze H povezane sa reverznom transkriptazom (reverse transcriptase-associated ribonuclease H (RNase H)).<sup>10</sup> Na ovaj način mogu se dobiti mnogo efikasniji anti-HIV agensi, jer se razvojem dualnih inhibitora smanjuju: nepoželjne lek-lek interakcije, toksični efekti i verovatnoća nastanka rezistencije virusa prema leku.

ADK su se takođe pokazale kao odlični inhibitori malat sintetaze (GlcB) organizma *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb).<sup>11</sup> GlcB ima esencijalnu ulogu u metabolizmu masnih kiselina Mtb. Duboko u aktivnom mestu GlcB nalazi se  $Mg^{2+}$  jon zajedno sa katalitičkim ostatkom asparaginske kiseline (Asp633).<sup>12</sup>

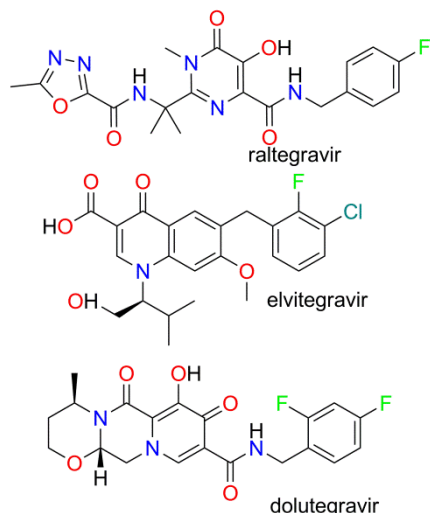
ADK su opisane i kao inhibitori virusne RNK zavisne RNK polimeraze L-proteina La Crosse ortobuniavirusa (orthobunyavirus). Ovaj enzim u aktivnom mestu sadrži dva  $Mn^{2+}$  jona u blizini kojih se nalaze ostaci Asp.<sup>13</sup>

Usled velikog potencijala za izazivanje pandemije, virus gripa (influenca) predstavlja ozbiljnu pretnju ljudskom zdravlju. Nova meta anti-influenca lekova je kiseli polimerazni protein (Polymerase acidic protein, PA), čija endonukleazna aktivnost je esencijalna za virusnu replikaciju. Ovaj enzim u aktivnom mestu takođe ima dva  $Mn^{2+}$  jona u čijoj okolini se nalaze ostaci Asp i glutaminske kiseline (Glu), i ADK i strukturno slična jedinjenja predstavljaju potencijalne antivirusne lekove za terapiju gripa.<sup>14,15</sup>

ADK su se takođe pokazale kao selektivni inhibitori helikaze SARS kruna virusa,<sup>16</sup> enzima koji u aktivnom mestu sadrži  $Zn^{2+}$  jon,<sup>17</sup> kao i RNK zavisne RNK polimeraze hepatitis C virusa za čiju aktivnost su opet neophodni  $Mg^{2+}$  ili  $Mn^{2+}$  joni.<sup>18</sup>

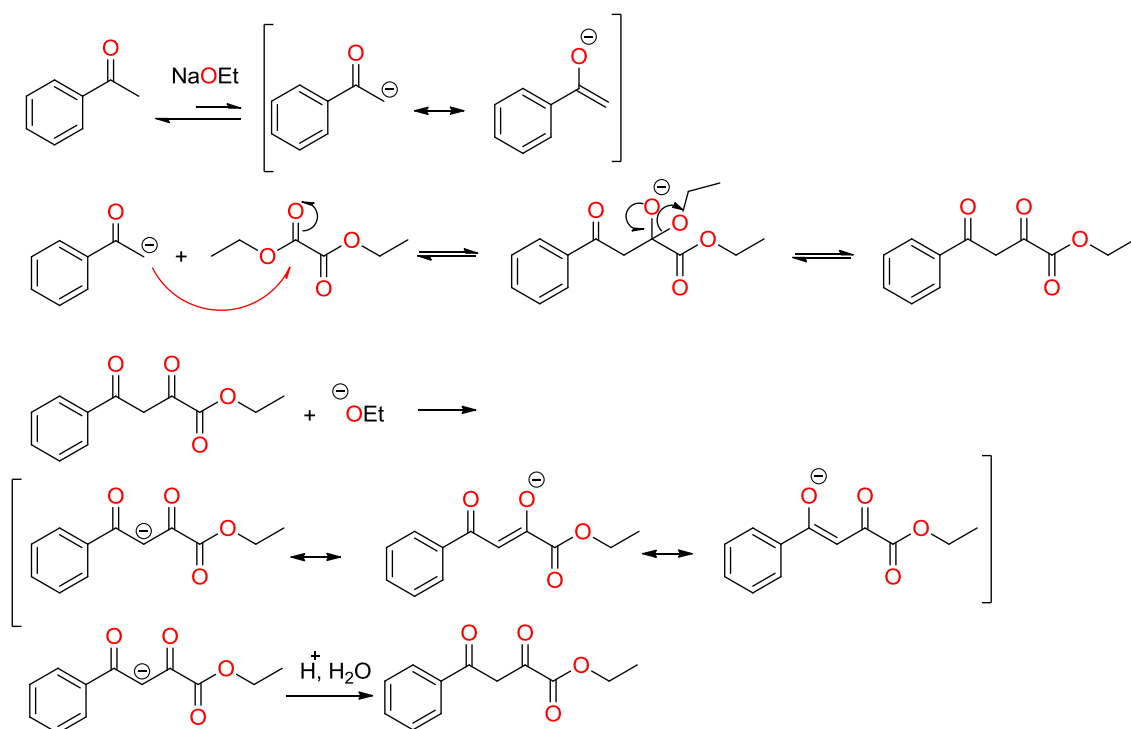
### 2.1.2. Sintaza arildiketo kiseline

Claisen-ova kondenzacija je značajna reakcija za formiranje C-C veze u sintezi 1,3-dikarbonilnih jedinjenja<sup>19</sup> kao i u biosintezi prirodnih proizvoda.<sup>20</sup> Klasična Claisen-ova kondenzacija podrazumeva kondenzaciju estarskog enolata sa estrima pri čemu se



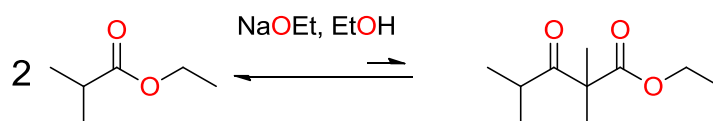
**Slika 3.** Strukture tri inhibitora IN odobrenih od strane FDA.

dobijaju  $\beta$ -keto estri. Pored ove reakcije postoje i ukrštene Claisen-ove kondenzacije u kojima učestvuju ketoni. Pošto su  $\alpha$ -H atomi ketona kiseliji nego kod estara, oni se deprotonuju pre nego što dođe do kondenzacije dva molekula estara. Mehanizam ukrštene Claisen-ove kondenzacije uključuje deprotonovanje ketona, zatim nukleofilnu adiciju enolata na molekul estara posle koje sledi eliminacija alkoksidnog anjona i dobijanje  $\beta$ -keto estra (**Slika 4**).



**Slika 4.** Mehanizam ukrštene Claisen-ove kondenzacije.

Claisen-ova kondenzacija je endotermna reakcija i ne bi se mogla dovesti do kraja bez stehiometrijske količine baze koja deprotonuje nastali  $\beta$ -keto estar, pri čemu nastaje rezonanciono stabilizovani anjon i ravnoteža se pomera ka građenju proizvoda. Poslednja faza reakcije je protonovanje anjona razblaženom kiselinom. Značaj faze deprotonovanja  $\beta$ -keto estra vidi se na primeru neuspele Claisen-ove kondenzacije etil-2-metilpropanoata, gde baza dovodi do retro-Claisen-ove kondenzacije usled nepostojanja kiselih atoma vodonika koji bi bili preuzeti od strane baze (**Slika 5**).

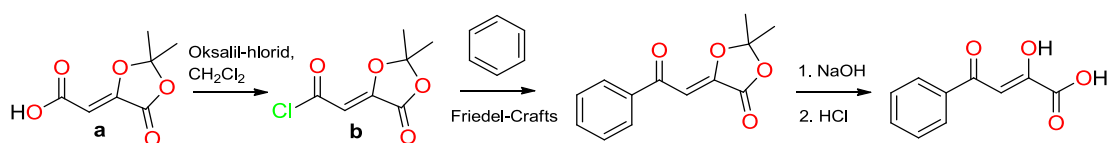


**Slika 5.** Primer neuspele Claisen-ove kondenzacije.

Sinteza  $\beta$ -keto estara je dobro opisana u literaturi i najčešće se izvodi oksalilovanjem aril-metil ketona pomoću dimetil ili dietil-oksalata u prisustvu NaH (u benzenu, toluenu ili DMF-u), natrijum bis(trimetilsilil)amida (NaHMDS) u THF, NaOEt ili NaOMe u odgovarajućem alkoholu. Upotrebom *tert*-butil metil oksalata poboljšava se prinos ove sinteze i skraćuje reakciono vreme,<sup>21</sup> ali slaba dostupnost ovog reagensa (nije komercijalno dostupan) ograničava njegovu upotrebu. Hidrolizom  $\beta$ -keto estara dobijaju se odgovarajuće ADK.

Poboljšana sinteza  $\beta$ -keto estara i ADK postignuta je izolovanjem natrijumove soli ketoenolatnog estra nastalog kondenzacijom acetofenona i dimetil oksalata. Izolovana so se zatim može hidrolizovati uz pomoć CH<sub>3</sub>COOH (pH = 3-4) do  $\beta$ -keto estra ili uz pomoć 1 M HCl do ADK.<sup>22</sup>

2,2-Dimetil-5-karboksimetilen-1,3-dioksolan-4-on i njegov hlorid kiseline (**Slika 6, a i b**) predstavljaju nove sintone za sintezu jedinjenja iz klase ADK. Pri uslovima Friedel-Crafts-ovog acilovanja pomoću njih se može acilovati čitav niz aromatičnih jedinjenja, da bi se hidrolizom dobijenog acetala došlo do odgovarajućih ADK.<sup>23</sup>



**Slika 6.** Sintaza derivata ADK pomoću hlorida 2,2-dimetil-5-karboksimetilen-1,3-dioksolan-4-ona kao acilujućeg sredstva.

### 2.1.3. Antibakterijska aktivnost i mogući mehanizmi dejstva ADK

Nakon otkrića penicilina, zlatno doba otkrića novih antibiotika bilo je tokom 50-tih i 60-tih godina prošlog veka, da bi nakon 1985. godine broj novootkrivenih antibiotika naglo opao.<sup>24</sup> Pored smanjenog broja novih antibiotika, usled njihove prekomerne i neadekvatne upotrebe širom sveta naglo opada osetljivost bakterija na antibiotike. Globalna prodaja antibiotika za ljudsku upotrebu porasla je za 36% u periodu 2000-2011, dok je u zemljama BRIKS-a zabeležen porast od čak 76%.<sup>25</sup> Pored klasičnih antibiotika, beleži se i porast prodaje antibiotika najnovijih generacija kao što su karbapenemi i polimiksini.

Pored prekomerne i neadekvatne primene antibiotika, veliki uticaj na rastuću otpornost bakterija ima i primena antibiotika u poljoprivredi, gde se antibiotici daju

životinjama u subterapeutskim koncentracijama radi ubrzavanja rasta i sprečavanja bolesti. Zbog toga se moraju uložiti dodatni resursi i naponi na održavanju efektivnosti konvencionalnih i podršci u razvoju novih antibiotika.<sup>26</sup> Pored nalaženja antibakterijskih agenasa sa alternativnim mehanizmima dejstva, veoma je važno i bolje razumevanje složenih mehanizama dejstva trenutno dostupnih antibiotika.

Većina antibiotika deluje na jedan od četiri načina: kao *inhibitori sinteze DNK, RNK, ćelijskog zida* ili *biosinteze proteina*.

1) *Inhibitori sinteze DNK*: Hinolonski antibiotici su najpoznatiji inhibitori replikacije DNK. Oni deluju na enzime topoizomerazu II (DNK girazu) i IV, koje imaju ulogu medijatora u dodatnom uvijanju (supercoiling) hromozomske DNK. Giraze se smatraju primarnim metama za uništavanje Gram-negativnih (G –) a topoizomeraza IV Gram-pozitivnih bakterija (G +), i hinoloni preferencijalno inhibiraju G + bakterije. Dejstvom hinolona na topoizomerazu nastaje kompleks hinolon-topoizomeraza-DNK, čime se blokira ponovno formiranje dvostrukog heliksa DNK iz razdvojenih lanaca i time se narušava topologija hromozoma. Efekat ovog dejstva je primarno bakteriostatski, a u nekim slučajevima može dovesti i do ćelijske smrti.<sup>27</sup>

2) *Inhibitori sinteze RNK*: Sinteza RNK može biti blokirana dejstvom antibiotika iz klase rifamicina i, kao i inhibicija replikacije DNK hinolonima, ima pogubno dejstvo na metabolizam nukleinskih kiselina prokariotske ćelije čime se efikasno indukuje smrt bakterijske ćelije.<sup>28</sup>

3) *Inhibitori biosinteze ćelijskog zida*: Bakterijska ćelija je obložena slojevima peptidoglikana (PG, mureina), umreženog polimernog matriksa sačinjenog od peptidno vezanih  $\beta$ -(1–4)-*N*-acetil-heksozamina. Murein daje mehaničku otpornost ćelijskom zidu bakterije čime joj pomaže da preživi u uslovima povećanog osmotskog pritiska. Peptidni lanci nezrelih PG lanaca umrežavaju se dejstvom enzima transglikozilaze i transpeptidaze.  $\beta$ -laktamski antibiotici (penicilin, karbapenem, cefalosporin) blokiraju umrežavanje jedinica PG inhibirajući reakciju nastajanja peptidne veze koju katalizuje transpeptidaza. Glikopeptidni antibiotici, kao što je vankomicin, deluju na sintezu mureina direktnim vezivanjem za jedinice PG čime se blokira aktivnost transglikozilaze i transpeptidaze.<sup>29</sup> Dok se  $\beta$ -laktamski antibiotici mogu koristiti za lečenje infekcija izazvanim G + i G – bakterijama, glikopeptidi su efikasni jedino prema G + bakterijama usled male permeabilnosti.

4) *Inhibitori biosinteze bakterijskih proteina*: Proces prevođenja informacione RNK u proteine (translacija) se odigrava u ćelijskim organelama ribozomima u tri faze: inicijacija, elongacija i terminacija. Ribozomi su izgrađeni od ribonukleoproteina i podeljeni su na dve podjedinice: 50S i 30S. U fazi inicijacije formira se kompleks između iRNK, aminoacil tRNK sa formilovanim metioninom (fMet) na *N*-terminalnom kraju, još nekoliko faktora inicijacije i slobodne 30S podjedinice.<sup>30</sup> Različiti inhibitori biosinteze proteina kao što su eritromicin, klindamicin, streptogramini, hloramfenikol, tetraciklini, streptomycin i drugi deluju na različite faze biosinteze. Kombinacijom dva leka koja deluju u različitim fazama biosinteze proteina može se postići sinergistički efekat. Pored sinergističkog efekta (dejstvo kombinacije lekova veće nego zbir pojedinačnih dejstava svakog leka), postoje i aditivni (dejstvo je prosti zbir pojedinačnih efekata) i antagonistički efekat.<sup>31</sup>

Vezivanje antibiotika za metu dejstva je tek početak kompleksnog procesa izazivanja smrti bakterijske ćelije antibioticima. Ono indukuje čitav niz bioloških odgovora čije bolje razumevanje bi moglo pomoći u razvitku efikasnijih terapeutika.<sup>32</sup> Pokazano je da  $\beta$ -laktamski, hinolinski antibiotici i aminoglikozidi, uprkos velikim razlikama u hemijskim osobinama i primarnim načinom dejstva, izazivaju nastajanje hidroksilnih radikala letalnih i za G + i za G – bakterije. Veruje se da je nastajanje hidroksilnog radikala krajnja faza zajedničkog mehanističkog puta kojim antibiotici sa baktericidnim delovanjem dovode do bakterijske smrti.<sup>33</sup>

Kao što je već rečeno, pojava otpornosti bakterija predstavlja rastuću opasnost po zdravlje ljudi. Glavni mehanizmi pomoću kojih bakterija razvija otpornost prema anti-infektivnim agensima su: modifikacija biološke mete leka, smanjenje intracelularne koncentracije leka usled promene membranske propustljivosti i prekomerna ekspresija efluks pumpi. Efluks pumpe predstavljaju odbrambeni mehanizam kojim se bakterija štiti od antibiotika. Najzastupljenija i najproučavanija efluks pumpa *S. aureus* soja bakterija je NorA, koja je odgovorna za rezistenciju prema norfloksacinu. Uz pomoć ovih pumpi antibiotici se aktivno izbacuju iz bakterijske ćelije. Kao rezultat, u bakterijskoj ćeliji zaostaje antibiotik u subterapijskoj koncentraciji što dalje može izazvati pojavu ozbiljnije rezistencije na samom mestu dejstva antibiotika.<sup>34</sup> Razvojem

efikasnih inhibitora efluks pumpi može se povratiti osetljivost otpornih bakterijskih sojeva prema antimikrobnim agensima.

Infekcije izazvane meticilin-rezistentnim sojevima *S. aureus* (MRSA) predstavljaju veliki zdravstveni problem usled česte pojave i velike smrtnosti (oko 20%). Visoka smrtnost je posledica sposobnosti MRSA da razvije otpornost prema različitim antibioticima kao što su tetraciklini, aminoglikozidi i fluorohinoloni.

Pokazano je da su efluks pumpe multirezistentnih (Multidrug Resistant - MDR) bakterija sposobne da uklone strukturno veoma različite supstrate.<sup>35</sup> Pošto su geni za MDR efluks pumpe nađeni u skoro 50% kliničkih sojeva *S. aureus*,<sup>36</sup> njihova ekspresija je najverovatniji razlog pojave rezistencije MRSA prema gotovo svim poznatim antibioticima.

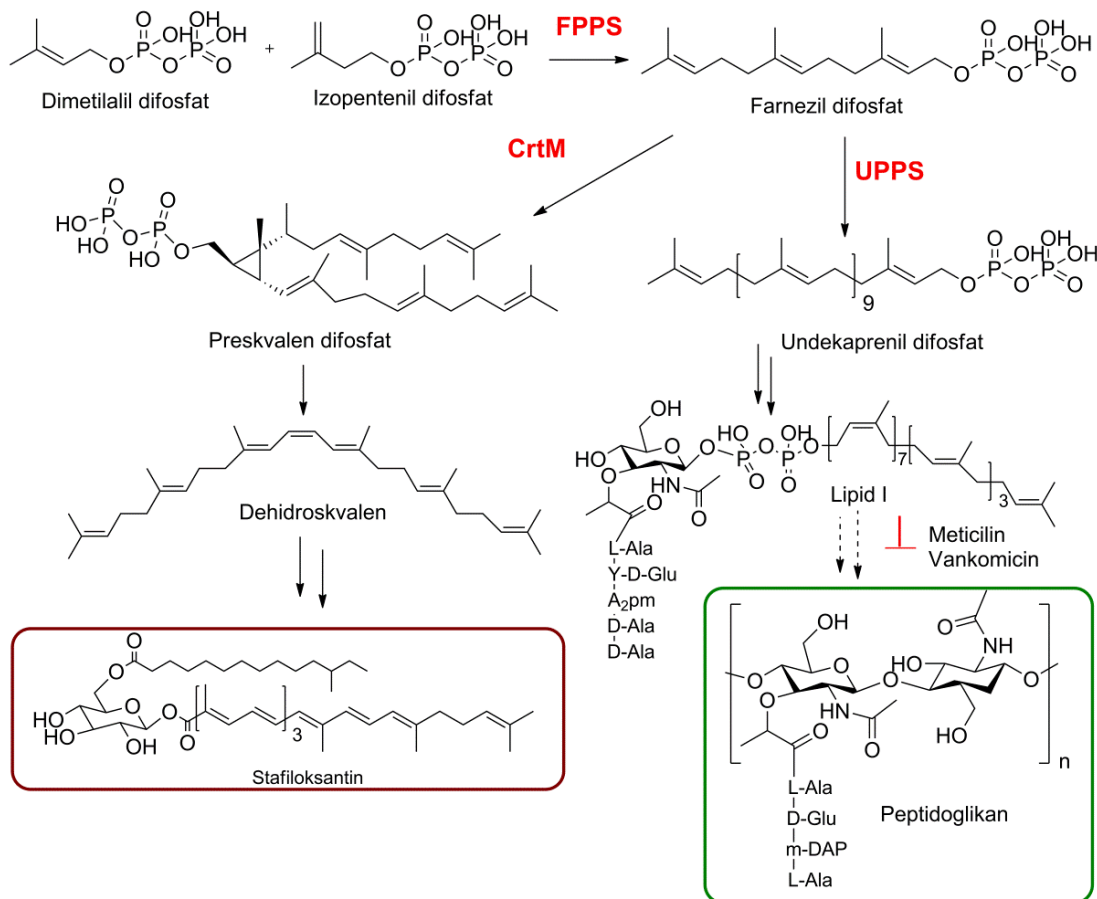
U radu Oldfilda i Fenga<sup>24</sup> opisane su strategije za razvoj novih antibakterijskih terapeutika. Inhibitori koji mogu delovati na više od jedne mete (multitarget inhibitors) su manje podložni rezistenciji i poželjno je da potencijalni lek ima ove osobine. Ako imamo dve mete A i B, čije su verovatnoće za razvoj rezistencije  $P_A$  i  $P_B$ , verovatnoća za pojavu otpornosti kod obe mete istovremeno je mnogo manja -  $P_AP_B$ .

Kombinaciona terapija (combination therapy) je često neophodna u borbi sa bolestima kao što su malarija, tuberkuloza i AIDS radi prevazilaženja rezistencije. Da bi neki molekul mogao da bude uspešan lek, pored aktivnosti na određenu metu mora ispuniti i brojne zahteve vezane za ADMET osobine. U kombinacionoj terapiji svi troškovi postupka optimizacije novog leka se barem udvostručuju, dok se razvojem inhibitora više meta ADMET osobine i ostali ekonomski faktori vezani za razvoj leka optimizuju samo za jedan molekul.

FDA je izdala preporuke za razvoj novih anti-infektivnih lekova u kojima je navedeno da je poželjno da se istovremeno deluje na više meta istog metaboličkog puta,<sup>37</sup> kao i da takvi metabolički putevi ne postoje u organizmu domaćina.

Enzimi uključeni u biosintezu izoprenoida, zajedno sa enzimima daljih faza metaboličkog puta koji su uključeni u biosintezu sterola i ćelijskog zida bakterije predstavljaju mete dejstva mnogih lekova.<sup>24,38</sup> Na primer, biosinteza ćelijskog zida bakterije može biti inhibirana dejstvom na enzime prenil-transferaze: farnezil difosfat sintetazu (FPPS) ili undekaprenil difosfat sintetazu (UPPS). Kod bakterija *S. aureus* obrazovanje virulentnog faktora stafiloksantina (koji je odgovoran za antioksidativnu

zaštitu i zlatno-žutu boju kolonija *S. aureus*) može biti sprečeno inhibicijom enzima dehidroskvalen sintetaze (CrtM) (**Slika 7**), što rezultuje manjom optornošću bakterijske ćelije na reaktivne kiseonične vrste normalno proizvedene od strane domaćina.<sup>39</sup>

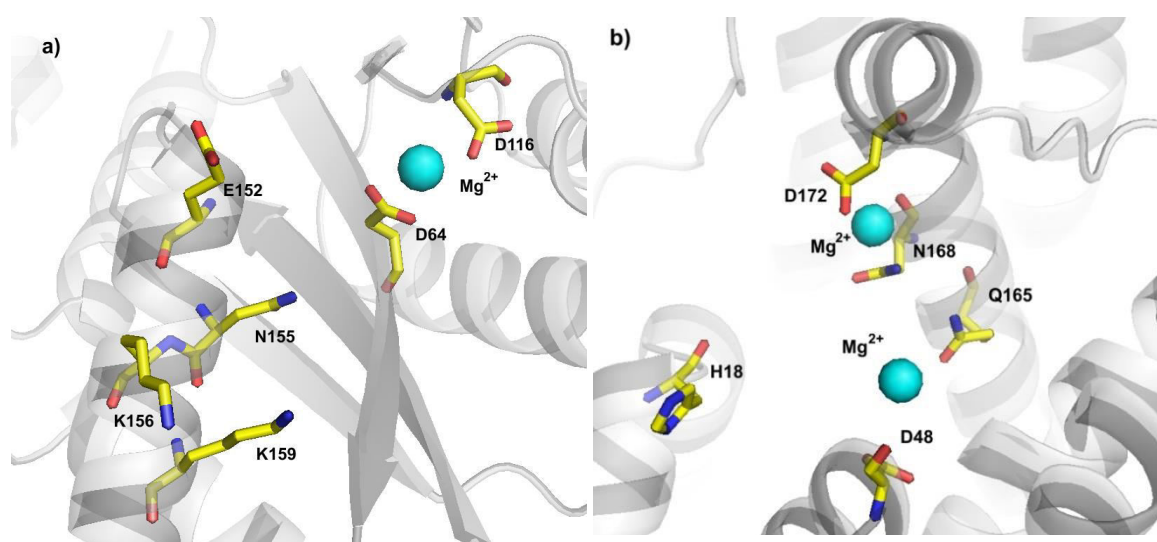


**Slika 7.** Biosintetičke reakcije katalizovane enzimima FPPS, UPPS i CrtM, kao i krajnji produkti metaboličkih puteva. Adaptirano iz literature.<sup>40</sup>

Antibiotici kao što su meticilin i vankomicin deluju na formiranje peptidoglikana ali u kasnijim fazama biosinteze ćelijskog zida bakterije (**Slika 7**).<sup>41</sup> Esencijalni enzimi bakterijske ćelije koji se ne eksprimuju u ljudskom organizmu, kao što je UPPS,<sup>42</sup> predstavljaju odličnu metu za razvoj antibiotika, jer se dejstvom na njih neželjeni efekti leka značajno umanjuju. Pošto se nalaze na istom biosintetičkom putu, moguće je sinergističko dejstvo inhibitora UPPS sa poznatim inhibitorima biosinteze ćelijskog zida. Time bi se mogla smanjiti toksičnost lekova kao što je vankomicin (primenjene doze mogle bi biti manje) ili bi, kao u slučaju meticilina, čak moglo doći i do povratka osetljivosti MRSA sojeva bakterija prema nekim konvencionalnim antibioticima.

Različite klase bisfosfonata ili fosfosulfonata pokazale su značajnu aktivnost prema FPPS, UPPS ili CrtM, ali nisu imale značajnu aktivnost prema bakterijama.<sup>43,44</sup> Mogući razlog slabe aktivnosti prema bakterijama leži u njihovim nepovoljnim fizičko-hemijskim osobinama neophodnim da bi neka supstanca mogla da se ponaša kao lek (drug-like properties, DLP). Razvojem inhibitora prenil-transferaza koji ne sadrže atome fosfora poboljšavaju se DLP i povećava šansa za *in vivo* aktivnost ovih jedinjenja.

U aktivnom mestu većine prenil-transferaza nalazi se kombinacija  $Mg^{2+}/Asp$  koja interaguje sa difosfatnom grupom supstrata. Sličnost sa aktivnim mestom HIV-1 IN (Slika 8) navela je grupu autora da ispitaju da li poznati inhibitori IN na bazi keto i diketo kiselina (L-708,906 i raltegravir)<sup>4,45</sup> mogu biti potencijalni inhibitori prenil-transferaza.<sup>40</sup> Poznato je od ranije da ovi IN inhibitori vezuju  $Mg^{2+}$  jon i da se u aktivnom mestu koordinuju blizu  $Mg^{2+}/Asp$  dela.<sup>46,47</sup>



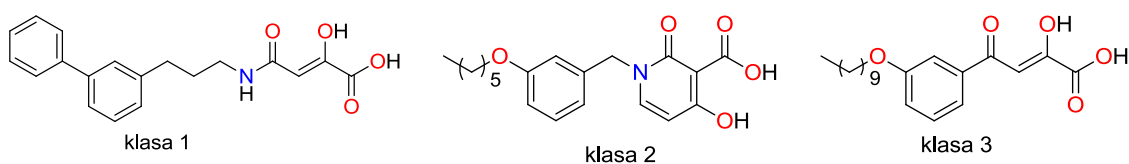
**Slika 8.** Aktivna mesta: a) HIV-1 integraze (adaptirano iz PDB (Protein Data Bank) strukture 1K6Y<sup>48</sup>); b) CrtM (adaptirano iz PDB strukture 2ZY1<sup>49</sup>), na kojima se vidi  $Mg^{2+}/Asp$  (D) strukturalni deo.

Zhang i koautori ispitivali su inhibitorne aktivnosti serije diketokiselina prema *S. aureus* CrtM, *E. coli* UPPS i *S. aureus* UPPS.<sup>40</sup> Većina ispitivanih supstanci pripadale su grupi amido-diketokiselina (Slika 9, klasa 1), manji deo seta pripadao je dihidropiridon-3-karboksilnim kiselinama (klasa 2, strukturno slična elvitegraviru), a dve supstance pripadale su arildiketo kiselinama (klasa 3). Struktura najaktivnijih



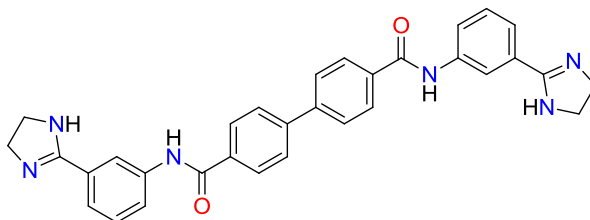
jedinjenja iz svake klase prikazana je na **Slici 9**. Značajna inhibitorna moć u kombinaciji sa eksperimentalno određenom kristalnom strukturom, potvrdili su hipotezu o vezivanju diketokiselina iz klasa 1 i 2 za  $Mg^{2+}$  jon u aktivnom mestu CrtM.

Pored CrtM, koja pripada grupi prenil-transferaza tipa „glava-glava“ (tip vezivanja se može uočiti na **Slici 7**), jedinjenja iz klase 1 pokazivale su i značajnu inhibitornu sposobnost prema prenil transferazama tipa „glava-rep“, kao što je UPPS. Iako su pokazale značajnu inhibitornu aktivnost prema prenil-transferazama, amido-diketokiseline nisu bile uspešne u zaustavljanju rasta bakterija *S. aureus* ili *E. coli*. Kao moguće objašnjenje navedena je nestabilnost amidne veze unutar ćelije ili mala permeabilnost. Za razliku od amido-diketokiselina, ADK su pokazale odličnu aktivnost prema *S. aureus* UPPS ( $IC_{50} = 0,73 \mu M$ ), kao i vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije ( $MIK_{90}$ ) od 500 ng/mL prema soju *S. aureus* USA300 (MRSA). Značajna aktivnost prema G – organizmima *E. coli* nije pronađena i ispitivane ADK su imale nisku toksičnost prema zdravim humanim ćelijama.



**Slika 9.** Strukture najaktivnijih diketokiselina prema nekoliko bakterijskih enzima.

Bifenil bisamidin (**Slika 10**) je veoma potentni inhibitor UPPS ( $IC_{50} = 0,1 \mu M$ ) i pokazuje aktivnost prema *S. aureus* USA300 MRSA sojevima ( $MIK_{90} = 250 \text{ ng/ml}$ ). Snažno sinergističko dejstvo primećeno je između bifenil bisamidina i metecilina.<sup>41</sup> Time je eksperimentalno potvrđena hipoteza da inhibitori prenil-transferaza mogu imati sinergistički efekat na meticilin.



**Slika 10.** Struktura bifenil bisamidina.

Diketo strukturni fragment često je prisutan u strukturama antibiotika fluorohinolonskog i tetraciklinskog tipa i može biti važan za antibakterijsku aktivnost ovih jedinjenja. U prethodnim radovima naše grupe pokazano je da ADK ispoljavaju

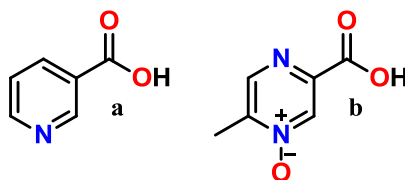
antibakterijsku aktivnost prema nekoliko kliničkih izolata MDR bakterija. Najaktivniji derivati imali su slične MIK vrednosti prema MDR sojevima kao neki od klinički korišćenih antibiotika.<sup>1</sup> U istom radu pokazano je da neke od ispitivanih ADK imaju umereno jaku sposobnost da poboljšaju aktivnost norfloksacina prema prema norfloksacin-otpornim sojevima *S. aureus* koji prekomerno ekspiruju NorA efluks pumpu. Dalje modifikacije aril-supstituenata ADK mogu dovesti do poboljšane aktivnosti prema MDR bakterijama, kako samih ADK tako i u sinergiji sa fluorohinolonskim antibioticima.

Tačan mehanizam antibakterijskog dejstva ADK nije u potpunosti poznat. U prethodnom delu teze pokazano je da ADK mogu ispoljiti inhibitorno dejstvo prema prenil-transferazama. Masood i saradnici pokazali su inhibitorno dejstvo ADK i njihovih etil-estara prema bakterijskim metionin aminopeptidazama (MetAP), što je još jedan od mogućih mehanizama dejstva ADK na MDR bakterije.<sup>50</sup> Mnogi antibakterijski lekovi deluju na translaciju bakterijskih proteina. Hidroliza *N*-terminalnog metionina, katalizovana pomoću MetAP, predstavlja važan korak u posttranslacionom sazrevanju proteina. MetAP su prisutne kako u prokariotskim tako i u eukariotskim organizmima. Kod ljudi postoje dva tipa MetAP i oba se smatraju pogodnim metama za razvoj lekova za borbu protiv raka. Sličnost humanih MetAP sa bakterijskim je mala i iznosi oko 30-40% za tip I, odnosno 20% za tip II. S obzirom da su MetAP esencijalne za čitav niz bakterija kao što su *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Streptococcus penumoniae* i *Haemophilis influenza*, inhibitori sa dizajniranom selektivnošću prema bakterijskim izoformama MetAP predstavljaju moguću novu klasu antibiotika sa alternativnim mehanizmom dejstva.<sup>51</sup>

## 2.2. 5-Aril-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline

### 2.2.1. Biološka aktivnost 5-aril-1*H*-pirazol-3-karboksilnih kiselina

Biološka aktivnost 5-aril-1*H*-pirazol-3-karboksilnih kiselina (aril-pirazol karboksilnih kiselina, u daljem tekstu APK) opisana je u literaturi u svega nekoliko primera. Ova jedinjenja su parcijalni agonisti G-kuplovanih receptora za nikotinsku kiselinu<sup>52</sup> i mogu se koristiti u terapiji hiperlipidemije. Parcijalno agonističko dejstvo APK povećava selektivnost i umanjuje neželjene reakcije u poređenju sa lekovima koji se koriste u kliničkoj praksi (nikotinska kiselina (niacin, vitamin B3) i acipimoks (**Slika 11**)).

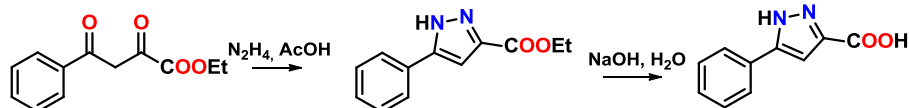


**Slika 11.** Struktura niacina (a) i acipimoksa (b), lekova korišćenih u terapiji hiperlipidemije.

APK su takođe opisane kao inhibitori protein-protein interakcija replikacionog proteina A (RPA).<sup>53</sup> RPA selektivno vezuje proteine koji učestvuju u popravljanju oštećene DNK. Selektivna inhibicija ovih protein-protein interakcija potencijalno dovodi do povećanja osetljivosti ćelija raka prema lekovima koji deluju tako što oštećuju DNK ćelije. Visoko selektivni inhibitori tirozin-fosfataze 1B koji kao fragment sadrže APK imaju potencijalnu terapijsku primenu u tretmanu gojaznosti i dijabetesa tipa II.<sup>54</sup> APK su, zajedno sa ADK, opisane kao inhibitori izoformi I, II, IX i XII humanih karboanhidraza (EC 4.2.1.1).<sup>55</sup>

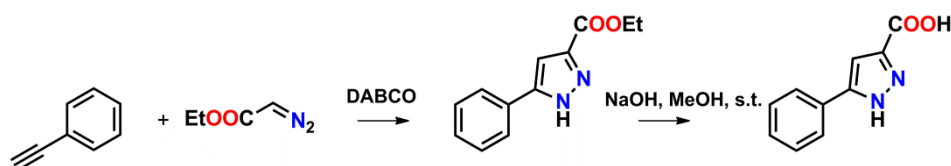
### 2.2.2. Sinteza aril-pirazol karboksilnih kiselina

Najpoznatiji način za sintezu pirazola je Knorr-ova metoda.<sup>56</sup> Koristeći hidrazin-hidrat u blago kiseloj sredini 1,3-dikarbonilna jedinjenja se prevode u pirazole. Ova metoda je iskorišćena i u sintezi APK.<sup>57,58</sup> Sintetička procedura u većini opisanih slučajeva podrazumeva reakciju estra ADK sa hidrazinom, posle koje sledi hidroliza dobijenog estra APK (**Slika 12**).



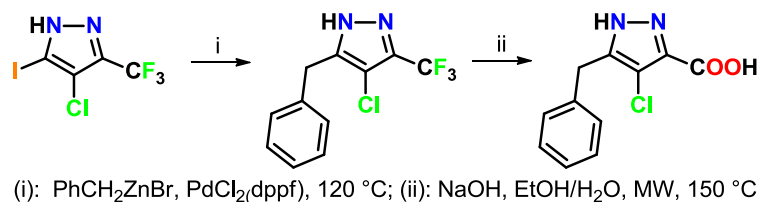
**Slika 12.** Sinteza APK iz estara ADK.

APK se mogu sintetisati i iz fenil-acetilena i etil-diazoacetata reakcijom 1,3-dipolarne cikloadicije katalizovane dodatkom 10 mol. % DABCO (1,4-diazabicyklo[2.2.2]oktana), **Slika 13**.<sup>59</sup>



**Slika 13.** Sinteza pirazol karboksilne kiseline 1,3-dipolarnom cikloadicijom.

Polazeći od 3/5-trifluormetil pirazola, hidrolizom  $-\text{CF}_3$  grupe dobijene su odgovarajuće *NH*-pirazol-3/5-karboksilne kiseline.<sup>60</sup> Ovaj sintetički metod omogućuje dodatnu funkcionalizaciju pirazolskog prstena uz pomoć Suzuki-Miyaura ili Negishi-jevog kuplovanja (**Slika 14**).



**Slika 14.** Sinteza pirazol-karboksilnih kiselina iz trifluormetil pirazola uz funkcionalizaciju položaja 5 Negishi-jevim kuplovanjem.

### 2.3. Inhibicija dejstva enzima karboanhidraza

Karboanhidraze (KA) su važni enzimi za pH regulaciju, prisutni u različitim organizmima širom filogenetskog stabla. Ova familija metaloproteina koristi  $\text{Zn}^{2+}$  kao kofaktor i katalizuje reakciju hidratacije ugljen-dioksida do bikarbonata kao i povratnu reakciju dehidratacije bikarbonata u kiseljoj sredini ( $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$ ). Mehanizam katalitičke reakcije je dvostepen. Prvi stepen je nukleofilni napad  $^-\text{OH}$  jona vezanog za  $\text{Zn}^{2+}$  na  $\text{CO}_2$  uz nastanak  $\text{HCO}_3^-$ , koji zatim biva istisnut iz aktivnog mesta

pomoću molekula vode. Sledeći stepen je regenerisanje aktivnog  $\text{OH}^-$  jona vezanog za  $\text{Zn}^{2+}$  preko transfera  $\text{H}^+$  na akceptor i on je odlučujući za ukupnu brzinu procesa.

Najmanje šesnaest različitih izoformi KA sudeluju u važnim fiziološkim procesima u organizmima sisara kao što su: održavanje pH ravnoteže, disanje, transport ugljen-dioksida i jona, glukoneogeneza, lipogeneza, ureageneza, aktivnost osteocita (koštanih ćelija) i stvaranje telesnih tečnosti.<sup>61</sup> Ovi enzimi se klasifikuju kao  $\alpha$ -KA familija. KA ostalih organizama kao što su biljke, alge i bakterije spadaju u familije  $\beta$ - $\delta$  KA. Šesnaest izoformi  $\alpha$ -KA međusobno se razlikuju po lokalizaciji unutar ćelije, katalitičkoj aktivnosti i osetljivosti na dejstvo strukturno različitih inhibitora. Njihovom aktivacijom ili inhibicijom može se uticati na čitav niz zdravstvenih problema kao što su edem, glaukom, gojaznost, rak, epilepsija i osteoporoza, što ih čini važnom biološkom metom za razvoj novih lekova.<sup>62,63</sup> U **Tabeli 1** dat je pregled bolesti u kojima inhibicija/aktivacija različitih izoformi KA može biti od terapijskog značaja.<sup>64</sup>

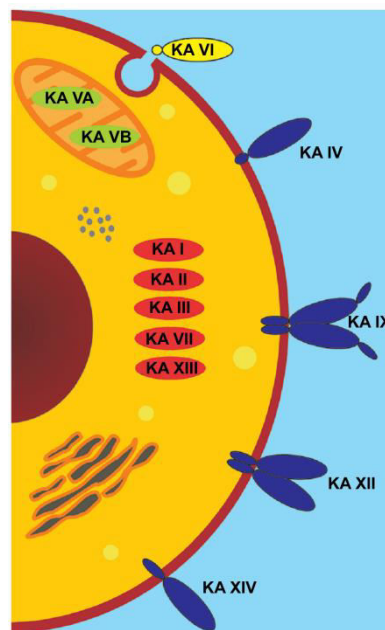
**Tabela 1.** Izoforme hKA kao biološke mete kod različitih bolesti i moguće interakcije sa drugim izoformama KA.

Izoforma	Bolest u kojoj učestvuje	Moguća interakcija sa drugim izoformama hKA (offtargets)
KA I	retinalni/cerebralni edem	nepoznato
KA II	glaukom	KA I
	edem	nepoznato
	epilepsija	nepoznato
	visinska bolest	nepoznato
KA III	oksidativni stres	nepoznato
KA IV	glaukom	KA I
	retinitis pigmentosa	nepoznato
KA VA/VB	šlog	nepoznato
	gojaznost	KA I, KA II
KA VI	kariogeneza (stvaranje karijesa)	KA II
KA VII	epilepsija	nepoznato
KA VIII	neurodegeneracija	nepoznato
	rak	nepoznato
KA IX	rak	KA I, KA II
KA XII	rak	KA I, KA II
	glaukom	nepoznato
KA XIII	sterilitet	nepoznato
KA XIV	epilepsija	nepoznato
	retinopatija	nepoznato

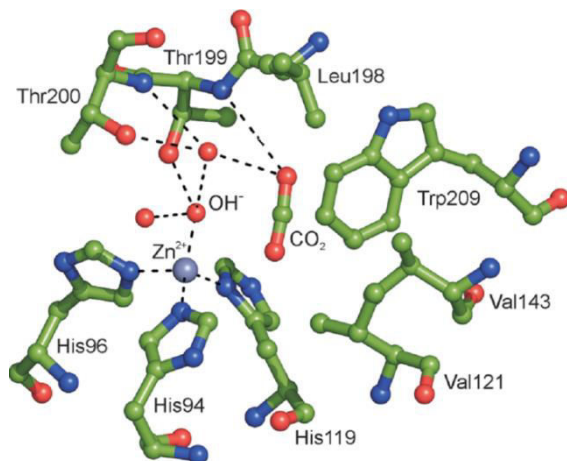
Većina izoformi  $\alpha$ -KA familije su locirane u citosolu (I, II, III, VII, XIII), neke izoforme su locirane u membrani (IV, IX, XII i XIV), KA VA i VB nalaze se u mitohondrijama dok se KA VI izlučuje putem pljuvačke i mleka (Slika 15).<sup>61</sup>

U bazi kristalnih struktura proteina (PDB) može se pronaći više od 670 3D struktura KA, mahom određenih putem difrakcije X-zraka. Bez obzira na različitu lokaciju u ćeliji, ovi enzimi su strukturno veoma konzervirani što otežava razvoj izoformski selektivnih inhibitora. Aktivno mesto nalazi se u velikoj, konusnoj šupljini u čijem dnu se nalazi katalitički  $Zn^{2+}$  jon. On je tetraedarski vezan sa tri histidinska ostatka koji su konzervirani među svim izoformama i molekulom vode/ $\bar{O}H$  jonom kao četvrtim

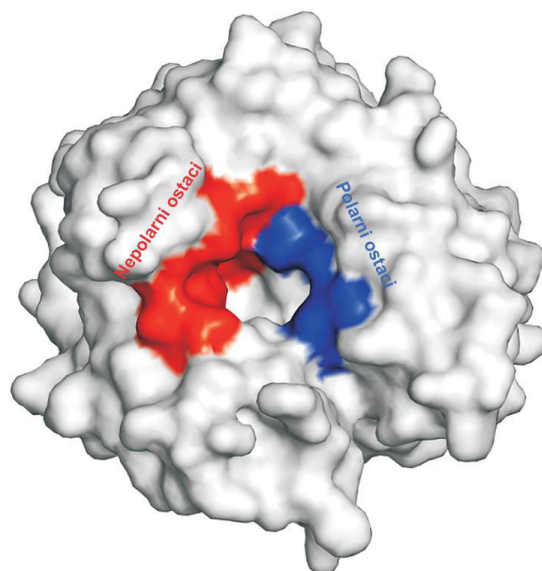
ligandom (Slika 16). Aktivno mesto svih izoformi sastoji se iz dva klastera aminokiselina od kojih jedan sadrži isključivo polarne a drugi nepolarne ostatke (Slika 17). Hidrofobni region aktivnog mesta omogućava pravilnu orijentaciju  $CO_2$  za nukleofilni napad hidroksilnog jona,<sup>65</sup> dok hidrofilni aminokiselinski (AK) ostaci mrežom vodoničnih veza omogućavaju lakši transfer  $H^+$  jona sa molekula vode vezanog za  $Zn^{2+}$  na molekule rastvarača (bulk water).<sup>66</sup> Ovaj korak je olakšan prisustvom aminokiselinskog ostatka u centru aktivnog mesta koji potpomaže reakciju prenosa protona. U većini izoformi KA ovaj ostatak je histidin u položaju 64 (His64). His64 je konformaciono pokretljiv i nakon vezivanja protona iz unutrašnjosti enzima („in“ konformacija) rotira se ka spoljašnjosti enzima („out“). Odsustvo His64 povezano je sa slabijom katalitičkom aktivnošću enzima.<sup>67</sup> Na primer, KA III koja ima najmanju katalitičku aktivnost među svim izoformama KA u položaju 64 ima lizin (Lys) umesto His.<sup>68</sup>



**Slika 15.** Shematski prikaz subćelijske lokacije humanih  $\alpha$ -KA. Adaptirano iz literature.<sup>64</sup>



**Slika 16.** Shematski prikaz aminokiselinskih ostataka u aktivnom mestu KA II. Na slici je prikazan i položaj ugljen-dioksida kao i polarne interakcije u aktivnom mestu.



**Slika 17.** Površina dostupna rastvaraču prikazana na strukturi KA II.

Izoforme KA IX i XII predstavljaju zanimljive mete za dizajn novih antitumorskih lekova.<sup>61,69</sup> U ćelijama raka njihova koncentracija je povećana, dok se istovremeno smanjuje njihova zastupljenost u normalnom tkivu. Uloga KA IX i XII je intenzivna hidratacija ugljen-dioksida, proces u kome se oslobađa H<sup>+</sup> jon što dovodi do povećane kiselosti tumorske ćelije. Povećana ekspresija KA IX i XII je odgovor na hipoksične uslove (smanjena količina kiseonika) koji vladaju u čvrstim tumorima. Na ovaj način ćelija raka postaje sposobna za stvaranje metastaza i istovremeno postaje hemorezistentna na dejstvo slabo baznih antitumorskih lekova.<sup>70</sup> KA IX je prisutna samo u invazivnim, malignim tumorima i iz tog razloga ovaj enzim je značajan i kao marker hipoksičnih tumora.<sup>71</sup> Fluorescentni molekuli sa sulfonamidnom grupom kao strukturnim fragmentom koji koordinuje Zn<sup>2+</sup> (grupa koja vezuje cink - GVC) pokazali su veliki afinitet prema KA IX i u fazi su kliničkih ispitivanja kao marker za hipoksične tumore.<sup>72</sup> Takođe je pokazana veza između inhibicije dejstva KA IX i rasta kako primarnih tumora tako i metastaza.<sup>73</sup> Iz svega navedenog vidi se potreba za razvojem aktivnih, selektivnih inhibitora izoformi KA uključenih u rast i progres hipoksičnih tumora.

Analizom struktura KA kokristalisanih sa inhibitorima uočavaju se dve klase inhibitora:

- grupa koja se direktno koordinuje sa katalitičkim Zn<sup>2+</sup> jonom;

- grupa koja se vezuje u aktivnom mestu ali ne interaguje direktno sa  $Zn^{2+}$  jonom.

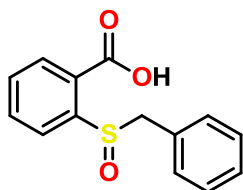
U prvu grupu jedinjenja spadaju hidroksamati/ureati,<sup>74</sup> merkaptofenoli,<sup>75</sup> kompleksirajući anjoni<sup>76</sup> i sulfonamidi i njihovi bioizosteri, sulfamati i sulfamidi.<sup>77-79</sup>

U drugu grupu ulaze jedinjenja sa drugačijim načinom vezivanja od sulfonamida i derivata u kome nema direktne interakcije sa katalitičkim jonom  $Zn^{2+}$ . Alternativni načini vezivanja inhibitora za KA pružaju nove mogućnosti za dizajn i razvoj inhibitora sa izmenjenim mehanizmom dejstva u odnosu na klasične inhibitore sulfonamidnog tipa. Na primer, fenoli<sup>80</sup> i poliamini<sup>81</sup> vezuju se ne za  $Zn^{2+}$  već za  $H_2O/OH^-$  ligand iz koordinacione sfere cinka. Hidrolizovani kumarini i tiokumarini<sup>82,83</sup> vezuju se daleko od katalitičkog jona  $Zn^{2+}$  i inhibiraju enzim začepljenjem ulaza u aktivno mesto, a ne interakcijom sa  $Zn^{2+}$ . Antiepileptični lek lakozamin<sup>84</sup> ima sličan način vezivanja za KA kao i kumarini iako je strukturno bitno različit.

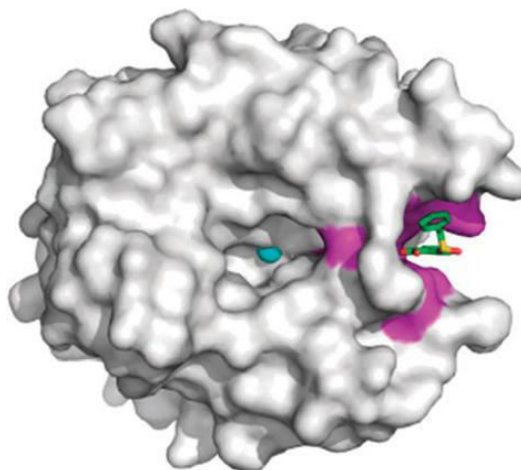
Molekuli koji sadrže karboksilnu grupu kao GVC predstavljaju zanimljivu grupu inhibitora KA jer ispoljavaju veću izoformsku selektivnost u odnosu na sulfonamidne inhibitore, doduše uz manju potentnost. Nije zanemarljiva i niska toksičnost karboksilatnih jedinjenja u odnosu na sulfonamide i hidroksamate. Pokazano je da molekuli sa  $-COOH$  grupom u kristalnim strukturama sa različitim izoformama KA mogu biti vezani za  $Zn^{2+}$  posredno, preko molekula vode kao medijatora, ili se vezuju izvan aktivnog mesta kao što je slučaj sa *orto*-hidroksi cimetnom kiselinom, proizvodom hidrolize kumarina. Sposobnost inhibicije kumarina jako zavisi od tipa supstitucije kumarinskog prstena. Ova grupa inhibitora selektivno inhibira transmembranske izoforme KA IX i XII povezane sa tumorogenezom u niskim mikromolarnim do nanomolarnim koncentracijama.<sup>82,83,85,86</sup>

Određivanjem strukture *orto*-supstituisane benzoeve kiseline, 2-benzilsulfinilbenzoeve kiseline (**Slika 18**) kokristalisane sa KA II nađeno je da se ovo jedinjenje vezuje u do sada neidentifikovano vezivno mesto KA koje se nalazi daleko od aktivnog mesta (**Slika 19**).<sup>87</sup> Putem mreže vodoničnih veza ovaj ligand blokira ostatak His64 u „*out*“ konformaciji, čime se onemogućuje njegova katalitička uloga u prenosu protona iz aktivnog mesta u spoljašnjost. Rezultat ovog vezivanja je inhibicija aktivnosti enzima.





**Slika 18.** Strukturna formula 2-benzilsulfinilbenzoeve kiseline.



**Slika 19.** Površina dostupna rastvaraču prikazana na strukturi KA II. Prostor u koji se vezuje 2-benzilsulfinilbenzoeva kiselina označen je ljubičastom bojom, dok je svetlo plavom bojom označen katalitički jon  $Zn^{2+}$ .

Prirodni proizvodi na bazi fenola pokazali su selektivnije dejstvo ka bakterijskim i fungalnim izoformama KA ( $\beta$ -klasa) u odnosu humane  $\alpha$ -KA. Pošto su  $\beta$ -KA esencijalne za rast mnogih patogenih organizama (*Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans*, *Brucella suis*), njihova inhibicija predstavlja potencijalnu metu za razvoj novih anti-infektivnih agenasa.<sup>80</sup>

Zbog dokazane raznovrsnosti u načinu vezivanja karboksilata za KA, ova grupa jedinjenja ima veliki potencijal za razvoj izoformsko selektivnih inhibitora.<sup>88</sup>

## 2.4. Fizičko-hemijska karakterizacija potencijalnih lekova

U procesu otkrića novih lekova, jako je važno rano prepoznavanje fizičko-hemijskih parametara koji su ključni za ADMET osobine potencijalnog leka. Važni parametri koji se moraju pouzdano odrediti su: čistoća i stabilnost jedinjenja,  $pK_a$  vrednost(i), lipofilnost, rastvorljivost i permeabilnost. Svi ovi podaci u korelaciji su sa strukturom molekula i medicinski hemičari redovno sintetički modifikuju delove molekula radi poboljšavanja ADMET osobina.<sup>89</sup> Ipak, oko 30% svih lekova kandidata biva odbačeno usled nepovoljnih farmakokinetičkih osobina. Ukoliko se ovakve potencijalne teškoće otkriju u kasnim fazama razvoja, troškovi za nalaženje pogodne formulacije leka koji je potentan ali se slabo apsorbuje mogu biti veoma visoki. Zbog toga postoji izrazita potreba za brzim i pouzdanim metodama za filtriranje problematičnih molekula u ranoj fazi dizajna lekova.<sup>90</sup> Biofarmaceutski klasifikacioni sistem (Biopharmaceutics Classification System, BCS) je najpoznatiji pokušaj racionalizacije kritičnih komponenti za oralnu apsorpciju leka.<sup>91</sup>

### 2.4.1. Određivanje $pK_a$ vrednosti

Fizičko-hemijske osobine kao što su rastvorljivost, podeoni koeficijenti oktanol/voda i fosfolipidni dvosloj/voda, permeabilnost kroz membrane i hemijska reaktivnost jonizabilnih molekula zavisne su od  $pK_a$  vrednosti.<sup>92</sup> Stanje protonovanosti je osobina molekula od koje mnogo zavise apsorpcija leka, njegova distribucija do organa, biotransformacija i eliminacija, i može se predvideti ako poznajemo  $pK_a$  vrednost(i) molekula i pH sredine u kojoj se supstanca nalazi.<sup>89</sup>

Zbog svega navedenog, u dizajnu novih lekova u okviru farmaceutske industrije u ranim fazama istraživanja koriste se podaci o  $pK_a$  vrednostima lekova-kandidata i iz daljeg proučavanja odbacuju se molekuli sa potencijalno nepovoljnim ADMET osobinama. Podaci o  $pK_a$  vrednostima se uglavnom dobijaju na osnovu predviđanja pomoću različitih softvera, koja po pravilu značajno odstupaju od stvarnih  $pK_a$  vrednosti (ponekad i za 1-2  $pK_a$  jedinice). Zato je veoma značajno eksperimentalno tačno odrediti  $pK_a$  vrednosti što većeg i strukturno raznovrsnijeg seta molekula, koji bi omogućio bolje „treniranje“ programa, što bi dovelo do tačnijih predviđanja  $pK_a$  vrednosti.

Zbog značaja koji stanje protonovanosti ima za farmakokinetiku leka, FDA i OECD (Organizations for Economic Cooperation and Development) zahtevaju da se za sve nove hemijske supstance eksperimentalno odrede  $pK_a$  vrednosti i daju kao deo dokumentacije pri prijavi novog leka.

Opseg pH vrednosti u čovečijem organizmu je prilično veliki. Unutar ćelije, pH vrednost se kreće od 4,5 u lizozimima do 8 koliko iznosi pH unutar mitohondrija.<sup>93</sup> pH Vrednost u okviru gastro-intestinalnog trakta (GIT) je važna za pasivnu apsorpciju oralno unetih lekova. Različiti delovi GIT imaju različite pH vrednosti, a pH profil GIT značajno se menja unošenjem hrane.<sup>90</sup> S obzirom da su većina lekova slabe kiseline ili baze sa  $pK_a$  vrednostima od 5 do 8, njihovo stanje protonovanosti može se značajno promeniti u oblasti oko neutralnog pH, što će bitno uticati na apsorpciju ovih molekula.

Eksperimentalno određivanje  $pK_a$  vrednosti može biti veoma zahtevno zbog toga što su organski molekuli često slabo rastvorni u vodenim rastvorima. Potencimetrija je metoda izbora za određivanje  $pK_a$  molekula čija je rastvorljivost bar  $1 \times 10^{-4}$  M u pH oblasti od značaja. U slučaju manje rastvorljivosti,  $pK_a$  vrednosti mogu se određivati u smešama različitih odnosa organskog rastvarača i vode i ekstrapolacijom na 0% organskog rastvarača, pri čemu je metanol najčešće korišćeni korastvarač.<sup>94</sup> Uobičajena eksperimentalna procedura sastoji se od dodatka malih, poznatih zapremina standardnog rastvora jake kiseline ili baze rastvoru jonizabilne supstance čija se  $pK_a$  vrednost određuje. Nakon svakog inkrementa meri se pH vrednost rastvora. Titracije se izvode uz prisustvo inertnog elektrolita (najčešće KCl u koncentraciji 0,15 M) koji se dodaje radi održavanja konstantne jonske sile, čime se promena koeficijenta aktiviteta ispitivane supstance tokom titracije dovodi na malu do zanemarljivu vrednost. Značaj primene inertnog elektrolita u ovoj koncentraciji je i to što se time simulira fiziološka koncentracija soli.

Određivanje  $pK_a$  vrednosti primenom elektrohemijskih metoda zasniva se na merenju elektromotorne sile (EMS) u galvanskim elementima u kojima potencijal elektrode zavisi od aktiviteta hidronijum jona. Ova metoda se zasniva na potencimetrijskoj titraciji rastvora ispitivane supstance, poznate stehiometrijske koncentracije, standardnim rastvorom jake kiseline ili jake baze. U svakoj tački titracije meri se potencijal elektrode u rastvoru u zavisnosti od zapremine dodatog titracionog

sredstva. Staklena (odnosno kombinovana) elektroda i celokupni sistem može se kalibrisati *Grann*-ovom metodom nakon prethodno izvedene titracije standardnog rastvora jake kiseline standardnim rastvorom jake baze (ili obrnuto) u prisustvu pozadinskog elektrolita. Ovaj postupak omogućava korišćenje staklene elektrode u određivanju kiselinskih konstanti i softverski paket GLEE (Glass Electrode Evaluation) radi na ovaj način.<sup>95</sup>

U idealnom slučaju staklena elektroda reaguje na aktivnost  $\text{H}_3\text{O}^+$  jona prema Nernstovoj jednačini:

$$E = k + \frac{RT}{nF} \ln a_{\text{H}_3\text{O}^+} \quad (1)$$

gde  $E$  predstavlja potencijal elektrode u rastvoru,  $k$  konstantni potencijal elektrode (karakteristika svake jon-selektivne elektrode),  $R$  je univerzalna gasna konstanta ( $8,314 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ ),  $T$  je temperatura (u K),  $F$  Faradejeva konstanta ( $96485 \text{ C}$ ),  $n$  je broj razmenjenih elektrona (1 u slučaju staklene elektrode), a  $a_{\text{H}_3\text{O}^+}$  je aktivitet hidronijum jona u ispitivanom rastvoru.

Izračunavanja u programu GLEE se zasnivaju na empirijskoj jednačini (koja se dobija modifikacijom Nernstove jednačine) u kojoj figuriše koncentracija  $\text{H}_3\text{O}^+$  jona:

$$E = k + s \log c_{\text{H}_3\text{O}^+} \quad (2)$$

gde  $s$  predstavlja nagib koji treba da ima vrednost što bližu vrednosti Nernstovog nagiba od  $59,1 \text{ mV}$  na temperaturi  $298 \text{ K}$ . Parametri  $k$  i  $s$  (koje dobijamo kao izlazne podatke) se izračunavaju metodom najmanjih kvadrata.

Merena pH vrednost takođe se može dovesti u vezu sa koncentracijom vodoničnih jona ( $\text{p}c_{\text{H}} = -\log[\text{H}_3\text{O}^+]$ ) u rastvoru primenom Avdeef-Bucher-ove četvoroparametarske jednačine<sup>96</sup>:

$$\text{pH} = \alpha + k_s \cdot \text{p}c_{\text{H}} + j_{\text{H}^+} [\text{H}_3\text{O}^+] + j_{\text{OH}^-} \left[ \frac{K_w}{[\text{H}_3\text{O}^+]} \right] \quad (3)$$

gde je  $K_w$  jonski proizvod vode na  $25^\circ\text{C}$ ; parametri  $\alpha$ ,  $k_s$ ,  $j_{\text{OH}^-}$  i  $j_{\text{H}^+}$  se određuju nelinearnim fitovanjem prema eksperimentalnim podacima iz titracije  $0,15 \text{ M KCl}$ , u koji je dodata poznata zapremina standardnog rastvora  $\text{HCl}$ , standardnim rastvorom

KOH.  $\alpha$  Predstavlja procenjeni koeficijent aktiviteta  $H^+$  jona u rastvoru. Idealna vrednost za  $k_s$  (korekcija nagiba) je 1,000, ali vrlo često elektrode odstupaju od idealnog Nernstovskog nagiba.  $j_{H^+}$  Predstavlja korekciju merenja pH vrednosti u jako kiseljoj sredini (pH 1,5 – 2,5) a  $j_{OH^-}$  je parametar za korekciju pH vrednosti u jako baznoj sredini (pH > 11).

U osnovi potenciometrijskog određivanja  $pK_a$  vrednosti nalazi se funkcija građenja,  $\bar{n}_H$ .<sup>97</sup> Funkcija građenja predstavlja prosečan broj vezanih protona po molu kiseline, a sa kiselinskom konstantom povezana je relacijom:

$$\frac{\bar{n}_H}{1 - \bar{n}_H} = \frac{K_a^c}{[H_3O^+]} \quad (4)$$

Na primer, slaba monoprotična kiselina čija je  $pK_a$  4,5 ima vrednost  $\bar{n}_H=1,0$  na pH vrednosti  $\leq 2,5$ ,  $\bar{n}_H=0,5$  na pH 4,5 i  $\bar{n}_H=0,0$  na pH  $\geq 6,5$ .

Zavisnost data jednačinom (4) predstavlja linearnu funkciju čiji je odsečak nula, a nagib odgovara vrednosti  $K_a^c$ . Funkcija građenja  $\bar{n}_H$  jednostavno se izračunava iz eksperimentalnih podataka pomoću jednačine:

$$\bar{n}_H = \frac{[H_3O^+]_{tot} - [H_3O^+] - [NaOH]}{c_{HA}} \quad (5)$$

gde je  $[H_3O^+]_{tot} = c_{HA} + [OH^-]$ , odnosno predstavlja ukupnu koncentraciju protona koji potiču od ispitivane kiseline ( $c_{HA}$ ) i vode ( $[OH^-]$ );  $[NaOH]$  predstavlja koncentraciju dodatog standardnog rastvora baze tokom titracije a  $[H_3O^+]$  koncentraciju slobodnih  $H_3O^+$  jona koja se dobija merenjem pH vrednosti.

U današnje vreme  $pK_a$  vrednosti se izvode iz potenciometrijskih titracija primenom različitih softverskih paketa za obradu podataka. Jedan od takvih programa je i HYPERQUAD 2008 (HQ). HQ predstavlja softverski paket koji se koristi za proučavanje ravnoteža u rastvorima i izračunavanje raznovrsnih konstanti ravnoteže.<sup>98</sup> Sastoji se od 10 potprograma koji obuhvataju segmente za potpunu pripremu i statističku obradu eksperimentalnih podataka (spektrofotometrijskih, potenciometrijskih, NMR spektroskopskih i termohemijskih), kao i za doterivanje eksperimentalnih vrednosti konstanti iterativnim postupkom. Fitovanje

eksperimentalnih podataka se može izvesti podešavanjem svih unetih parametara za dati sistem (početne koncentracije i zapremine ispitivane supstance, koncentracije titracionog sredstva i broj jonizacionih centara). Fitovanje se takođe može izvesti automatski, prema sistemski definisanim parametrima.

U slučaju potenciometrijskog određivanja kiselinskih konstanti jedinjenja koja imaju veći broj jonizacionih centara, a kada nam nije poznato koliko njih jonizuje u datom pH intervalu, postavljanjem različitih modela i procenom kvaliteta dobijenog fita možemo izvesti zaključak o broju centara koji su jonizovani. Klasična obrada rezultata dobijenih potenciometrijskim kiselinsko-baznim titracijama podrazumeva da je stanje ravnoteže u proučavanom rastvoru potpuno poznato. Prilikom potenciometrijskog određivanja konstanti kiselosti softverom se mogu proučavati i kiseline i baze sa više od tri stepena disocijacije. Kod klasičnog načina obrade podataka ovo nije moguće jer su matematičke relacije koje se koriste za izračunavanje konstanti kiselosti kod supstanci sa više od tri stepena disocijacije previše komplikovane.

UV-Vis spektrofotometrijska metoda za određivanje  $pK_a$  vrednosti je osetljivija i zahteva manje uzorka (10 do 100 puta) od potenciometrijske metode. Za praktično nerastvorne molekule ova metoda je od izrazitog značaja. Primena spektrofotometrije za određivanje  $pK_a$  vrednosti moguća je samo za supstance koje apsorbuju u ultraljubičastoj i/ili vidljivoj oblasti i kod kojih je mesto jonizacije konjugovano sa hromofornim centrom ili mu pripada.

Spektrofotometrijsko određivanje se zasniva na merenju spektralnih promena izazvanih jonizacijom supstance u rastvorima različite kiselosti. Pod uslovom da postoji razlika između spektara molekulskog i jonizovnog oblika, pri svakoj merenoj pH vrednosti moguće je izračunati odnos koncentracija čestica konjugovanog kiselinsko-baznog para. Maksimalna osetljivost određivanja se postiže merenjem apsorbancije rastvora na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma ( $\lambda_{max}$ ), ali se za izračunavanje može koristiti i talasna dužina na kojoj je razlika apsorbancija protonovanog i deprotonovanog oblika veća nego na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma ( $\lambda_{opt}$ ). Na osnovu poznatih vrednosti apsorbancija i uz poznate pH vrednosti serije rastvora, može se odrediti vrednost  $pK_a$  na osnovu relacije (6):

$$pK_a = \text{pH} + \log \frac{A - A_{A^-}}{A_{\text{HA}} - A} \quad (6)$$

gde su  $A_{\text{HA}}$  i  $A_{A^-}$  apsorbancije čistog molekuskog odnosno jonizovanog oblika ispitivane supstance, a  $A$  je apsorbancija rastvora koja sadrži smešu oba oblika na određenoj pH vrednosti. Ukoliko nije moguće dobiti spektre oba čista oblika, prethodna relacija se može transformisati u jedan od sledećih oblika (7, 8):

$$A = (A_{\text{HA}} - A) \cdot [\text{H}_3\text{O}^+] \cdot \frac{1}{K_a} + A_{A^-} \quad (7)$$

koji se koristi za eksperimentalno određivanje  $pK_a$ , kada je poznat samo spektar kiselog (HA) oblika ili:

$$A = \frac{A_{A^-} - A}{[\text{H}_3\text{O}^+]} \cdot K_a + A_{\text{HA}} \quad (8)$$

koji se koristi za eksperimentalno određivanje  $pK_a$  vrednosti kada je poznat samo spektar baznog ( $A^-$ ) oblika. Iz navedenih jednačina se vidi da je za određivanje kiselinskih konstanti dovoljno poznavanje apsorbancije samo jednog čistog oblika. Apсорbancija drugog oblika, kao i vrednost kiselinske konstante, mogu da se odrede primenom linearne regresione analize iz odsečka i nagiba odgovarajuće prave.<sup>99</sup>

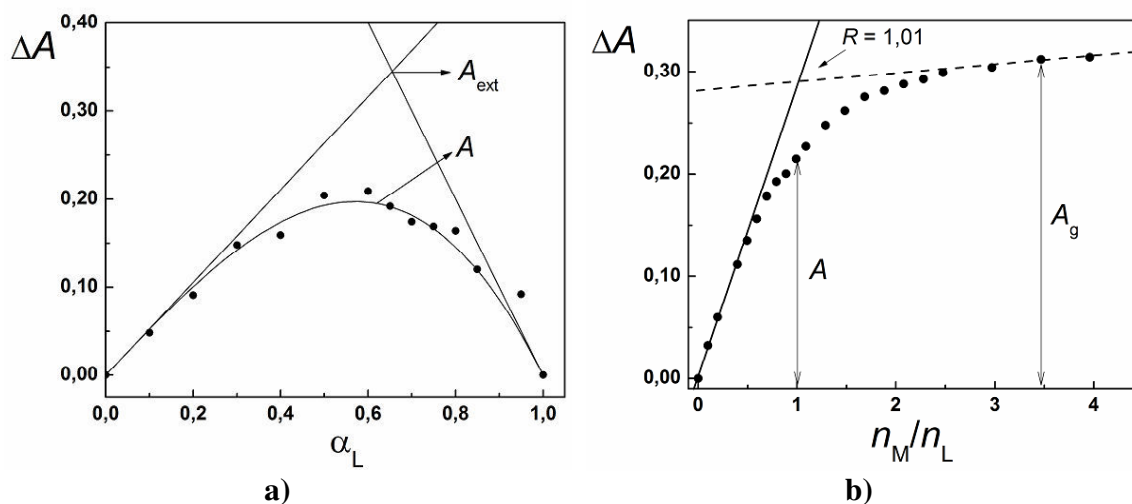
Izračunavanja ovom tradicionalnom metodom teško su primenljiva na poliprotične sisteme sa bliskim  $pK_a$  vrednostima ( $\Delta pK_a \leq 4$ ). Velika mana ove metode je i to što je veoma vremenski zahtevna. Za rešavanje ovih problema razvijene su metode koje uzimaju u obzir celokupne spektralne podatke (multi wavelength, MW) a ne samo apsorbancije na  $\lambda_{\text{opt}}$  ili  $\lambda_{\text{max}}$  (HQ ima ovu mogućnost). Ovaj program tretira  $pK_a$  vrednosti i molarne apsorpcione koeficijente jonizovanih čestica kao promenljive parametre, čime se obrada podataka znatno komplikuje. Urađeno je sistematsko poređenje i validacija MW metode u odnosu na tradicionalnu metodu i rezultati su se odlično slagali, kako međusobno tako i sa literaturno prijavljenim podacima.<sup>100</sup>

Spektrofotometrija i potenciometrija su najčešće korišćene metode za određivanje  $pK_a$  vrednosti. Jednostavnost i brzina određivanja, kao i niska cena aparata i potrebnih reagenasa čine da se ove dve metode i danas nalaze u širokoj upotrebi. Za određivanje konstanti kiselosti mogu se koristiti i  $^1\text{H}$  NMR spektroskopija,<sup>101</sup> visokoefikasna tečna hromatografija,<sup>102</sup> kapilarna elektroforeza<sup>103</sup> i druge metode kojima se može detektovati razlika u ponašanju jonizovanih i molekuskog oblika supstance.

#### 2.4.2. Određivanje konstante stabilnosti kompleksa, kompleksiranje ADK sa metalnim jonima

Prve indikacije o sposobnosti ADK ka kompleksiranju metalnih jona dobijene su iz masenih spektara tokom rutinske karakterizacije novosintetisanih jedinjenja.<sup>104</sup> Kod *meta*-alkil supstituisanih ADK intenzitet jona  $2(M-1)+Na$  je značajno veći od jona  $2M-1$ , dok je kod *para*-supstituisanih derivata jon  $2M-1$  bio intenzivniji. Ovi rezultati ukazuju na bolju sposobnost kompleksiranja metalnih jona *meta*-alkil supstituisanih ADK.<sup>104</sup> U istom radu Job-ovom spektrofotometrijskom metodom<sup>105</sup> ispitan je sastav i stabilnost kompleksa ADK sa  $Mg^{2+}$  jonom i nađeno je da najverovatnije nastaju kompleksi tipa  $ML_2$  sa kumulativnim konstantama stabilnosti ( $\log\beta$ ) oko 10. U literaturi su prijavljene konstante stabilnosti kompleksa ADK sa različitim metalnim jonima ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ , kao i  $Ca^{2+}$  i  $Mn^{2+}$ ),<sup>2,3</sup> dobijene kiselinско-baznim potenciometrijskim titracijama uz softversku obradu podataka.<sup>98</sup>

Job-ova spektrofotometrijska metoda (**Slika 20a**)<sup>105,106</sup> i metoda molskog odnosa (**Slika 20b**)<sup>107</sup> predstavljaju dve tradicionalne metode za određivanje sastava i stabilnosti kompleksa. Obe metode imaju određena ograničenja: kompleks mora da se ponaša u skladu sa Beer-ovim zakonom apsorpcije, u sistemu mora da se gradi samo jedan kompleks bez sporednih reakcija kao što je hidroliza metala ili promena stanja protonovanosti liganda i jonska sila mora biti konstantna u toku merenja.



**Slika 20.** a) Primer grafika zavisnosti apsorpcije kompleksa ( $\Delta A$ ) od molskog udela liganda u kompleksu kod određivanja sastava kompleksa tipa  $ML_2$  Job-ovom metodom; b) primer grafika zavisnosti apsorpcije kompleksa ( $\Delta A$ ) od molskog odnosa metal:ligand kod određivanja sastava kompleksa tipa  $ML$  metodom molskog odnosa.



Najčešća upotreba Job-ove metode je u određivanju koeficijenata  $a$  i  $b$  ravnotežne reakcije tipa:



gde  $M$  i  $L$  predstavljaju slobodni metal i ligand u rastvoru, a  $M_aL_b$  njihov kompleks. Ova metoda je opšta i može poslužiti za određivanje stehiometrije bilo koje hemijske ravnoteže, od kojih je reakcija kompleksiranja metala sa ligandima najčešće ispitivana.

U okviru Job-ove metode, izmerena koncentracija kompleksa (ili fizičke veličine koja je proporcionalna koncentraciji kompleksa kao što su apsorbancija, jačina struje, površina NMR signala itd.) predstavlja se grafički u zavisnosti od promenljivog udela jednog reaktanta, dok se ukupna koncentracija reaktanata drži konstantnom. Položaj maksimuma koncentracije kompleksa odgovara stehiometriji nagrađenog kompleksa (**Slika 20a**). Svi grafici Job-ovog tipa imaju pseudo trouglasti oblik i položaj maksimuma se određuje ekstrapolacijom linearnih delova krive. Što je kompleks stabilniji, kriva je oštija i  $y$ -vrednosti se približavaju ekstrapolisanim.

Metoda molskog odnosa predstavlja modifikaciju Job-ove metode i osnovna prednost joj je u tome što je eksperimentalno mnogo jednostavnija. Naime, u ovoj metodi koncentracija jednog reaktanta se drži konstantnom i titruje rastvorom drugog reaktanta koji se na kraju titracije mora nalaziti u velikom višku. Koncentracija kompleksa se predstavlja u zavisnosti od molskog odnosa reaktanata (**Slika 20b**). Ekstrapolacijom linearnih delova krive dobija se vrednost  $R$  koja odgovara stehiometriji kompleksa. Stabilniji kompleksi imaju strmiji porast  $y$ -vrednosti.

Kod Job-ove metode konstanta stabilnosti kompleksa se lako može izračunati ako se koncentracija kompleksa aproksimira sledećom jednačinom:

$$\frac{A}{A_{\text{ext}}} = \frac{[ML]}{C} \quad (10)$$

gde je  $C$  ukupna koncentracija metala i liganda a  $C_M$  i  $C_L$  stehiometrijske koncentracije  $M$  i  $L$ . Zamenom u izraz za konstantu stabilnosti kompleksa tipa  $ML$  dobija se vrednost konstante stabilnosti,  $K$ :

$$K = \frac{[\text{ML}]}{[\text{M}][\text{L}]} = \frac{\frac{A}{A_{\text{ext}}} \cdot C}{\left(C_{\text{M}} - \frac{A}{A_{\text{ext}}} \cdot C\right) \left(C_{\text{L}} - \frac{A}{A_{\text{ext}}} \cdot C\right)} \quad (11)$$

Primenom sličnih aproksimacija dolazi se do izraza za konstantu stabilnosti iz metode molskog odnosa:

$$[\text{ML}] = \frac{A}{A_{\text{g}}} \cdot C \quad (12)$$

Iz jednačine 12 izvodi se izraz za  $K$  kompleksa tipa ML:

$$K = \frac{\frac{A}{A_{\text{g}}} \cdot C}{C^2 \cdot \left(1 - \frac{A}{A_{\text{g}}}\right)^2} \quad (13)$$

Radi dobijanja pouzdanijih rezultata, molarni apsorpcioni koeficijent kompleksa ( $\epsilon_{\text{ML}}$ ) se takođe uzima kao nepoznata veličina. Konstanta stabilnosti kompleksa tada se može izračunati pomoću Rose-Drago metode,<sup>108,109</sup> čije je izvođenje za kompleks tipa 1:1 prikazano u daljem tekstu.

Za jednačinu opšteg tipa:



izvedene su sledeće jednačine (15-17):

$$K = \frac{[\text{ML}]}{[\text{M}][\text{L}]} \quad (15)$$

$$[\text{M}]_{\text{tot}} = [\text{M}] + [\text{ML}] \quad (16)$$

$$[\text{L}]_{\text{tot}} = [\text{L}] + [\text{ML}] \quad (17)$$

gde su  $[\text{M}]_{\text{tot}}$  i  $[\text{L}]_{\text{tot}}$  stehiometrijske koncentracije metala i liganda,  $[\text{M}]$  i  $[\text{L}]$  ravnotežne koncentracije metala i liganda a  $[\text{ML}]$  predstavlja ravnotežnu koncentraciju kompleksa.

Ravnotežna koncentracija kompleksa može se odrediti pomoću sledeće jednačine (18):

$$[\text{ML}] = \frac{A_{\text{obs}} - \varepsilon_{\text{M}} [\text{M}]_{\text{tot}} - \varepsilon_{\text{L}} [\text{L}]_{\text{tot}}}{\varepsilon_{\text{ML}} - \varepsilon_{\text{M}} - \varepsilon_{\text{L}}} \quad (18)$$

gde je  $A_{\text{obs}}$  izmerena apsorbanacija rastvora a  $\varepsilon$  predstavljaju molarne apsorpcione koeficijente odgovarajućih čestica u rastvoru.

Molarni apsorpcioni koeficijenti metala ( $\varepsilon_{\text{M}}$ ) i liganda ( $\varepsilon_{\text{L}}$ ) se određuju u zasebnim eksperimentima. Eksperimentalno dobijeni podaci ( $A_{\text{obs}}$ ,  $\varepsilon_{\text{M}}$ ,  $\varepsilon_{\text{L}}$ ,  $[\text{M}]_{\text{tot}}$ ,  $[\text{L}]_{\text{tot}}$ ) uvršteni su u jednačinu (18) radi izračunavanja  $[\text{ML}]$ . Pošto se molarni apsorptivitet kompleksa ( $\varepsilon_{\text{ML}}$ ) ne može izmeriti direktno, sakupljaju se podaci o  $A_{\text{obs}}$  pri različitim odnosima  $[\text{M}]_{\text{tot}}$  i  $[\text{L}]_{\text{tot}}$ , nakon čega sledi regresiona analiza pomoću jednačine (19), dobijene kombinacijom jednačina 15-18:

$$\frac{1}{K} = \frac{A_{\text{obs}} - \varepsilon_{\text{M}} [\text{M}]_{\text{tot}} - \varepsilon_{\text{L}} [\text{L}]_{\text{tot}}}{\varepsilon_{\text{ML}} - \varepsilon_{\text{M}} - \varepsilon_{\text{L}}} - ([\text{M}]_{\text{tot}} + [\text{L}]_{\text{tot}}) + \frac{\varepsilon_{\text{ML}} - \varepsilon_{\text{M}} - \varepsilon_{\text{L}}}{A_{\text{obs}} - \varepsilon_{\text{M}} [\text{M}]_{\text{tot}} - \varepsilon_{\text{L}} [\text{L}]_{\text{tot}}} \cdot [\text{M}]_{\text{tot}} [\text{L}]_{\text{tot}} \quad (19)$$

gde je  $K$  konstanta stabilnosti kompleksa tipa ML.

Matrica različitih odnosa  $[\text{M}]_{\text{tot}}$  i  $[\text{L}]_{\text{tot}}$  daje matricu vrednosti dveju nepoznatih:  $K$  i  $\varepsilon_{\text{ML}}$ . Statističkom obradom dobijenih rezultata, vodeći računa o fizičkom smislu dobijenih podataka, dolazi se do rezultata za  $K$  i  $\varepsilon_{\text{ML}}$ .

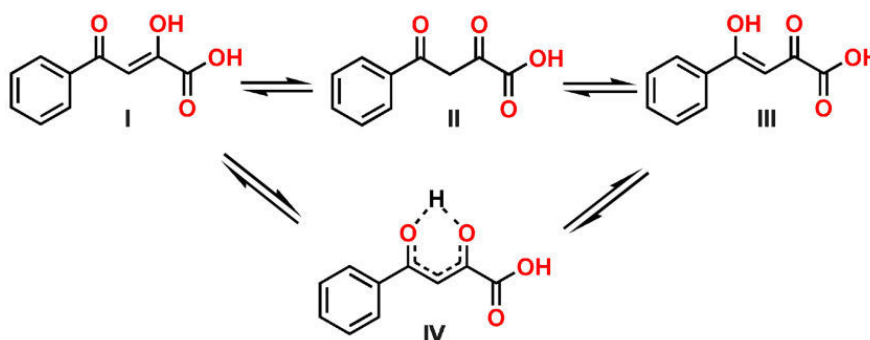
Pored  $\varepsilon_{\text{ML}}$  kao promenljiva veličina može se postaviti i maksimalna y-vrednost ( $A_{\text{g}}$ , **Slika 20b**).<sup>110</sup> U ovom slučaju vrednosti  $K$  kao i stehiometrijskih koeficijenata dobijaju se nelinearnim fitovanjem prema unapred zadatom modelu. Posmatra se preklapanje eksperimentalne sa predviđenom krivom i u slučaju da se krive u značajnoj meri ne poklapaju, a eksperimentalne greške su svedene na minimum, predviđeni model nije dobar. Na ovaj način moguće je razlučiti komplekse višeg reda (npr.  $\text{M}_2\text{L}_2$ ) od ML kod Job-ovih grafika sa  $\alpha = 0,5$  i grafika molskog odnosa sa  $R = 1$ .<sup>111,112</sup> Važno je napomenuti da se nelinearnim fitovanjem uzimaju u obzir sve tačke sa grafika, dok se klasičnim metodama (jednačine 11 i 13) izračunavanja izvode samo u tački koja odgovara stehiometriji kompleksa. Kod određivanja konstante stabilnosti kompleksa metodom molskog odnosa upotrebljava se i bilogaritamska metoda kojom se izbegavaju problemi koji nastaju linearnim fitovanjem hiperbolične funkcije.<sup>113</sup>

U okviru ove disertacije određene su konstante stabilnosti kompleksa serije ADK sa  $Zn^{2+}$  jonom metodom molskog odnosa. Vrednosti  $K$  izračunate su na dva načina: pomoću jednačine 13 i Rose-Drago metodom.

#### 2.4.3. Tautomerija arildiketo kiselina i aril-pirazol-karboksilnih kiselina

Prilikom vezivanja malih organskih molekula za biološku metu, veoma je važno poznavati tautomerne osobine molekula jer različiti tautomeri imaju različitu sposobnost građenja vodoničnih veza usled drugačijeg rasporeda HBD/HBA grupa,<sup>114</sup> kao i različitu sposobnost interakcije sa metalnim jonima.<sup>115</sup> Takođe, hidrolitičko raskidanje C–C veze 1,3-dikarbonilnih jedinjenja dejstvom  $\beta$ -ketolaza veoma je zavisno od tautomernog oblika u kom se  $\beta$ -diketo jedinjenje nalazi u rastvoru.<sup>116</sup>

ADK spadaju u grupu enolizabilnih 1,3-diketona i mogu se nalaziti u nekoliko tautomernih oblika (**Slika 21**). Enolni oblici (**I** i **III**) su konformaciono manje pokretljivi od diketo oblika (**II**) usled postojanja krutog, pseudo-šestočlanog prstena (**IV**).



**Slika 21.** Tautomerija 4-fenil-2,4-dioksobutanske kiseline u vodenom rastvoru.

NMR spektroskopija i DFT izračunavanja 2-fenil-1,3-indandiona (cikličnog 1,3-diketona, **Slika 22a**) i derivata pokazali su da je dominantni oblik ovih jedinjenja u DMSO-u, kao i kod ADK, enolni oblik.<sup>117</sup>

Rastvarač može menjati relativnu zastupljenost keto/enol tautomera. U nepolarnim rastvaračima favorizovani su enolni oblici ADK, dok polarni rastvarači mogu pomerati ravnotežu u smeru diketo oblika jer imaju sposobnost da raskinu intramolekulsku O–H $\cdots$ O vezu. NMR proučavanjem zastupljenosti različitih tautomernih oblika 3-acetil-4-oksopentanske kiseline (AOPK, **Slika 22b**) u zavisnosti

od rastvarača pokazano je da udeo diketo tautomera opada sa smanjenjem dielektrične konstante rastvarača ( $\epsilon$ ).<sup>118</sup>



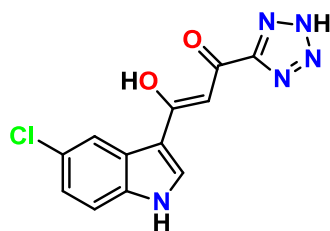
**Slika 22.** Struktura a) 2-fenil-1,3-indandiona; b) AOPK.

Na relativnu zastupljenost keto/enol tautomera veliki uticaj ima i pH vrednost sredine. U slučaju AOPK, sa porastom pH vrednosti rastvora dolazi do sukcesivne disocijacije prvo karboksilnog a zatim i protona enolne  $-OH$  grupe i povećava se zastupljenost enolnog tautomera.<sup>118</sup>

Detaljna proučavanja tautomerije 4-alkil i 4-aril-2,4-dioksobutanskih kiselina (ADK) pomoću NMR spektroskopije pokazala su da se u aprotičnom rastvaraču one predominantno nalaze u obliku enola **I** (Slika 21). U vodenoj sredini ADK su slabo rastvorne i autori nisu uspeli da razluče signale različitih tautomernih oblika, niti su snimani spektri na pH ispod pH 5,5.<sup>116</sup>

Pomoću 2D NMR spektroskopije, uz višednevno prikupljanje NMR signala usled male rastvorljivosti molekulskog oblika ADK, utvrđeno je da je dominantni tautomerni oblik ADK u vodenom rastvoru veoma velike kiselosti ( $CF_3COOD$ ,  $pD < 0$ ) enolni oblik **I**.<sup>119</sup>

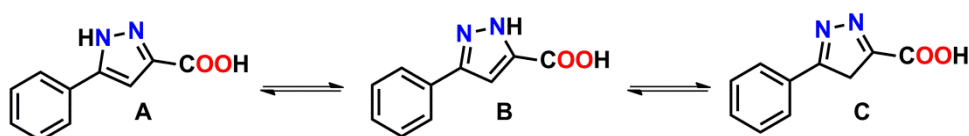
U literaturi su opisani brojni pokušaji teorijskog izračunavanja stabilnosti keto/enol tautomera i njihove relativne zastupljenosti u zavisnosti od uticaja rastvarača. Kvantno-hemijskim proučavanjem strukture i stabilnosti inhibitora HIV-1 IN: L-731,988 (Slika 2) i 5-CITEP-a (Slika 23), nađeno je da su enolni oblici stabilniji od diketo oblika, uz razlike u energijama od 15 do 28 kJ/mol.<sup>120</sup> Dva enolna oblika razlikovala su se za svega 3 kJ/mol i pošto praktično ne postoji barijera između dva enolna oblika predloženo je da se oni mogu lako prevesti iz jednog oblika u drugi. Pretpostavlja se da je dominantni oblik ovih jedinjenja u rastvoru oblik sa delokalizovanim šestočlanim prstenom (analog oblika **IV**, Slika 21).



**Slika 23.** Struktura 5-CITEP-a.

Poznato je da su rezultati dobijeni primenom PCM (Polarizable Continuum Model) modela solvatacije često slabi u predviđanju uticaja rastvarača kako na tautomernu ravnotežu tako i na geometriju molekula. Doprinosi slobodnoj energiji solvatacije nisu ograničeni samo na efekte polarizacije koji su dobro opisani modelom dielektričnog kontinuuma, već uključuju i vodonično vezivanje i polarne interakcije.<sup>121</sup> Eksplicitni modeli rastvarača kao što je ONIOM-XS<sup>122</sup> mogu dati rezultate koji su u boljoj korelaciji sa realnom raspodelom tautomernih oblika u rastvoru.

APK mogu postojati u tri tautomerna oblika označena slovima od **A** do **C** (Slika 24).



**Slika 24.** Tri tautomera aril-pirazol-karboksilnih kiselina.

Dva oblika sa protonovanim pirazolskim azotima (**A** i **B**) su mnogo verovatnija od tautomera **C**, prema predikciji pomoću programa ADMET predictor.<sup>123</sup> Iz kristalne strukture APK utvrđeno je da je u čvrstom stanju prisutan samo tautomer **A**.<sup>124</sup> S obzirom da u literaturi nisu pronađeni detaljniji podaci o tautomeriji APK u rastvoru, u okviru ove disertacije određen je dominantni tautomerni oblik primenom NMR spektroskopije.

#### 2.4.4. Elektrohemijsko ponašanje diketokiselina i jedinjenja tipa $\beta$ -diketona

Klasični  $\beta$ -diketoni privlače pažnju dugi niz godina prevažodno zbog sposobnosti ka građenju različitih koordinacionih jedinjenja. Kompleksi  $\beta$ -diketona sa lantanidima pokazuju izuzetne optičke karakteristike. Ovi kompleksi se dodaju npr. poroznim materijalima na bazi zeolita radi poboljšavanja luminiscentnih svojstava

materijala. Luminiscentni senzor za detekciju baznih supstanci (kao što su amini) razvijen je dodatkom kompleksa Eu(III) sa  $\beta$ -diketonima unutar pora nanozeolita. Promenom pH vrednosti sredine luminiscentna emisija ovog materijala pomera se iz plave u crvenu oblast.<sup>125</sup> Helatni kompleksi Pt(II) sa  $\beta$ -diketonima koriste se kao fosforescentni aditivi u uređajima koji emituju svetlost na bazi organskih molekula (Organic Light Emiting Diode, OLED).<sup>126</sup> Organski molekul koji se nalazi u ovim diodama obično poseduje konjugovani  $\pi$ -sistem, jer od razlike u energijama HOMO i LUMO orbitale zavisi u kojoj oblasti vidljivog spektra će OLED emitovati svetlost.

Kompleksi prelaznih metala sa  $\beta$ -diketonima imaju ulogu katalizatora u sintezi mnogih farmaceutski važnih jedinjenja<sup>127</sup> kao i drugih funkcionalnih materijala.<sup>128</sup> Pošto mehanizmi katalize kompleksima prelaznih metala često uključuju oksidaciju/redukciju katalizatora, neophodno je poznavanje njihovih redoks osobina radi dizajna efikasnijih katalizatora. U literaturi su opisani mnogi primeri elektrohemijskog i teorijskog proučavanja redoks osobina kompleksa metala sa  $\beta$ -diketonima.<sup>129,130</sup>

Prilikom elektrohemijske reakcije neutralni organski molekul prima ili otpušta jedan elektron gradeći radikal anjon odnosno radikal katjon. Molekuli sa konjugovanim sistemima  $\pi$ -elektrona imaju veću verovatnoću za stupanje u reakcije transfera elektrona sa relativno niskim redoks potencijalima. Elektrohemijско ponašanje nekoliko  $\beta$ -diketona<sup>131</sup> pokazalo je da se redoks osobine keto i enol oblika razlikuju, ali se razlike između dva enolna oblika ne mogu uočiti zbog brze interkonverzije dva enolna tautomera.<sup>132</sup> Od stabilnosti nastale radikalske čestice zavisi da li će elektrohemijaska reakcija biti reverzibilna ili ireverzibilna (radikalska čestica podleže daljoj hemijskoj promeni - EC mehanizam). Proučavanjem reverzibilnosti elektrohemijske reakcije različito supstituisanih  $\beta$ -diketona u položajima 1 i 3, uočeno je da reverzibilne ciklične voltamograme pokazuju samo derivati sa aromatičnim prstenovima kao supstituentima.<sup>133</sup> Pošto je eksperimentalno prvo izvođena oksidacija, nastali radikal katjon je bio dodatno stabilizovan pomoću dva aromatična prstena. Derivati sa jednim ili dva alifatična supstituenta pokazivali su ireverzibilne ciklične voltamograme.

Osim polagrafskog ponašanja četiri metil-estra ADK u pH opsegu 2-12 u smeši 20% izopropanola i vode kao rastvaraču,<sup>134</sup> u literaturi nisu pronađeni drugi podaci o elektrohemijским osobinama ADK.

## **2.5. Analiza odnosa strukture i aktivnosti jedinjenja, upotreba polja molekulskih interakcija u QSAR-u**

Prvi radovi u kojima je tumačena veza između strukture i biološke aktivnosti jedinjenja objavljeni su još u XIX-om veku.<sup>135</sup> Početkom dvadesetog veka Meyer i Overton su nezavisno jedan od drugog pronašli linearnu relaciju između lipofilnosti molekula, izraženu kroz particioni koeficijent između ulja i vode, i narkotičkog dejstva molekula.<sup>136,137</sup> Narednih 70 godina, uprkos napretku medicinske hemije koji je doprineo razvoju boljih lekova protiv mnogih bolesti, oblast proučavanja kvantitativnog odnosa strukture i aktivnosti bila je nedovoljno proučavana.

Osnove QSAR-a koje i danas poznajemo postavljene su u periodu od 1962 do 1964. godine od strane Corwina Hansch-a.<sup>138</sup> Njegov veliki doprinos razvoju QSAR-a je u tome što je prvi kombinovao više fizičko-hemijskih parametara u jednu regresionu jednačinu, definisao parametar lipofilnosti supstituenata  $\pi$ , kao i u tome što je prepoznao i definisao nelinearne, parabolične korelacije lipofilnosti i biološke aktivnosti.

Fizičko-hemijski parametri koji se najviše koriste u klasičnoj QSAR analizi su: Hammet-ove  $\sigma$  vrednosti, koje kvantifikuju elektronske efekte supstituenta;  $\log P$  i  $\pi$  konstante, koje odražavaju lipofilnost molekula ili supstituenata i Taft-ove  $E_s$  konstante koje kvantifikuju sterne uticaje supstituenata. Sa napretkom računara razvijeni su i brojni drugi parametri koji se koriste u QSAR jednačinama Hansch-ovog tipa.

U procesu razvitka novog leka, medicinski hemičari sintetišu seriju jedinjenja u kojoj se zadržava osnovno jezgro molekula (scaffold) a variraju supstituenti. Ispitivanjem biološke aktivnosti kongenerne serije jedinjenja moguće je zaključiti koji supstituenti poboljšavaju biološko dejstvo molekula. Promenom supstituenata takođe se modifikuju i mnogi fizičko-hemijski parametri koji utiču na ADMET osobine molekula. Efekti supstituenata na neku fizičku osobinu ne kvantifikuju se apsolutnom metodom,



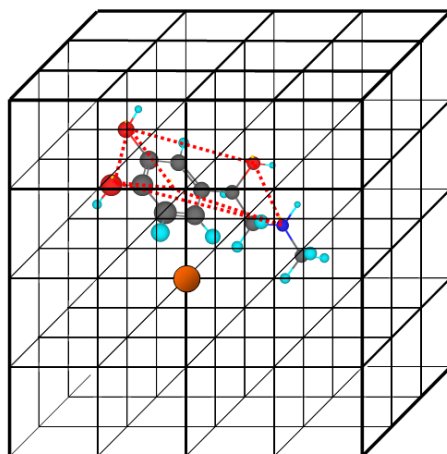
već se posmatra razlika u datim osobinama dva jedinjenja, obično nesupstituisanog i supstituisanog osnovnog jezgra. Ovakav pristup proučavanju odnosa strukture i aktivnosti sličan je konceptu linearne relacije slobodne energije (Linear Free Energy Relationship, LFER). Suštinski, LFER govori o tome da isti supstituent u istoj meri doprinosi nekoj fizičkoj osobini jedinjenja ( $pK_a$ ,  $\log P$ ,  $\log S$ ) bez obzira na hemijsku prirodu osnovnog jezgra za koji je supstituent vezan.

Farmaceutske kompanije danas raspolažu obimnim bazama podataka o biološkoj aktivnosti i ADMET karakteristikama lekova kandidata. Razvojem računarskih tehnika moguće je pretraživanje ovih podataka (data mining) u cilju pronalaženja pravilnosti i sticanja novih saznanja. Koncept analize preklopljenih parova molekula (Matched Molecular Pairs Analysis, MMPA)<sup>139</sup> se zasniva na zameni jedne grupe molekula drugom (npr. zamena H atoma atomom F) i posmatranju efekta ove zamene na određenu osobinu u čitavoj bazi podataka (npr.  $\log S$ ). MMPA se danas koristi u proučavanju mnogih fizičkih i ADMET osobina u *in vitro* i *in vivo* studijama. Ovim studijama pokazano je da neke specifične strukturne promene imaju mnogo izraženiji uticaj nego što bi se očekivalo na osnovu klasične QSAR analize (posmatranjem npr. doprinosa lipofilnosti supstituenta).

MMPA se poklapa sa načinom na koji medicinski hemičar posmatra odnos strukture i aktivnosti, uz jednu veliku prednost u odnosu na klasičan QSAR. Naime, rezultati MMPA velikog broja parova mogu se kodirati i prevesti u program koji će, sa određenom dozom nesigurnosti, dati kvantitativni podatak o procentu promene neke osobine molekula koja nastaje uvođenjem izabranog supstituenta. Takav program takođe može predložiti potencijalne strukture sa povoljnijim osobinama u odnosu na polaznu strukturu. S obzirom da su upravo prediktivnost i domen primenljivosti najveće mane klasičnih QSAR modela, MMPA sve više nalazi upotrebu u farmaceutskoj praksi.

U novije vreme, razvijen je metod poznat kao 3D QSAR u kome se uzimaju u obzir ukupne osobine molekula a ne individualni doprinosi grupa ili delova molekula. U osnovi 3D QSAR metode je pretpostavka da su za biološko dejstvo molekula najvažniji veličina, oblik i elektrostatičko polje oko njega. Jedan od najviše upotrebljivijih 3D QSAR metoda razvijen je od strane kompanije Tripos i poznat je kao CoMFA metod (Comparative Molecular Field Analysis, komparativna analiza molekulskih polja).<sup>140</sup>

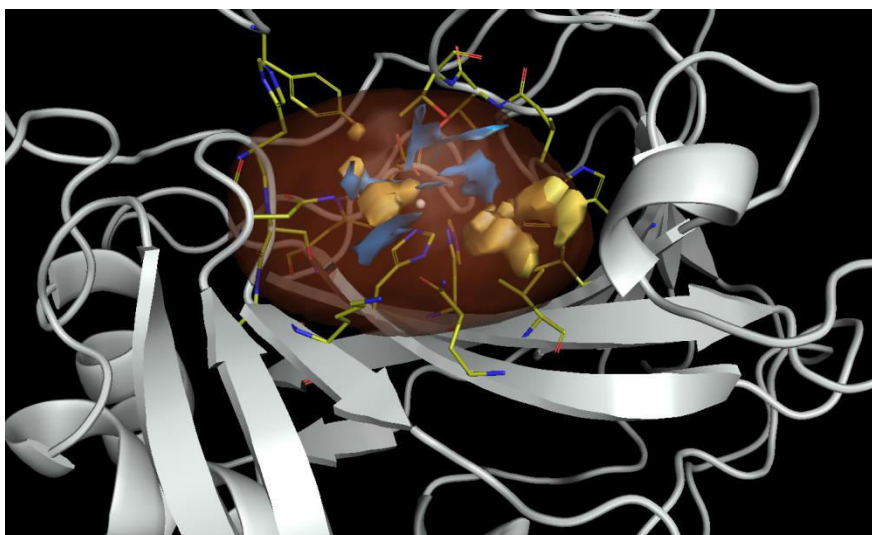
CoMFA se primenjuje na seriju jedinjenja koja su u konfiguracionom prostoru poravnata i svrstana na osnovu određenih kriterijuma. Fleksibilni molekuli mogu postojati u nekoliko stabilnih konformacija, i pretpostavka je da molekul u 3D QSAR modelu treba da bude u konformaciji identičnoj onoj koju zauzima u aktivnom mestu biološke mete („aktivna konformacija“). Odabir aktivne konformacije je ključni problem CoMFA metode jer ne postoje čvrsto utemeljena pravila za poravnavanje struktura molekula. Ukoliko je eksperimentalno određena struktura biološke mete, kao aktivna konformacija uzima se konformacija kokristalisanog liganda. Ukoliko ne postoji informacija o strukturi kokristalisanog liganda, izvodi se kompjuterski doking molekula u aktivno mesto biološke mete. Energetski najpovoljnija konfiguracija se dalje koristi kao aktivna konformacija molekula. Iz aktivne konformacije dalje se generiše *farmakofora* (skup tačaka molekula u prostoru koji određuju interakciju molekula sa biološkom metom) i svi molekuli se u prostoru pozicioniraju tako da dođe do maksimalnog preklapanja farmakofornih tačaka. Zatim se oko molekula postavlja 3D rešetka i u svaku čvornu tačku postavlja se određena hemijska proba kojom se ispituju sterne ili elektrostatičke osobine molekula (**Slika 25**).



**Slika 25.** Molekul pozicioniran u 3D rešetki na osnovu preklapanja sa farmakofornim tačkama (crvene sfere). Žuta sfera označava hemijsku probu u jednoj čvornoj tački rešetke.

U svakoj čvornoj tački određuje se energija interakcije između molekula i probe. Dobijena matrica energija interakcija predstavlja skup deskriptora koji se mogu korelisati sa biološkom aktivnosti jedinjenja. Prostorna varijacija energije interakcije između molekula i odgovarajuće probe predstavlja polje molekulskih interakcija (MIF). MIF-ovi daju informaciju gde su energetski povoljne, a gde energetski nepovoljne

pozicije probe u prostoru oko molekula mete (**Slika 26**). Konturnim linijama predstavljeni su potencijali proba na jednom proizvoljno izabranom izokonturnom nivou. Ovako dobijene konturne linije predstavljaju vrednost potencijala određene hemijske probe na jednoj, izabranoj vrednosti potencijala. Molekuli koji su komplementarni MIF-ovima aktivnog mesta enzima mogu ostvariti povoljne interakcije sa njim i predstavljaju potencijalne supstrate.



**Slika 26.** Polja molekulskih interakcija hidrofobne (žute konture) i HBD probe (plave konture) mapirani u aktivnom mestu enzima karboanhidraze (PDB šifra 1JDO).

Informacije iz MIF-ova mogu se prevesti u deskriptore pogodne za klasični (2D) QSAR koristeći program BIOCUBE.<sup>141</sup> Ovaj program na izabranom izokonturnom nivou ekstrahuje podatke iz MIF dajući brojnu vrednost koja predstavlja zapreminu datog polja na izabranom izokonturnom nivou („isovolume“).

Za razliku od klasičnih QSAR modela Hansch-ovog tipa gde broj jedinjenja mora biti bar četiri do pet puta veći od broja deskriptora, kod 3D QSAR modela broj varijabli značajno nadmašuje broj jedinjenja. Iz tog razloga, matematička relacija između biološke aktivnosti i nezavisnih varijabli u 3D QSAR-u nije višestruka linearna regresija (Multiple Linear Regression, MLR), već najčešće regresiona analiza delimičnih najmanjih kvadrata (Partial Least Squares, PLS).

Radi prevazilaženja problema prostornog poravnavanja struktura, Pastor i saradnici razvili su GRIND metod (GRid Independent Descriptors) zasnovan na MIF-ovima.<sup>142</sup> Ovaj metod generiše varijable nezavisne od položaja molekula u 3D rešetki.

Pošto je GRIND metod dosta korišćen u okviru ove disertacije, u daljem tekstu će biti detaljnije opisan.

### 2.5.1. Izračunavanje polja molekulskih interakcija

MIF-ovi su dizajnirani tako da se mogu izračunati za bilo koji molekul poznate 3D strukture. Program GRID računa MIF-ove za mnoštvo različitih hemijskih proba i pri tome pokazuje neke specifičnosti.<sup>143,144</sup>

1. GRID probe su anizotropne. Centralni atom probe smešta se u odgovarajuću tačku rešetke a zatim se proba rotira sve dok se ne pronade energetski najpovoljnija orijentacija probe u odnosu na atom mete. Ova osobina je od velikog značaja kod proba koje služe za opisivanje vodoničnog vezivanja.
2. Molekul mete „odgovara“ na promenu položaja probe. GRID metod dozvoljava promenu konformacije molekula mete radi ostvarivanja najpovoljnijih energija interakcija sa probom u svakoj tački prostora.
3. Pretpostavljeno je da su i meta i proba smeštene u vodenu sredinu čija je dielektrična konstanta  $\epsilon_r=80$  i da se ona može smanjivati do vrednosti 4, koliko iznosi  $\epsilon_r$  u unutrašnjosti velikih, globularnih proteina.

GRID polje sila predstavlja osnovu programa GRID. Ono je kalibrisano u odnosu na eksperimentalne podatke dobijene iz kristalnih struktura (van der Waals-ovi poluprečnici različitih tipova atoma), kalorimetrijskih merenja (entalpijski i entropijski doprinosi Gibbs-ovoj slobodnoj energiji vezivanja) i merenja polarizabilnosti, dok su atomska naelektrisanja određena teorijskim izračunavanjima na visokom nivou teorije.

Pre svakog izračunavanja u GRID programu, priprema se i proverava fajl sa strukturom molekula mete u programu GRIN. Ovaj program prilagođava metu GRID polju sila na taj način što spaja nepolarne vodonikove atome sa njihovim susednim atomima dajući „prošireni tip atoma“. Na primer, GRIN program će  $-CH_3$  grupu prevesti u jedan „prošireni“ C atom. Hemijske probe interaguju sa proširenim tipovima atoma i ukupna energija interakcije predstavlja zbir pojedinačnih doprinosa: disperzionih interakcija (opisanih Lennard-Jones-ovim 12,6-potencijalom), elektrostatičkih interakcija (opisan klasičnim Coulomb-ovim zakonom), vodoničnog vezivanja i entropijskih faktora.

### 2.5.2. GRIND deskriptori

Klasična upotreba MIF-ova u istraživanju novih lekova jeste identifikacija povoljnih vezivnih mesta različitih hemijskih proba na strukturama bioloških meta, kao što je prikazano na **Slici 25**. Obrnuto, MIF-ovi se mogu izračunati za seriju malih molekula čime se karakteriše njihov potencijal da deluju kao ligandi koji se vezuju za makromolekule. MIF-ovi nekoliko različitih proba oko strukture malog molekula oblikuju „virtuelno“ receptorsko mesto (VRS, Virtual Receptor Site). Kada se koriste na ovaj način, MIF-ovi predstavljaju molekulske deskriptore datih struktura i mogu se koristiti u različitim QSAR modelima. Molekulski deskriptori zasnovani na MIF-ovima su korišćeni u različitim 3D QSAR modelima: CoMFA, CoMSIA,<sup>145</sup> GRID-GOLPE.<sup>146</sup>

Da bi se poredili MIF-ovi različitih molekula, molekuli moraju biti preklapljeni na način da se fragmenti koji interaguju sa istim delovima biološke mete nalaze na približno istim položajima. Nekoliko metoda kojima se ovo preklapanje može postići je već opisano u prethodnom delu teksta. Pošto ne postoje jasno definisana pravila i kriterijumi za poravnavanje, ovaj korak uvek unosi dozu subjektivnosti u proces preklapanja. Pored problema sa preklapanjem molekula, deo problema potiče i od same prirode MIF-ova. Pošto se MIF-ovi računaju sa nekoliko različitih hemijskih proba u velikom broju čvornih tačaka rešetke oko molekula, broj deskriptora (energija interakcije proba/molekul) je ogroman i često prevazilazi nekoliko stotina hiljada. Zbog toga se za obradu podataka moraju koristiti multivarijantne metode kao što su npr. analiza glavne komponente (Principal Component Analysis, PCA),<sup>147</sup> PLS i linearna diskriminantna analiza (Linear Discriminant Analysis, LDA) i protom je zadatak svake od ovih metoda da razdvoji varijable relevantne za biološku aktivnost molekula (signal) od neinformativnih varijabli (šum).

Radi prevazilaženja ovih problema, razvijen je novi tip molekulskih deskriptora koji kondenzuju informacije iz inicijalno izračunatih MIF-ova u mnogo manji broj informativnih varijabli. Kao rezultat dobijeni su Volsurf<sup>148</sup> i GRIND<sup>142</sup> deskriptori. Primena Volsurf deskriptora je u opisivanju farmakokinetičkih osobina molekula, dok GRIND deskriptori bolje opisuju farmakodinamiku leka, odnosno njegovu sposobnost vezivanja za biološke mete.

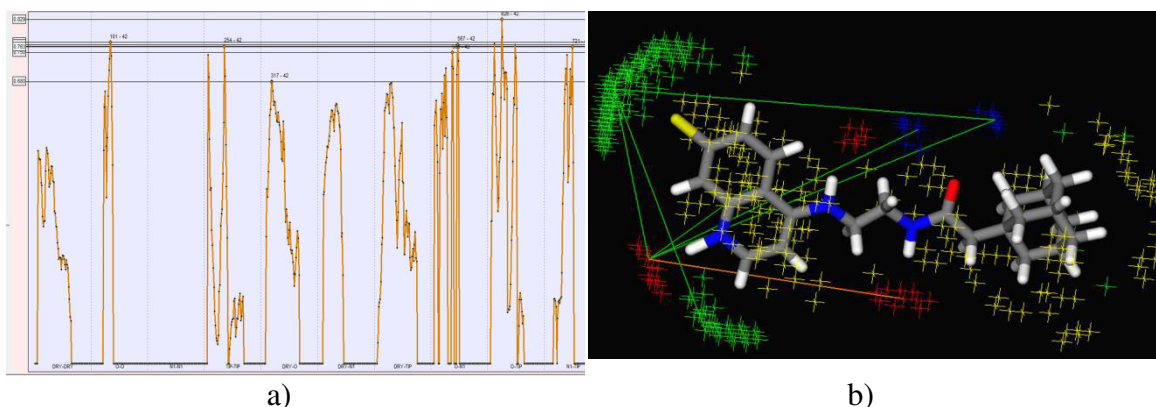
Svaka GRIND varijabla sadrži informaciju o energijama interakcije dve hemijske probe (iste ili različite) i rastojanju između odgovarajuće dve čvorne tačke rešetke. Osnovna svojstva GRIND deskriptora su sledeća:

- 1) Rezultujuće varijable su nezavisne od poravnavanja molekula.
- 2) Varijable imaju hemijsko značenje i mogu se lako interpretirati.
- 3) Mali broj varijabli treba da sadrži veliki procenat informacija.
- 4) Dobijene varijable su pogodne za analizu standardnim hemometrijskim metodama kao što su PCA i PLS.
- 5) Deskriptori se mogu izračunati brzo i automatski, što je pogodno za virtuelni skrining.

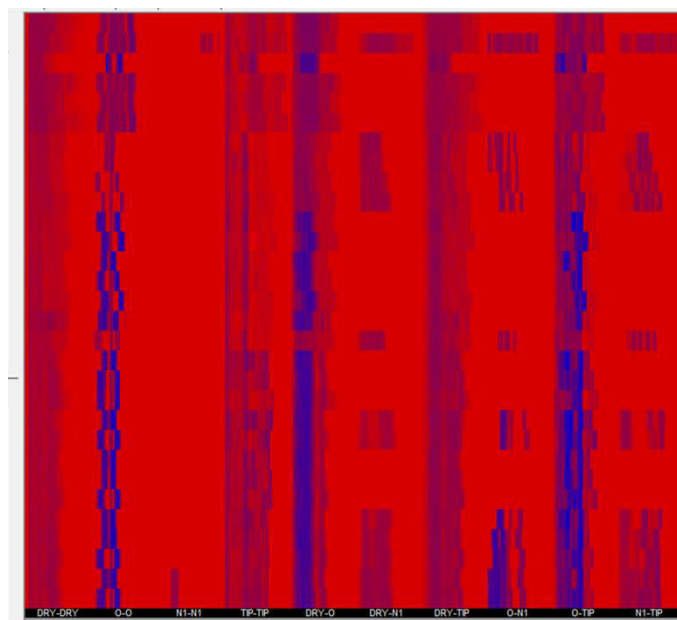
Izračunavanje GRIND deskriptora sastoji se iz tri koraka:

- 1) *izračunavanje MIF-ova*. Tri osnovne probe koje se koriste za izračunavanje MIF-ova su: **DRY**, koja karakteriše hidrofobne karakteristike molekula; **O** ( $sp^2$  hibridizovani atom kiseonika) koji opisuje akceptore vodoničnih veza i **N1** proba (planarni atom azota amidne veze). Zbog značaja samog oblika molekula u prepoznavanju i uklapanju molekula u aktivno mesto mete, definisana je i **TIP** proba koja opisuje oblik na osnovu lokalne zakrivljenosti površine molekula;<sup>149</sup>
- 2) *ekstrakcija najvažnijih regiona*. U ovoj fazi odbacuje se većina informacija iz inicijalno izračunatih MIF-ova i zadržavaju se samo oblasti MIF-ova u kojima ligand ostvaruje najpovoljnije interakcije. Ovako profilirane oblasti MIF-ova moraju imati energetske najpovoljnije interakcije sa molekulom i određeno međusobno rastojanje kako bi se izbeglo gomilanje sličnih informacija. Pored prvobitno napravljenog ALMOND algoritma za ekstrakciju najvažnijih regiona, program Pentacle koristi i AMANDA<sup>150</sup> algoritam koji daje drugu generaciju GRIND deskriptora (GRIND-2);
- 3) *prevođenje informacije iz MIF u deskriptore („kodiranje“)*. U ovom koraku opisuje se prostorni raspored čvorova odabranih najznačajnijih regiona bez upotrebe njihovih koordinata ili spoljašnjeg referentnog sistema. Svaka GRIND varijabla sadrži informaciju o rastojanju između dva čvora i energiji MIF-ova u datim tačkama. U programu Pentacle ovo se postiže primenom MACC2 kriterijuma<sup>151</sup> (Maximum auto- and crosscovariance). Dobijeni deskriptori mogu se prikazati na više načina:

- kao korelogrami u kojima su rastojanja predstavljena na x-osi a normalizovani proizvodi energija interakcija na y-osi (**Slika 27**);
- kao „hitmape“ (**Slika 28**). Hitmape su vrste matrica gde svaki red predstavlja jedno jedinjenje a svaka kolona odgovarajuću varijablu, pri čemu boja odgovara intenzitetu varijable (crvena boja odgovara niskoj a plava visokoj vrednosti koeficijenta varijable). Ovaj način prikazivanja je pogodan za sticanje uvida u varijable celokupnog set molekula i uočavanje sličnosti i razlika između aktivnih i neaktivnih molekula.



**Slika 27.** a) Korelogrami varijabli proizvoljno izabranog jedinjenja izračunati u programu Pentacle; b) Položaj nekoliko najintenzivnijih varijabli sa korelograma; Najvažniji regioni („hot spots“) četiri hemijske probe oko molekula su prikazane različitim bojama: DRY (žuta), O (crvena), N1 (plava) i TIP proba (zelena boja).



**Slika 28.** Hitmapa serije jedinjenja sortiranih prema rastućoj biološkoj aktivnosti. Svaki red hitmape predstavlja jedno jedinjenja, dok svaka kolona predstavlja jednu varijablu. Uočava se razlika u O-O, DRY-O i O-TIP korelogramima aktivnih i neaktivnih jedinjenja.

### 2.5.3. Trodimenzionalna analiza odnosa strukture i aktivnosti (3D QSAR) zasnovana na poljima molekulskih interakcija

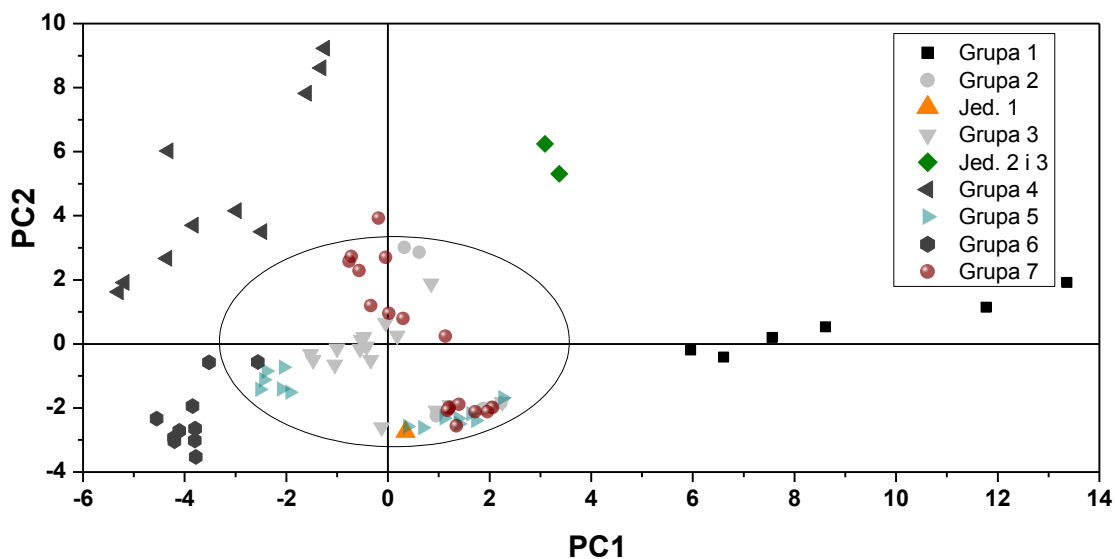
Izračunati GRIND-2 deskriptori mogu se koristiti u svrhu klasifikacije molekula kao i za dobijanje QSAR modela. PCA pokazuje sličnosti i/ili razlike u okviru ispitivane grupe jedinjenja. U PCA originalna X-matrica varijabli prevodi se pomoću nekoliko ortogonalnih projekcija u set novih, međusobno nezavisnih varijabli koje nazivamo glavnim komponentama (Principal Components, PC). Projekcije se prave na način da dobijena PC sadrži što je moguće veći procenat informacija iz polaznog seta. Obično se većina informacija (izraženih kroz procenat X - varijanse) nalazi u prve 2-3 PC. PCA razlaže matricu X varijabli na proizvod dve matrice:

$$\mathbf{X} = \mathbf{TP} + \mathbf{E}$$

gde su **P** – matrica doprinosa („loading matrix“), sadrži informaciju o varijablama; **T** - matrica skorova („score matrix“), koja sadrži informacije o objektima. U ovoj matrici je svaki objekat (molekul) opisan u prostoru glavnih komponenti, umesto u multidimenzionalnom prostoru originalnih varijabli; **E** – matrica reziduala, koja predstavlja neobjašnjenu X varijansu.

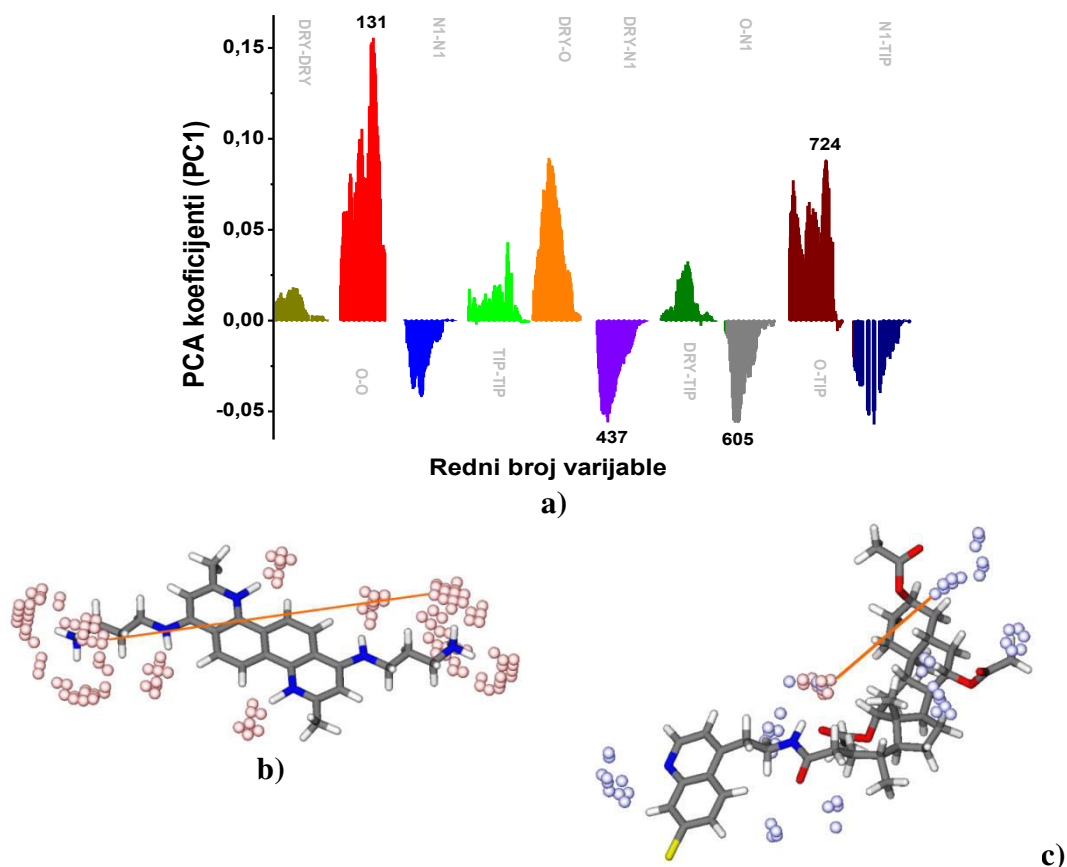
Za interpretaciju PCA modela najpogodniji je grafik PCA skorova (**Slika 29**). Ovaj grafik oslikava relativni položaj objekata u konfiguracionom prostoru glavnih komponenti. Međusobno rastojanje između objekata odražava njihovu međusobnu sličnost. Ovi grafici su korisni u identifikaciji grupe objekata, kao i u uočavanju objekata čije osobine odstupaju od ostatka seta („outliers“, spoljne vrednosti). Objekti unutar elipsoidne linije mogu se smatrati sličnim na 95% -nom intervalu pouzdanosti. Analizom grafika PCA doprinosa (**Slika 30**) moguće je utvrditi koji strukturni fragmenti jedinjenja najviše doprinose glavnim komponentama. Obično prva PC razdvaja jedinjenja po veličini, druga po prisustvu/odsustvu HBD/HBA itd.





**Slika 29.** Grafik PCA skorova molekula iz nekoliko strukturno različitih grupa u prostoru prve dve PC modela.

Ukoliko je poznata dodatna informacija o jedinjenjima kao što je npr. biološka aktivnost kvantitativno izražena brojnomo vrednošću ( $K_i$ ,  $IC_{50}$ ) ona se može iskoristiti kao zavisna, Y- varijabla, i korelisati sa matricom deskriptora koristeći multivarijantne metode kao što je npr. PLS. Ova tehnika, kao i PCA, razlaže X-matricu na proizvod matrice skorova (T) i matrice doprinosa (P). Takođe se uzimaju u obzir i uvek prisutne eksperimentalne greške u Y-vrednostima i takođe se definiše i matrica skorova Y- vrednosti (U).



**Slika 30.** a) PCA doprinosi prve PC modela; b) Strukturni elementi koji doprinose pozitivnim vrednostima prve PC, prikazani na primeru jedinjenja iz Grupe 1 (Slika 29) kroz varijablu O-O 131; c) Strukturni elementi koji doprinose negativnim vrednostima prve PC, prikazani na primeru jedinjenja iz Grupe 6 kroz varijablu O-N1 605.

PLS analiza daje set latentnih varijabli (LV) koje su donekle analogne sa glavnim komponentama u PCA. LV moraju da ispune dva bitna uslova: da reprezentuju strukturu kako X- tako i Y- matrice i da obezbede maksimalno fitovanje između X i Y vrednosti. Ekstrahovane LV su poredane po opadajućem redosledu značaja (prva LV uvek sadrži najveći procenat informacija) i međusobno su ortogonalne. Dva najvažnija statistička parametra koja se dobijaju iz PLS modela su:

- $r^2_{acc}$ , akumulativni koeficijent korelacije ( $r^2$ ) modela koji pokazuje deo Y- varijanse objašnjen modelom (što je bliži vrednosti 1 to je bolje);
- $q^2_{acc}$ , indeks prediktivne sposobnosti modela dobijen unakrsnom validacijom (što bliže  $r^2_{acc}$  to bolje).

Vrednosti  $r^2$  i  $q^2$  određuju da li je dobijeni model dobrog kvaliteta kao i optimalan broj LV modela. Po pravilu, prihvatljiv 3D QSAR treba da ima  $r^2$  iznad 0,8 i

$q^2$  iznad 0,5. Što se tiče broja LV, bira se model sa višim  $q^2$  ali je razumno odbaciti LV ako je njen doprinos vrednostima  $r^2$  i  $q^2$  mali.

Procena prediktivne sposobnosti modela je važna zbog broja LV koje treba zadržati u konačnom modelu i procene kvaliteta modela. Prediktivna sposobnost modela se procenjuje upotrebom unakrsne validacije (CV, cross-validation). Ova procedura funkcioniše tako što se formiraju redukovani modeli (modeli u kojima su neki od objekata uklonjeni) koji treba da predvide Y vrednosti za objekte koji su uklonjeni iz početnog modela. Zatim se predviđene ( $Y'$ ) vrednosti porede sa eksperimentalnim Y vrednostima i izračunavaju se: SDEP, standardna devijacija greške predviđanja i  $q^2$ , prediktivni korelacioni koeficijent.

CV tehnikom se dobija unutrašnja validacija i procena prediktivne sposobnosti modela, bez upotrebe spoljnih setova podataka. Međutim, ne postoji opšta saglasnost oko toga po kom kriterijumu formirati redukovane grupe objekata i koliko objekata zadržati u redukovanom setu. Postoji više načina unakrsne validacije:

- LOO (leave one out) - redukovani modeli se tako prave da se u svakom ciklusu izostavlja samo po jedan objekat u toku analize i procedura se ponavlja dok svi objekti nisu po jednom izostavljeni;
- LTO (leave two out) - modeli se grade tako što se izostavljaju po dva objekta i procedura se ponavlja sve dok svi objekti, u grupama po dva, nisu po jednom izostavljeni;
- nasumične grupe (Random groups) - objekti se grupišu na nasumičan način u  $N$  grupa od kojih svaka sadrži jednak, ili približno jednak broj objekata, a zatim se u svakom ciklusu po jedna grupa izostavlja iz analize. Koliko će objekata biti u svakoj grupi odlučuje korisnik, a što je grupa izostavljenih objekata veća to je metod CV statistički validniji.

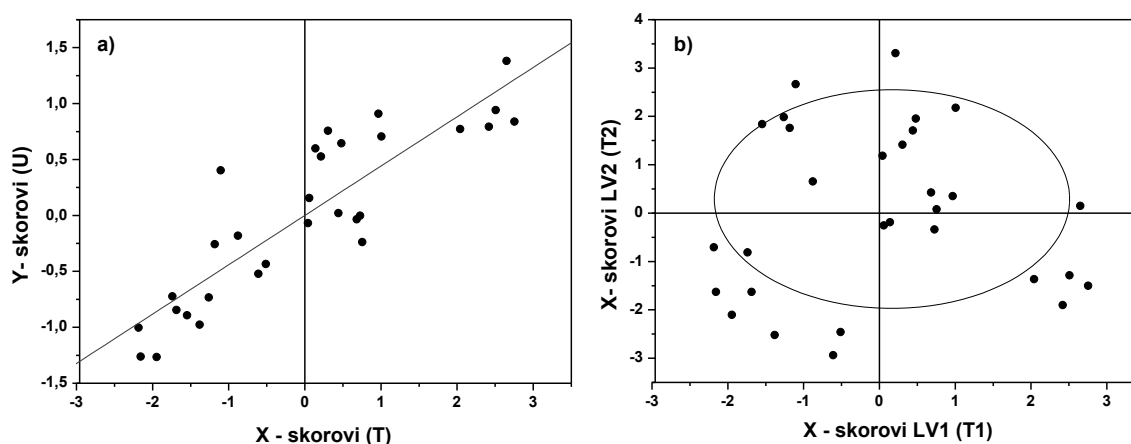
Izbor najpogodnijeg CV metoda uvek zavisi od osobina setova podataka koji se koriste u QSAR analizi, u kojima su objekti često „klasterizovani“, tj. pripadaju određenom broju grupa sličnih molekula. U takvom slučaju statistički validnija CV će se dobiti ako se grupe formiraju tako da slični molekuli uvek budu u okviru iste grupe. Takođe, ako se koristi LOO i LTO, većina informacija koje sadrže objekti ili parovi objekata koji su uklonjeni već se nalaze unutar modela, što daje preterano optimistične rezultate i SDEP se dobija na reproduktivan način. Drugi način da se postigne mnogo

bolja procena realne prediktivne sposobnosti modela je upotreba metoda nasumičnih grupa. Drugim rečima dobijene  $q^2_{acc}$  vrednosti su numerički niže, ali je sama prediktivnost pouzdanija. U ovom pristupu broj grupa treba da bude fiksiran na takav način da postoji realna mogućnost da kompletne grupe sličnih molekula budu uklonjene iz analize u redukovanom modelu. Takođe, proceduru treba ponoviti mnogo puta da bi se dobili stabilni rezultati. Drugi način da se proceni prediktivnost modela jeste da se upotrebi eksterni set jedinjenja, odnosno set jedinjenja koja se ne nalaze u setu iz kojeg je model izveden.

Opšti problem 3D QSAR metode je to što se veliki broj od ukupnog broja X varijabli ne koreliše sa Y vrednostima čime doprinose pojavi tzv. „šuma“. Radi smanjenja „šuma“ i povećanja osetljivosti modela prema najinformativnijim varijablama, primenjuju se razne metode za uklanjanje varijabli koje stvaraju šum. Program Pentacle koristi proceduru frakcionog dizajna faktora (Fractional Factorial Design, FFD).

#### 2.5.4. Interpretacija PLS modela

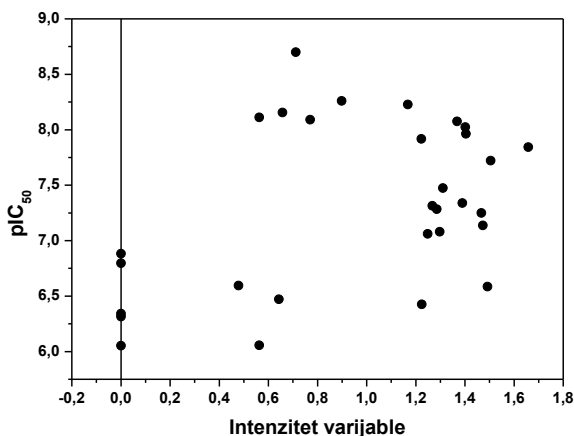
Sa TU grafika (**Slika 31a**) može se videti korelacija između X i Y za svaku LV koju daje model. Dijagram je koristan da se identifikuju objekti koji imaju veliki uticaj na model, kao i grupisani objekti. Grafik PLS skorova (**Slika 31b**) sličan je grafiku PCA skorova, gde su objekti raspoređeni u prostoru dve LV i distanca između dva objekta odražava njihovu sličnost. Objekti unutar elipse pokazuju objekte koji se mogu smatrati sličnim na 95%-tnom intervalu pouzdanosti.



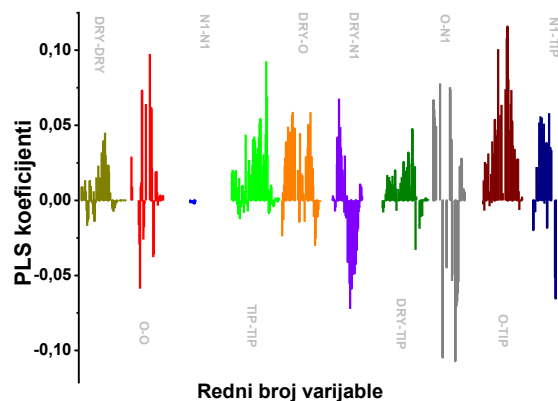
**Slika 31.** a) TU (PLS) grafik za prvu LV modela; b) Grafik PLS skorova prve dve LV modela

Kao i kod PCA (**Slika 30a**), mogu se konstruisati grafici PLS doprinosa u obliku histograma sa kojih se može videti uticaj pojedinačnih varijabli na konkretnu LV.

Grafik izabrane varijable X u zavisnosti od Y („VarX selected - Y“, **Slika 32**) prikazuje kako se određena varijabla koreliše sa biološkom aktivnošću jedinjenja. U modelu se uvek traže varijable koje jasno diskriminišu aktivne od neaktivnih jedinjenja.



**Slika 32.** Grafik zavisnosti biološke aktivnosti i intenziteta jedne izabrane varijable za svako jedinjenje u modelu



**Slika 33.** Grafik PLS koeficijenata

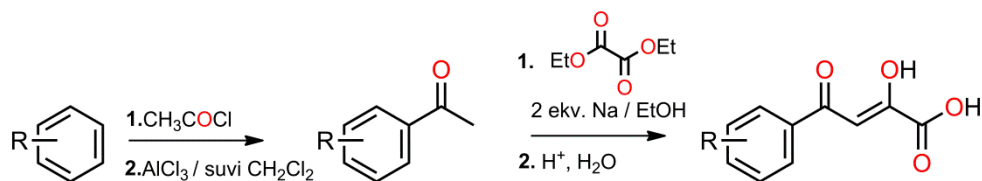
Grafik PLS koeficijenata (**Slika 33**) je najinformativniji u smislu interpretacije rezultata modela. Korisno je posmatrati istovremeno grafik „VarX selected - Y“ i grafik PLS koeficijenata. Varijable sa pozitivnim PLS koeficijentima imaju povoljan uticaj na biološku aktivnost jedinjenja i obično su izražene kod najaktivnijih jedinjenja, dok obrnuto važi za varijable sa negativnim koeficijentima. Posmatranjem nekoliko varijabli sa najvećim koeficijentima dobija se dovoljno informacija o tome koje funkcionalne grupe i u kom prostornom rasporedu imaju povoljan uticaj na biološku aktivnost jedinjenja. Ove informacije se dalje prevode u set hipoteza koji su korisni za racionalizaciju postojećih rezultata i dizajn novih, aktivnijih jedinjenja.

### 3. Naši radovi

#### 3.1. Arildiketo kiseline

##### 3.1.1. Sinteza arildiketo kiseline

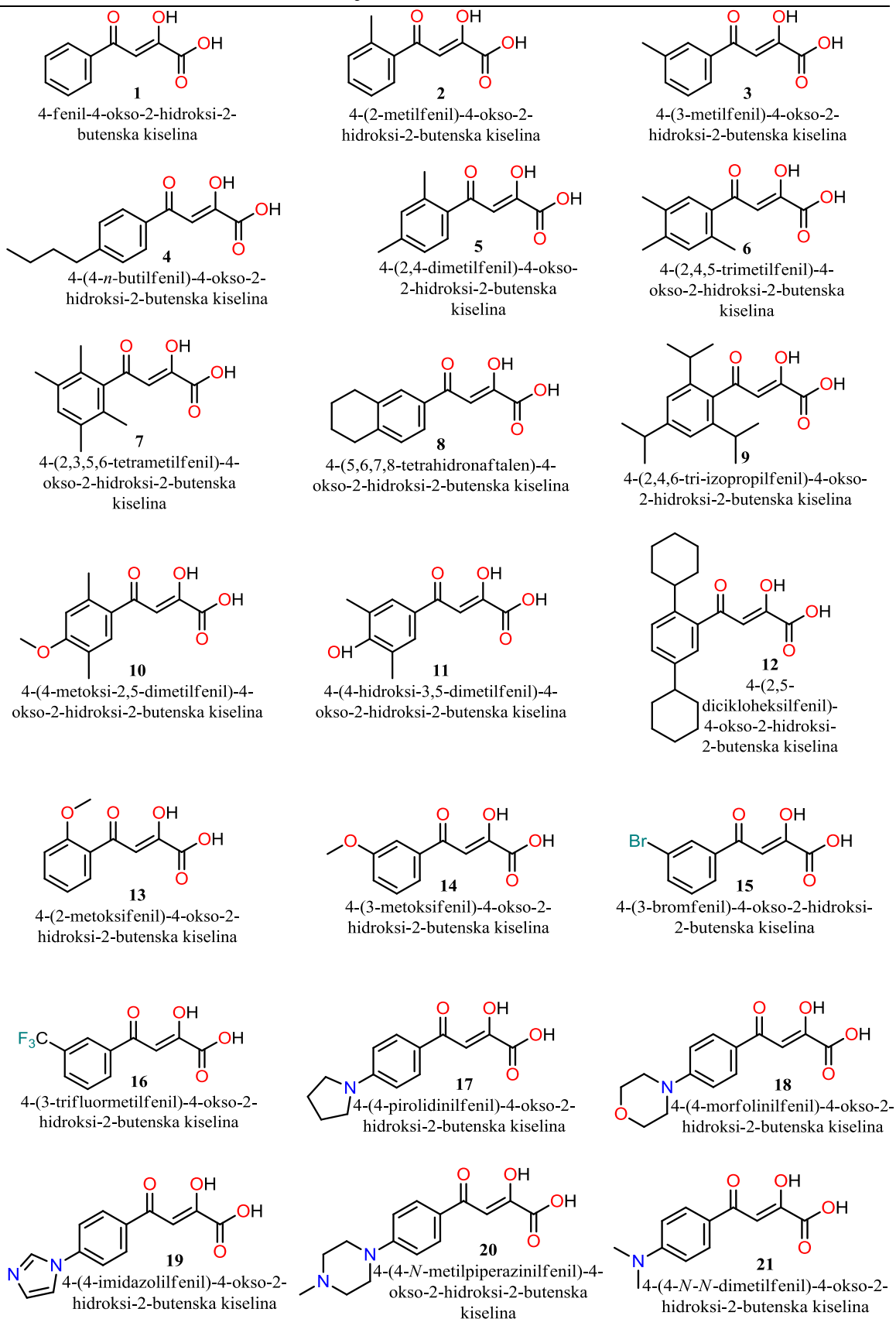
U okviru ove disertacije sintetisana je serija od dvadeset i jedne ADK, **Tabela 2**. ADK su dobijene *Claisen*-ovom kondenzacijom iz supstituisanih acetofenona, koristeći *in situ* generisani Na-metoksid ili Na-etoksid i dietil oksalat. Dobijeni estar ADK je bazno hidrolizovan sa još jednim ekvivalentom baze, a nakon hidrolize krajnji proizvod je dobijen obradom natrijumove soli ADK razblaženom HCl (**Slika 34**). Više detalja o sintezi ADK nalazi se u Eksperimentalnom delu.



**Slika 34.** Reakciona shema sinteze ADK.

Čistoća dobijenih jedinjenja potvrđena je određivanjem tačke topljenja, NMR spektroskopijom (<sup>1</sup>H i <sup>13</sup>C), masenom spektroskopijom visoke rezolucije i IC spektroskopijom. Potpuna karakterizacija data je u Eksperimentalnom delu, a NMR spektri u Prilogu.

**Tabela 2.** Strukturne formule i hemijski nazivi sintetisanih ADK.



### 3.1.2. Antibakterijsko dejstvo aridiketo kiselina

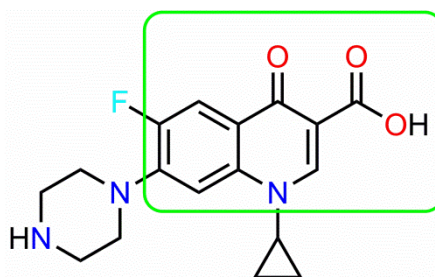
Kao što je već opisano u Opštem delu, ADK i strukturno slični analozi ispoljavaju aktivnost prema mnoštvu različitih bioloških meta. Osnovna pretpostavka od koje polaze istraživanja u oblasti medicinske hemije je da strukturno slični molekuli ispoljavaju sličnu biološku aktivnost. Posmatrajući strukturne formule ADK i antibiotika floksacinskog tipa (ciprofloksacin, **Slika 35**), pretpostavljeno je da bi ADK mogle ispoljavati i antibakterijsko dejstvo.

Ova pretpostavka je eksperimentalno potvrđena u prethodnim radovima naše grupe.<sup>1</sup> Pokazano je da ADK ispoljavaju antibakterijsku aktivnost prema više sojeva bakterija MDRSA (Multi Drug Resistant *Staphylococcus aureus*), sa aktivnostima uporedivim sa antibioticima koji se koriste u kliničkoj praksi u terapiji MDRSA (norfloksacin, tetraciklin, eritromicin).

Odnos između strukture i biološke aktivnosti je ispitan poređenjem antibiotika floksacinskog tipa i ADK po kriterijumu sličnosti oblika i farmakofornih tačaka. Zajednički strukturni motiv svih derivata koji su ispoljili značajnu antibakterijsku aktivnost bilo je prisustvo voluminoznog alkil-supstituenta u *orto*-položaju fenilnog prstena. Razvijen je statistički validan QSAR model zasnovan na MIF-ovima.

Jedan od ciljeva ove disertacije je bio dizajn i sinteza derivata ADK aktivnijih prema MDRSA. Novi derivati ADK su dizajnirani uzimajući u obzir rezultate prethodnog istraživanja. Voluminozniji, hidrofobni supstituenti sistematski su uvedeni u različite položaje na prstenu. Fragmenti cikličnih amina u *para*-položaju fenilnog jezgra uvedeni su radi povećanja strukturne sličnosti sa antibioticima floksacinskog tipa.

Ispitano je antibakterijsko dejstvo jedinjenja **1-21** kao i jedinjenja bez diketo fragmenta (**1a-5a**, **Slika 36**) prema nekoliko sojeva MDR bakterija: *Escherichia coli* NCTC 12241, *Staphylococcus aureus* (NCTC 12981, NCTC 13373, XU212,<sup>152</sup> RN4220,<sup>153</sup> EMRSA-15,<sup>154</sup> 1199B<sup>155</sup>), *Enterococcus faecalis* NCTC 12697 i *Bacillus subtilis* NCTC 10400 (**Tabela 3**). Ispitivane supstance nisu pokazale značajnu aktivnost



**Slika 35.** Strukturna formula ciprofloksacina. Zelenom bojom je uokviren deo molekula sličan strukturi ADK



prema G – organizmu *Escherichia coli*. U **Tabeli 3** date su i MIK vrednosti najaktivnijih ADK iz prethodne studije (jedinjenja **22d-26d**).<sup>1</sup>

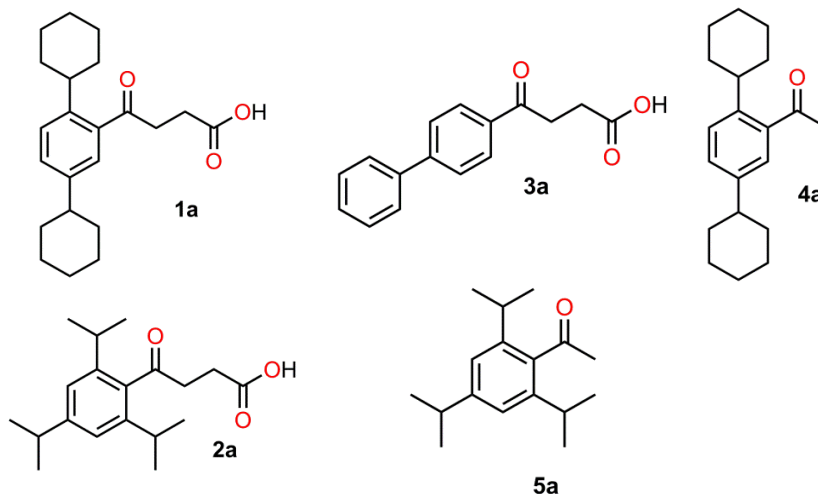
**Tabela 3.** Minimalne inhinitorne koncentracije ADK (MIK, izražene u  $\mu\text{mol/l}$ ), koje zaustavljaju rast navedenih sojeva MDR bakterija. Eksperimentalno dobijene MIK vrednosti, dobijene u  $\mu\text{g/ml}$ , prevedene su u  $\mu\text{mol/l}$  radi realnijeg poređenja.

Jed.	R-	<i>E. faecalis</i> NCTC 12697	<i>B. subtilis</i> NCTC 10400	<i>S. aureus</i> NCTC 12981 (MSSA)	SA- NCTC 13373 (MRSA)	SA- 1199B	SA RN4220	SA EMRSA- 15	SA XU212
<b>1</b>	H	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	>2660	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>
<b>2</b>	2-Me	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>3</b>	3-Me	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>4</b>	4- <i>n</i> Bu	129	–	258	258	258	258	258	258
<b>5</b>	2,4-di-Me	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>6</b>	2,4,5-tri-Me	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>7</b>	2,3,5,6- tetra-Me	516	–	–	–	–	–	–	–
<b>8</b>	$\beta$ -tetralinil	260	–	–	–	520	–	520	–
<b>9</b>	2,4,6-tri- <i>i</i> Pr	–	25	13	–	25	50	25	50
<b>10</b>	4-OMe - 2,5-di-Me	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>11</b>	4-OH-3,5- di-Me	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>12</b>	2,5-di- cikloheksil	6	125	11	11	11	11	22	11
<b>13</b>	2-OMe	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>14</b>	3-OMe	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>15</b>	3-Br	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>16</b>	3-CF <sub>3</sub>	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>17</b>	4-pirolidinil	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>18</b>	4-morfolinil	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>19</b>	4-imidazolil	496	496	–	248	124	–	–	496
<b>20</b>	4- <i>N</i> -Me piperazinil	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>21</b>	4- <i>N,N</i> -diMe	–	–	–	–	–	–	–	–
<b>1a</b>	2,5-di-Ch AP	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	94	94	47	47	94	47
<b>2a</b>	2,4,6-tri- <i>i</i> Pr AP	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	–	–	–	–	–	–
<b>3a</b>	4-Ph AP	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	–	–	–	–	–	–
<b>4a</b>	2,5-di-Ch A	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	450	450	450	225	225	225
<b>5a</b>	2,4,6-tri- <i>i</i> Pr A	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	–	–	–	–	–	–
<b>22d</b>	4- <i>t</i> -Bu	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	1030	–	–	–
<b>23d</b>	2,4-di- <i>i</i> Pr	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	232	232	232	464
<b>24d</b>	2,5-di- <i>i</i> Pr	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	232	464	232	464
<b>25d</b>	2,4,6-tri-Et	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	116	232	232	232
<b>26d</b>	4-fenil	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	477	–	–	–
	Norfloksacin <sup>155</sup>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	106	–	3,3	–
	Ciprofloksacin <sup>156</sup>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	24,2	0,76	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>
	Levofloksacin <sup>156</sup>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	5,53	0,69	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>
	Moksifloksacin <sup>156</sup>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>	0,62	0,31	<i>n.o.</i>	<i>n.o.</i>

*n.o.* – nije određivano; – neaktivno (MIK > 128  $\mu\text{g/ml}$ ); AP - aroilpropanska kiselina; A - acetofenon

Kao što se iz **Tabele 3** može videti, nekoliko supstanci pokazalo je aktivnost prema G + bakterijama *Ent. faecalis*, *B. subtilis* i *S. aureus*. Kao što je i predviđeno dizajnom, značajnu antibakterijsku aktivnost pokazalo je jedinjenje **12**. Jedinjenje **12** ima 10-11 puta veću aktivnost prema norfloksacin-rezistentnom soju SA 1199B nego najaktivnija ADK iz prethodne studije (**Tabela 3**, jedinjenje **25d**).<sup>1</sup> Takođe, aktivnost jedinjenja **12** prema istom soju SA je 10 puta veća od aktivnosti norfloksacina prema istom soju bakterija.

U Opštem delu diskutovano je o mehanizmu antibiotskog delovanja ADK i prenil-transferaze su identifikovane kao moguća meta. Pošto sve prenil-transferaze u aktivnom centru enzima sadrže Mg<sup>2+</sup> jon koordinovan sa asparaginskom kiselinom, pretpostavljeno je da će ADK kao dobri kompleksirajući agensi Mg<sup>2+</sup> jona<sup>104</sup> biti potencijalni inhibitori ovih enzima. Od ranije je poznato da je keto-enolni deo molekula odgovoran za kompleksiranje Mg<sup>2+</sup>. Radi provere hipoteze da je keto-enolni deo molekula neophodan za antibakterijsku aktivnost ADK, ispitana je antibakterijska aktivnost nekoliko jedinjenja iz klasa aroilpropanskih kiselina i acetofenona, sa fenil supstituentima identičnim sa najpotentnijim derivatima ADK, ali bez keto-enolnog dela molekula (**Slika 36**).



**Slika 36.** Struktura aroilpropanskih kiselina (**1a-3a**) i acetofenona (**4a, 5a**), strukturalnih modifikacija ADK bez keto-enolnog dela molekula.

Antibakterijske aktivnosti jedinjenja **1a-5a** su značajno niže od aktivnosti identično fenil-susptituisanih ADK (**Tabela 3**). Ovi rezultati idu u prilog hipotezi da je keto-enolni deo molekula esencijalan za antibakterijsku aktivnost ADK.

Citotoksičnost najaktivnijih derivata ADK ispitana je i prema MRC-5 (Medical Research Council-5) ćelijskoj liniji - zdravim ćelijama plućnog tkiva (**Tabela 4**).

**Tabela 4.** Citotoksičnost najaktivnijih ADK, ispitana na MRC-5 ćelijama

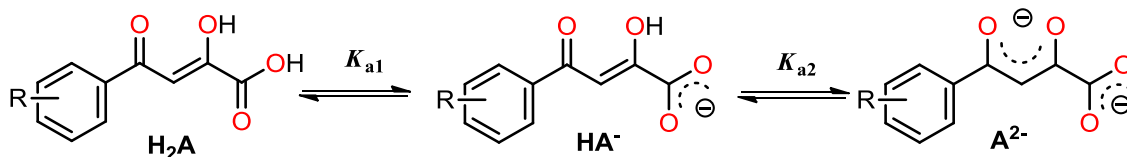
Jedinjenje	IC <sub>90</sub> (μM)
<b>4</b>	197,5±3,5
<b>9</b>	87,0±7,1
<b>12</b>	23,5±2,1

Poredeći rezultate antibakterijske aktivnosti (**Tabela 3**) sa aktivnostima prema zdravim ćelijama (**Tabela 4**), uočljivo je da najaktivnija jedinjenja (**9** i **12**) pokazuju umerenu selektivnost prema bakterijskim ćelijama u odnosu na zdrave. Dalje strukturne modifikacije su neophodne radi povećavanja selektivnosti.

### 3.2. Neke fizičko-hemijske karakteristike važne za biološku aktivnost ADK

#### 3.2.1. Protolitičke ravnoteže u rastvorima arildiketo kiselina

Kao što je već opisano u Opštem delu, poznavanje  $pK_a$  vrednosti biološki aktivnih supstanci je od velikog značaja. Lipofilnost, permeabilnost, metabolizam i toksični efekti supstance su zavisni od stanja protonovanosti na određenom pH. U okviru ovog rada određene su  $pK_a$  vrednosti nekoliko ADK upotrebom dve standardne metode - potenciometrije i spektrofotometrije. Većina ispitivanih ADK u hemijskom pogledu predstavlja u vodi slabo rastvorne diprotične kiseline čija se disocijacija može predstaviti sledećom shemom (**Slika 37**):



**Slika 37.** Protolitičke ravnoteže ADK. Oznake  $H_2A$ ,  $HA^-$  i  $A^{2-}$  će u daljem tekstu biti korišćene za prikazivanje molekulskog, monoanjonskog odnosno dianjonskog oblika ADK.

Preliminarno je ispitana rastvorljivost nekoliko ADK „shake-flask“ metodom u jako kiseloj sredini (pH = 1) i na pH vrednosti krvi (7,4) i rezultati su dati u **Tabeli 5**.

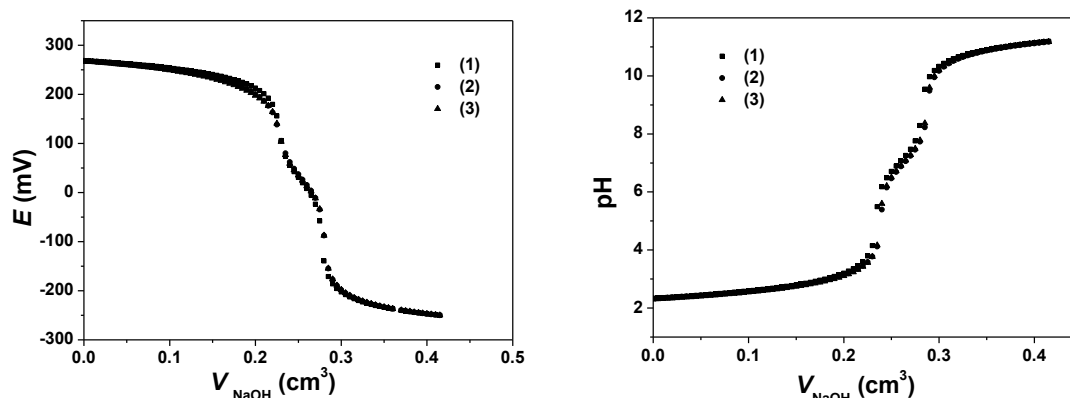
**Tabela 5.** Spektrofotometrijski određene rastvorljivosti nekih ADK na pH = 1 (0,1 M HCl) i pH = 7,4 (Tris pufer (TBS),  $c_{\text{tot}} = 30 \text{ mM}$ );  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Jedinjenje	Rastvorljivost (M)		Rastvorljivost (mg/ml)	
	pH 1	pH 7,4	pH 1	pH 7,4
5	$4,5(\pm 0,3) \cdot 10^{-4}$	$4,6(\pm 0,6) \cdot 10^{-3}$	0,10	1,01
7	$9,1(\pm 0,2) \cdot 10^{-5}$	$3,2(\pm 0,1) \cdot 10^{-3}$	0,02	0,79
8	$7,1(\pm 2,8) \cdot 10^{-5}$	$5,8(\pm 0,2) \cdot 10^{-3}$	0,02	1,43
17	/ <sup>*</sup>	$3,0(\pm 0,2) \cdot 10^{-3}$		0,78

<sup>\*</sup> Raspalo se tokom ekvibracije

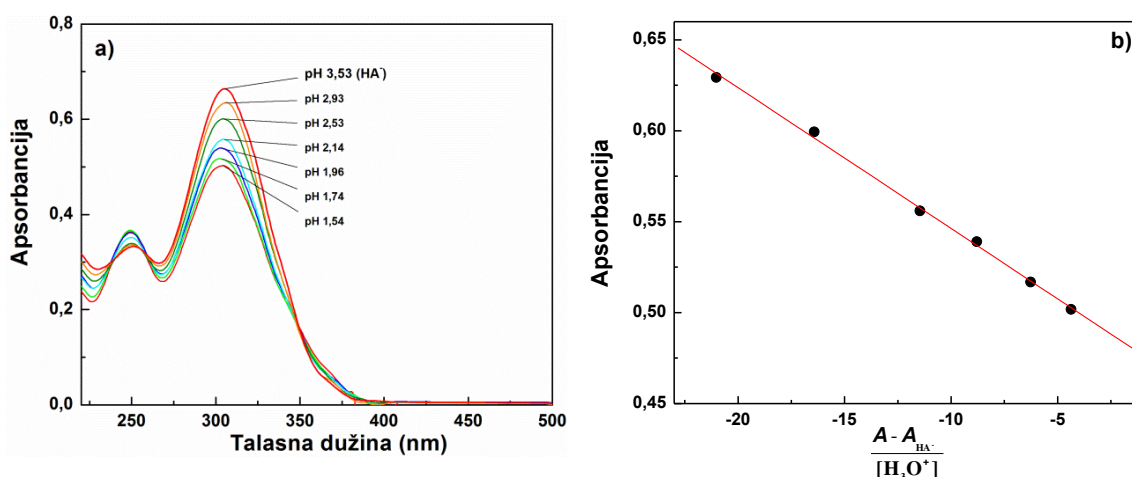
Potenciometrijskim kiselinsko-baznim titracijama je, u ovom slučaju, moguće pouzdano odrediti samo vrednost druge kiselinske konstante ( $pK_{a2}$ ), pošto pri potenciometrijskom određivanju mora biti ispunjen uslov:  $pK_a > -\log c$ .<sup>99</sup> Vrednost prve konstante kiselosti kod do sada proučavanih jedinjenja iz serije ADK iznosi ( $pK_{a1} = 1,87 - 2,29$ ),<sup>157</sup> a rastvorljivosti ADK u kiseljoj sredini su reda veličine  $10^{-4} \text{ M}$  (**Tabela 5**), te uslov  $pK_a > -\log c$  nije ispunjen.

Rezultati dobijeni potenciometrijskim kiselinsko-baznim titracijama (**Slika 38**, **Slike P1-P3**) obrađeni su softverskim paketom HYPERQUAD 2008,<sup>98</sup> a  $pK_a$  vrednosti su prikazane u **Tabeli 6**.



**Slika 38.** Krive titracija smeše jedinjenja 7 ( $c = 1,060 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) i standardnog rastvora HCl ( $c_{\text{HCl}} = 0,1194 \text{ M}$ ) standardnim rastvorom natrijum-hidroksida ( $c_{\text{NaOH}} = 0,1311 \text{ M}$ ),  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1 \text{ M}$  (NaCl).

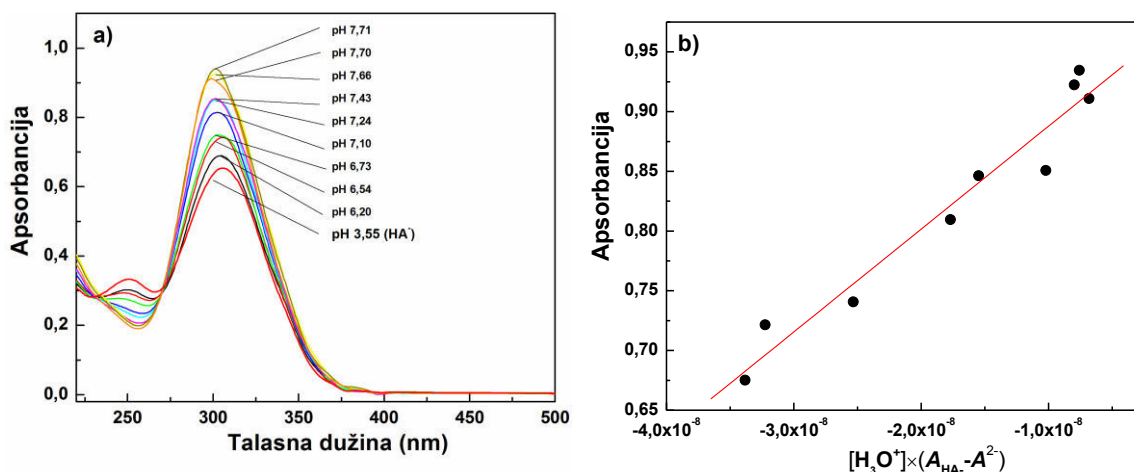
Vrednost prve konstante disocijacije se može odrediti spektrofotometrijski, NMR spektroskopijom, kapilarnom elektroforezom i drugim metodama. U ovom radu smo se odlučili za spektrofotometriju jer je ona eksperimentalno najjednostavnija i nama najpristupačnija a neophodan uslov za klasičnu obradu podataka ( $\Delta pK_a \geq 4$ ) je ispunjen. Ukoliko je jonizacioni centar u konjugaciji sa hromoforom, promena stanja protonovanosti jonizabilne grupe dovešće do pomeranja u apsorpcionom spektru molekula. Spektri jedinjenja **2** u pH oblasti prve konstante disocijacije (pH = 1,54–3,53) prikazani su na **Slika 39a**, a linearna regresiona analiza spektralnih podataka prema jednačini 8 data je na **Slika 39b**. Svi podaci potrebni za izračunavanje odgovarajućih  $K_{a1}$  dati su u Prilogu, **Tabela P1**.



**Slika 39.** Spektrofotometrijsko određivanje kiselinske konstante  $K_{a1}$  jedinjenja **2**:

- a) apsorpcioni spektri korišćeni za određivanje  $K_{a1}$ ,  $c = 5,023 \cdot 10^{-5}$  M; b) grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom 8;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

Na sledećem grafiku prikazani su spektri jedinjenja **2** u pH oblasti druge konstante kiselosti (**Slika 40a**) i linearna regresiona analiza spektralnih podataka prema jednačini 7 (**Slika 40b**). Svi podaci potrebni za izračunavanje odgovarajućih  $K_{a2}$  vrednosti dati su u Prilogu, **Tabela P2**.



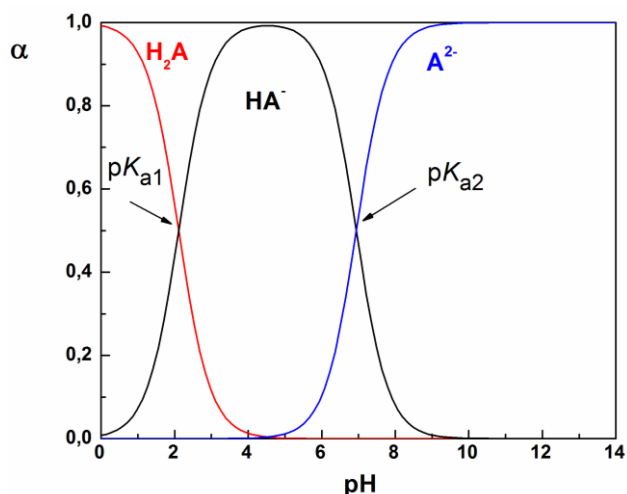
**Slika 40.** Spektrofotometrijsko određivanje kiseline konstante  $K_{a2}$  jedinjenja 2; a) apsorpcioni spektri korišćeni za određivanje  $K_{a2}$ ,  $c = 5,023 \cdot 10^{-5}$  M; b) grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom 7;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

Spektri, grafici i tabelarno prikazani podaci potrebni za izračunavanje  $K_{a1}$  i  $K_{a2}$  vrednosti ostalih proučavanih ADK prikazani su u Prilogu, **Slike P4-P17**, **Tabele P3-P16**. Pregled spektrofotometrijski i potenciometrijski određenih  $pK_a$  vrednosti ADK dat je u **Tabeli 6**. Sa izuzetkom jedinjenja **15**, spektrofotometrijski i potenciometrijski određene  $pK_{a2}$  vrednosti su se odlično poklapale.

**Tabela 6.** Pregled spektrofotometrijski određenih  $pK_a$  vrednosti nekih ADK sa talasnim dužinama određivanja i potenciometrijski određenih vrednosti  $pK_{a2}$ .

Jedinjenje	$pK_{a1} \pm sd$	$\lambda$ (nm)	$pK_{a2} \pm sd$	$\lambda$ (nm)	$pK_{a2} \pm sd$ (potenciometrijski)
2	$2,11 \pm 0,01$	302,9	$6,94 \pm 0,04$	299,5	$7,05 \pm 0,02$
3	$2,27 \pm 0,06$	305,4	$7,52 \pm 0,02$	250,0	
5	$2,02 \pm 0,04$	312,3	$7,28 \pm 0,04$	305,9	$7,31 \pm 0,03$
6	$2,18 \pm 0,04$	308,8	$6,79 \pm 0,06$	308,0	
7	$1,96 \pm 0,04$	293,0	$6,50 \pm 0,05$	296,0	$6,47 \pm 0,01$
10	$2,17 \pm 0,04$	330,0	$7,56 \pm 0,03$	313,1	
14	$2,33 \pm 0,02$	315,0	$7,61 \pm 0,02$	332,0	
15	$2,34 \pm 0,05$	327,6	$7,15 \pm 0,02$	305,4	$7,33 \pm 0,02$

Poznavanje  $pK_a$  nekog jedinjenja omogućava nam konstrukciju dijagrama raspodele čestica u zavisnosti od pH vrednosti. Sa dijagrama raspodele se lako uočava koji od oblika nekog jedinjenja je dominantan na određenoj pH vrednosti. Dijagram raspodele molskog udela ( $\alpha$ ) različitih oblika jedinjenja **2** u zavisnosti od pH vrednosti prikazan je na **Slici 41**.



**Slika 41.** Dijagram raspodele jedinjenja **2**.

U jako kiseljoj sredini dominantan je oblik  $H_2A$  (na pH 1 više od 90%), dok su na pH vrednosti krvi (7,4) zastupljena dva oblika ( $HA^-$  30% i  $A^{2-}$  70%).

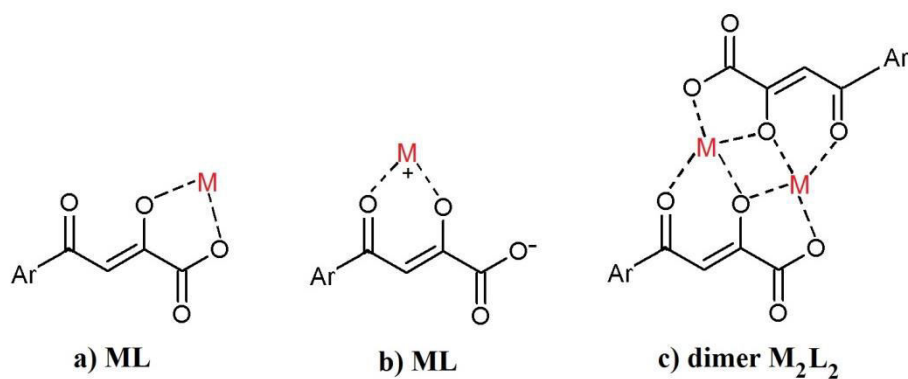
Uticao supstituenata na konstante kiselosti ADK može se kvantifikovati korišćenjem Hammett-ovih  $\sigma$  vrednosti, kao i drugim deskriptorima koji kvantifikuju induktivne, rezonancione i sterne uticaje supstituenata na jonizacioni centar.<sup>157</sup> U ovom radu nismo pokušavali izvesti takvu vrstu korelacija jer je broj jedinjenja za koje su određene konstante kiselosti mali (8 jedinjenja). Takođe, pet jedinjenja iz ovog seta (**2**, **5**, **6**, **7**, **10**) imaju *orto*-Me grupe i kod Hammett-ove korelacije ne daju dobre rezultate, usled nemogućnosti odvajanja sternog od elektronskog doprinosa *orto*-supstituenata.<sup>158</sup> Iz **Tabele 6** uočavamo da jedinjenja sa *orto*-Me grupama imaju niže  $pK_a$  vrednosti. Uticaj *orto*-alkil grupa na stabilnost mono- i dianjona ADK, a samim tim i na odgovarajuće  $pK_a$  vrednosti, biće predmet daljih istraživanja.

### 3.2.2. Kompleksiranje ADK sa dvovalentnim metalnim jonima

Sposobnost ADK da obrazuju komplekse sa dvovalentnim jonima metala je od presudnog značaja za mogućnost inhibiranja različitih enzima koji u aktivnom mestu

imaju  $M^{2+}$  jon. Pored poznatih inhibitora HIV-1 IN na bazi diketo kiselina, kompleksi  $\beta$ -diketo kiselina i njihovih estara sa dvovalentnim metalnim jonima ( $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  i  $Zn^{2+}$ ) takođe su se pokazali kao efikasni inhibitori HIV-1 IN.<sup>2</sup>

Jedinjenja iz klase ADK sadrže  $\beta$ -diketo strukturni fragment sa dva vezivna mesta koja mogu biti uključena u koordinovanje i mogućnost formiranja kompleksa definisane stehiometrije sa različitim metalima. Za razliku od  $\beta$ -diketo kiselina,  $\beta$ -diketo estri obezbeđuju koordinovanje sa metalima samo u keto-enolnom delu molekula (**Slika 42**).<sup>2</sup>



**Slika 42.** Shematski prikaz mogućih mesta koordinovanja  $M^{2+}$  jona sa potpuno deprotonovanom ADK: a) hidroksi karboksilatni tip, b) acetil-acetonato tip kompleksa i c) dimerni kompleks.

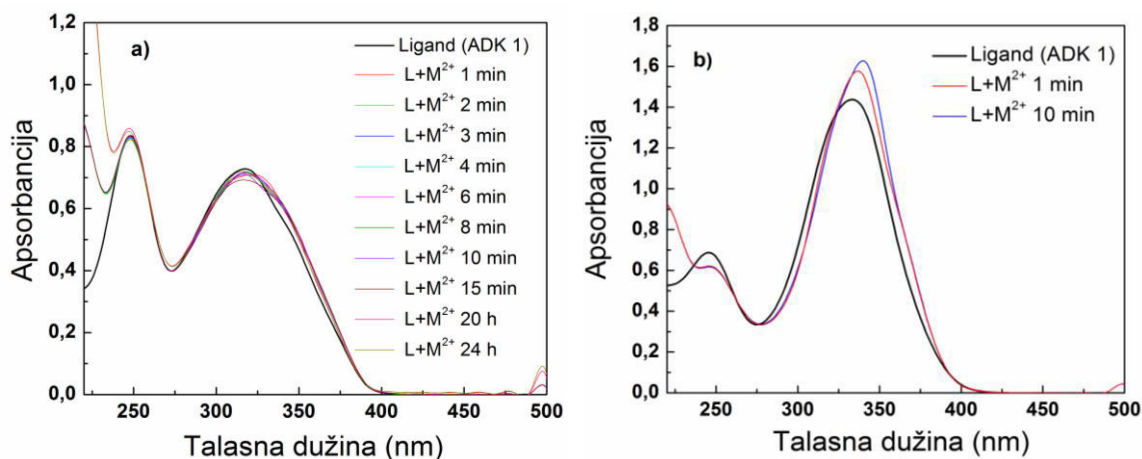
U prethodnim radovima naše grupe stehiometrija i konstante stabilnosti kompleksa ADK sa  $Mg^{2+}$  određene su *Job*-ovom spektrofotometrijskom metodom.<sup>104</sup> Pokazano je da ADK grade isključivo kompleks tipa  $ML_2$  sa jonom  $Mg^{2+}$ , kada se reakcija kompleksiranja odvija u metanolu, kao i da alkil-supstituenti u *meta*-položaju fenilnog jezgra doprinose povećanoj stabilnosti kompleksa.

U okviru ove doktorske disertacije ispitivana je reakcija kompleksiranja ADK sa  $Zn^{2+}$  jonom. Jon  $Zn^{2+}$  je važan kofaktor u aktivnim centrima različitih enzima (karboanhidraza, karboksipeptidaza, histondeacetilaza) i mali organski molekuli koji imaju sposobnost da vezuju cink su inhibitori pomenutih enzima. ADK i strukturno slična jedinjenja su opisana kao selektivni inhibitori klase I karboanhidraza (KA),<sup>55</sup> što nas je motivisalo da ispitamo reakciju kompleksiranja ADK sa  $Zn^{2+}$  jonom u simuliranim fiziološkim uslovima. Smatrali smo da bi dobijene konstante stabilnosti kompleksa i njihova stehiometrija mogle dati važne informacije koje bi pomogle sintezi aktivnijih i selektivnijih inhibitora klase I KA.



Stehiometrijski odnos  $Zn^{2+}$  jona i ADK određen je metodom molskog odnosa.<sup>107</sup> Preliminarna istraživanja pokazala su da u vodenoj sredini, na pH vrednosti krvi, dolazi do reakcije kompleksiranja ADK sa  $Zn^{2+}$ , dok za  $Mg^{2+}$  to nije slučaj.<sup>119</sup> Najverovatniji razlog za ovakvo ponašanje je snažna hidratacija  $Mg^{2+}$  jona, pa je pretpostavljeno da je konstanta građenja kompleksa ADK sa  $Mg^{2+}$  manja od konstante hidratacije  $Mg^{2+}$  jona. Međutim, kako  $Zn^{2+}$  jon ima veći jonski radijus i konstanta hidratacije je, verovatno, manja od konstante građenja kompleksa sa ADK, pa do nastanka kompleksa dolazi i u vodenoj sredini.

Da bi utvrdili kojom se brzinom odigrava reakcija kompleksiranja ADK sa  $Zn^{2+}$ , izveden je eksperiment u kome su snimani spektri smeše liganda i metala u rastvoru TBS-a (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM) i u 0,1 M NaCl (pH = 4,72) u različitim vremenskim intervalima (**Slika 43**).

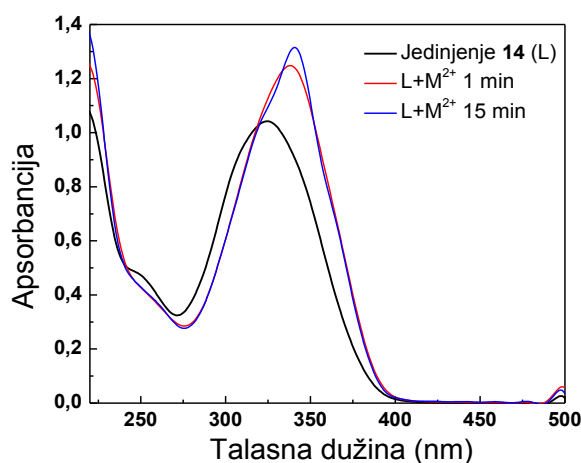


**Slika 43.** Vremenski zavisni UV/VIS spektri jedinjenja **1** ( $c_1 = 1,106 \cdot 10^{-4}$  M) i smeše **1** sa  $Zn^{2+}$  jonom u molskom odnosu 1:1 u: a) 0,1 M NaCl (pH = 4,72;  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ) i b) vodenom rastvoru TBS-a (pH = 7,34;  $c^{tot} = 30$  mM;  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ). Vreme nakon započinjanja reakcije dato je na slici.

Kao što je ranije rečeno, ADK se u vodenoj sredini ponašaju kao diprotične kiseline. Ispitivane ADK imaju  $pK_{a1}$  vrednosti u opsegu 1,96 – 2,34, dok su  $pK_{a2}$  vrednosti u opsegu 6,45–8,06.<sup>119</sup> U kiseloj sredini, u oblasti  $pH < pK_{a1} - 1$ , ADK su u rastvoru većinski (>90%) prisutne u obliku molekula, dok se na  $pH > pK_{a1} + 1$  nalaze u obliku mono- ili di- anjona. Zbog toga se afinitet ADK ka kompleksiranju  $Zn^{2+}$  jona menja sa promenom pH vrednosti rastvora: sa porastom pH vrednosti, raste i afinitet ka kompleksiranju. U 0,1 M NaCl u kom je pH po dodatku ADK 4,72 (dominantni oblik je

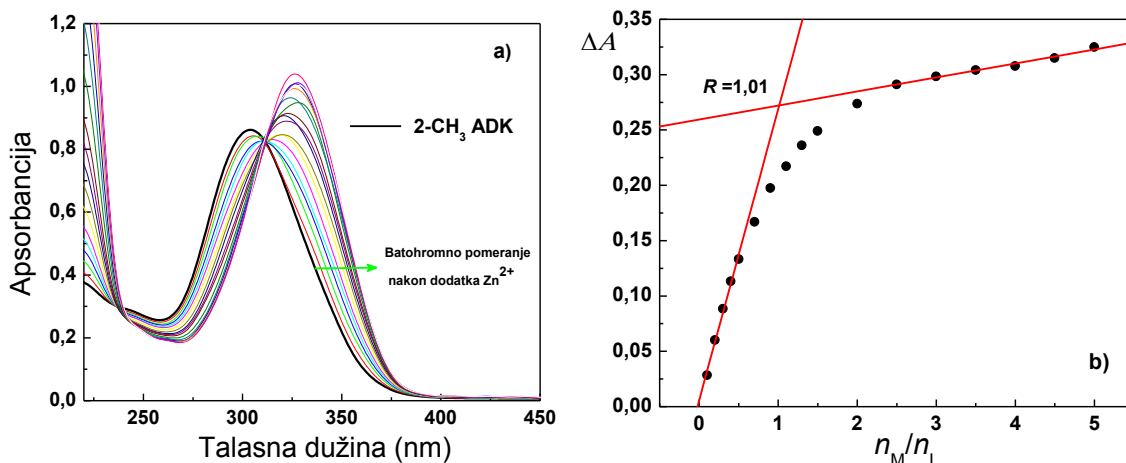
HA<sup>-</sup>) ne dolazi do kompleksiranja sa Zn<sup>2+</sup> jonom (**Slika 43a**). Kada su ADK u rastvoru prisutne u dianjonskom obliku (pH = 7,34) do kompleksiranja dolazi (**Slika 43b**).

Na **Slici 44** prikazani su vremenski zavisni UV/VIS spektri jedinjenja **14** i smeše jedinjenja **14** sa Zn<sup>2+</sup> jonom u molskom odnosu 1:1 u vodenom rastvoru TBS-a. Na osnovu dobijenih spektara, gde se vidi batohromno pomeranje apsorpcionog maksimuma nakon dodatka Zn<sup>2+</sup> jona u rastvor jedinjenja **14**, zaključeno je da je reakcija građenja kompleksa završena već nakon 1 minuta i da nije potrebno čekati duži vremenski period da se reakcija kompleksiranja odigra.



**Slika 44.** Vremenski zavisni UV/VIS spektri jedinjenja **14** ( $c_{14} = 8,151 \cdot 10^{-5}$  M) i smeše jedinjenja **14** sa Zn<sup>2+</sup> jonom u molskom odnosu 1:1 u vodenom rastvoru TBS-a (pH = 7,34;  $c^{\text{tot}} = 30$  mM;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ). Vreme nakon započinjanja reakcije dato je na slici.

Titracije su izvedene na taj način što je koncentracija ADK održavana konstantnom, a koncentracija rastvora Zn<sup>2+</sup> postepeno povećavana. Dobijeni UV/VIS spektri prikazani su na **Slici 45a**. Sva izračunavanja izvedena su na optimalnoj talasnoj dužini (maksimum apsorpcije kompleksa, a minimum apsorpcije liganda), kao i na dve njoj bliske talasne dužine. Konstruisani su grafici zavisnosti razlike apsorbcije kompleksa i samog liganda ( $\Delta A$ ) od molskog odnosa metala i liganda ( $n_M/n_L$ ), **Slika 45b**. Presek linearnih delova krive molskog odnosa metala i liganda (prelomna tačka *R*) pokazuje stehiometrijski odnos ADK i Zn<sup>2+</sup> jona u formiranom kompleksu. Tabela sa eksperimentalnim podacima potrebnim za konstruisanje grafika molskog odnosa za reakciju kompleksiranja jedinjenja **2** sa Zn<sup>2+</sup> data je u Prilogu, **Tabela P17**.



**Slika 45.** Spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti kompleksa jedinjenja **2** sa  $Zn^{2+}$  jonom: a) UV/VIS spektri jedinjenja **2** ( $c_2 = 7,256 \cdot 10^{-5}$  M) nakon dodatka  $Zn^{2+}$  jona ( $c_{Zn^{2+}} = (0,072-3,521) \cdot 10^{-4}$  M); b) grafik molskog odnosa za formiranje kompleksa jedinjenja **2** sa  $Zn^{2+}$  jonom. Snimano u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

Odgovarajući spektri, tabele sa eksperimentalnim podacima i grafici zavisnosti razlike apsorbancije ( $\Delta A$ ) od molskog odnosa metala i liganda ( $n_M/n_L$ ) za sve ostale proučavane supstance dati su u Prilogu, **Slike P18-P29, Tabele P18-P29**.

Na osnovu dobijenih grafika prikazanih na **Slikama 45b i P18b - P29b** može se izvesti zaključak da se u slučaju više od polovine ispitivanih jedinjenja (**2, 3, 5, 6, 8, 9, 15 i 16**) u rastvoru obrazuju kompleksi u molskom odnosu 1:1 (M:L), tj. da pomenuta jedinjenja u TBS-u grade komplekse tipa ML (ili  $M_2L_2$ ,  $M_nL_n$ ). Dobijene  $R$  vrednosti za pomenuta jedinjenja iznose  $\sim 1$  (**Tabela 7**), što potvrđuje pretpostavku da se u rastvoru formira samo jedna vrsta kompleksa.

Vrednosti spektrofotometrijski određenih uslovnih konstanti stabilnosti ( $K_s$ ) kompleksa jedinjenja **2, 3, 5, 6, 8, 9, 15 i 16** sa  $Zn^{2+}$  jonom izračunate prema jednačinama 20-22 date su u **Tabeli 7**, zajedno sa vrednostima talasnih dužina na kojima je određivanje izvedeno.



$$K_s = \frac{[ADK - Zn]}{[ADK][Zn^{2+}]} \quad [ADK] = C_{ADK} - [ADK - Zn] \quad (21)$$

$$[Zn^{2+}] = C_{Zn} - [ADK - Zn] \quad (22)$$

**Tabela 7.** Vrednosti konstanti stabilnosti kompleksa ADK sa  $Zn^{2+}$  jonom određene spektrofotometrijski metodom molskog odnosa; u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ). Rezultati predstavljaju srednje vrednosti tri izvedene probe za svaku supstancu.

Jed.	R-	$\lambda_{opt}$ (nm)	$K_s \pm sd$ ( $M^{-1}$ )	$\log K_s \pm sd$	$R$
2	2-Me	360,1	$(7,43 \pm 0,89) \cdot 10^4$	$4,87 \pm 0,05$	1,01
3	3-Me	373,7	$(6,8 \pm 1,4) \cdot 10^4$	$4,8 \pm 0,1$	1,02
5	2,4-di-Me	360,9	$(1,04 \pm 0,22) \cdot 10^5$	$5,01 \pm 0,09$	1,21
6	2,4,5-tri-Me	371,1	$(1,01 \pm 0,10) \cdot 10^5$	$5,00 \pm 0,04$	1,03
8	$\beta$ -tetralinil	373,7	$(8,9 \pm 2,2) \cdot 10^4$	$4,9 \pm 0,1$	1,11
9	2,4,6-tri- <i>i</i> Pr	360,9	$(5,8 \pm 1,4) \cdot 10^{5*}$	$5,8 \pm 0,1$	0,92
15	3-Br	371,1	$(8,24 \pm 0,91) \cdot 10^4$	$4,91 \pm 0,05$	1,06
16	3-CF <sub>3</sub>	370,3	$(7,2 \pm 1,1) \cdot 10^4$	$4,85 \pm 0,07$	1,02

\* Dolazilo je do taloženja tokom titracije

Određivanje konstanti stabilnosti je izvedeno iz apsorpcionih podataka na tri talasne dužine. Pošto u dobijenim rezultatima nije bilo bitnih razlika, izveden je preliminarni zaključak da se u korišćenim eksperimentalnim uslovima gradi samo jedan kompleks. Takođe, spektri rastvora ADK sa  $Zn^{2+}$  jonom prolaze kroz izosbestičnu tačku, što je dokaz da u rastvoru postoji samo jedan ravnotežni proces.

U slučaju jedinjenja **1**, **10**, **13**, **14** i **20**, dobijene vrednosti  $R$  su bile neznatno veće od 1,20 (**Tabela 8**), što nas je navelo na sumnju da se u vodenim rastvorima ovih supstanci dešava još neki sporedni proces (obrazovanje drugog kompleksa, hidroliza metala itd.). Obrazovanje isključivo jednog kompleksa je preduslov (i glavno ograničenje) primene metode molskog odnosa u izračunavanju konstanti stabilnosti kompleksa.

**Tabela 8.** Vrednosti konstanti stabilnosti kompleksa ADK sa  $Zn^{2+}$  jonom određene spektrofotometrijski metodom molskog odnosa; u TBS-u pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ).

Jed.	R-	$\lambda_{opt}$ (nm)	$K_s \pm sd$	$\log K_s \pm sd$	$R$
1	H	372,8	$(1,38 \pm 0,20) \cdot 10^4$	$4,13 \pm 0,07$	1,50
10	4-OMe-2,5-di-Me	370,3	$(5,83 \pm 0,70) \cdot 10^4$	$4,76 \pm 0,05$	1,28
13	2-OMe	363,5	$(2,84 \pm 0,15) \cdot 10^4$	$4,45 \pm 0,02$	1,34
14	3-OMe	382,2	$(4,43 \pm 0,52) \cdot 10^4$	$4,64 \pm 0,06$	1,32
20	4- <i>N</i> -Me-piperazinil	372,8	$(4,82 \pm 0,33) \cdot 10^4$	$4,68 \pm 0,03$	1,35

Konstante stabilnosti ( $K_s$ ) kompleksa jedinjenja **2**, **3**, **5**, **6**, **8**, **9**, **15** i **16** sa  $Zn^{2+}$  jonom izračunate su i pomoću Rose-Drago metode za komplekse tipa ML, kao što je opisano jednačinama 14-19 u Opštem delu.<sup>108,109</sup> Jednačina 19 predstavlja najkomplikovaniji slučaj za određivanje  $K_s$  UV/VIS spektroskopijom, kada se preklapaju apsorpcioni spektri metala, liganda i kompleksa. Pošto  $Zn^{2+}$  ne apsorbuje elektromagnetno zračenje u oblastima talasnih dužina na kojima je izvedeno određivanje  $K_s$ , član  $\epsilon_M$  je izostavljen iz daljih proračuna. Na **Slici P30** u Prilogu prikazana je Excel tabela sa primerom izračunavanja  $K_s$  za jedinjenje **8** pomoću Rose-Drago metode. Dobijeni rezultati prikazani su u **Tabeli 9**.

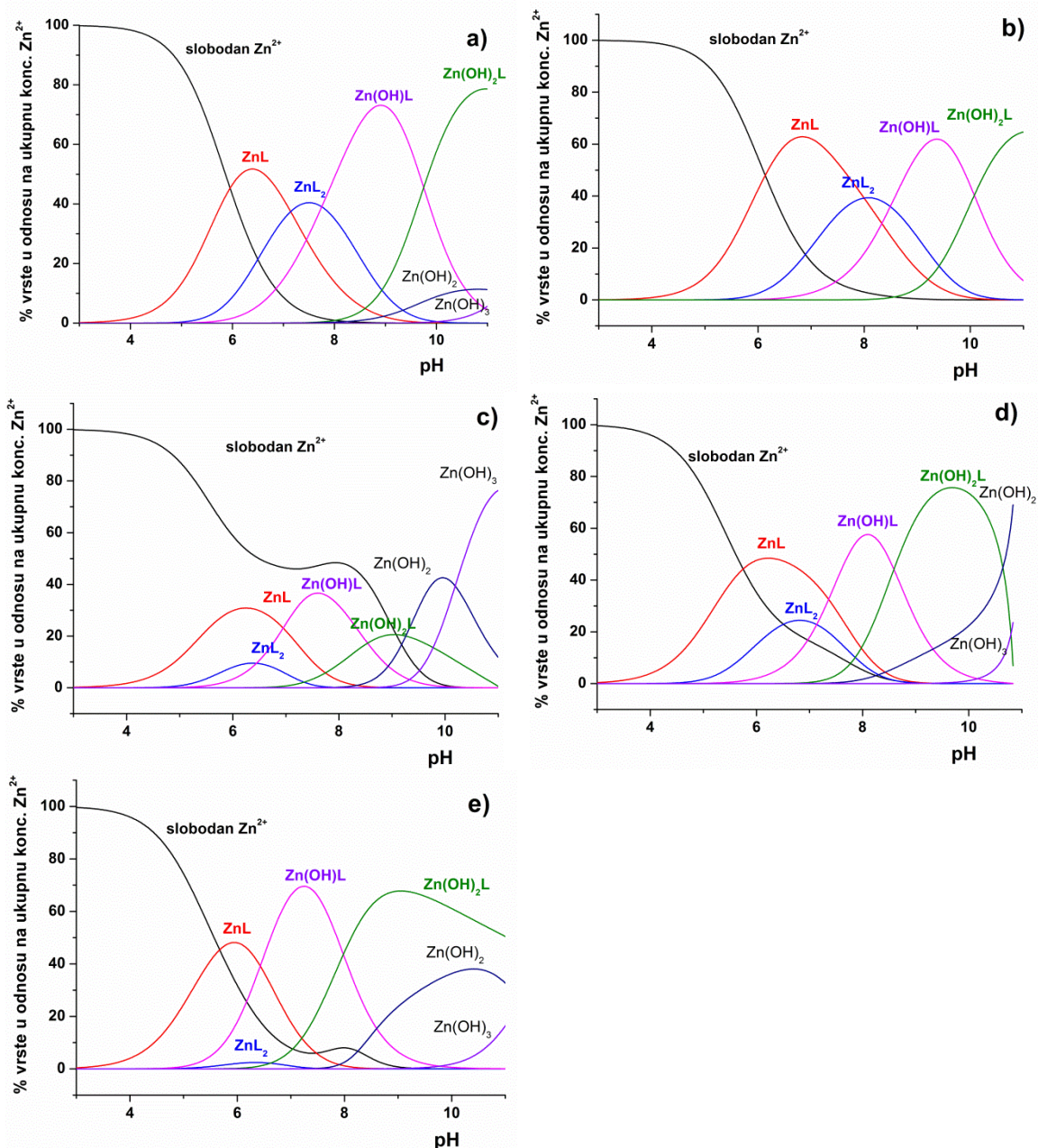
**Tabela 9.** Vrednosti konstanti stabilnosti kompleksa ADK sa  $Zn^{2+}$  jonom izračunate iz jednačina 20-22, kao i pomoću Rose-Drago metode.

Jed.	R-	$\lambda_{opt}$ (nm)	$\log K_s \pm sd$ (jed. 20-22)	$\log K_s \pm sd$ (Rose-Drago)
<b>2</b>	2-Me	360,1	$4,87 \pm 0,05$	$4,93 \pm 0,12$
<b>3</b>	3-Me	373,7	$4,8 \pm 0,1$	$4,99 \pm 0,09$
<b>5</b>	2,4-di-Me	360,9	$5,01 \pm 0,09$	$5,03 \pm 0,13$
<b>6</b>	2,4,5-tri-Me	371,1	$5,00 \pm 0,04$	$5,03 \pm 0,23$
<b>8</b>	$\beta$ -tetralinil	373,7	$4,9 \pm 0,1$	$4,71 \pm 0,22$
<b>9</b>	2,4,6-tri- <i>i</i> Pr*	360,9	$5,8 \pm 0,1$	$4,78 \pm 0,32$
<b>15</b>	3-Br	371,1	$4,91 \pm 0,05$	$4,66 \pm 0,09$
<b>16</b>	3-CF <sub>3</sub>	370,3	$4,85 \pm 0,07$	$5,17 \pm 0,15$

\* Dolazilo je do taloženja tokom titracije

Upârenim *t*-testom utvrđeno je da se rezultati dve metode izračunavanja  $K_s$  statistički značajno ne razlikuju. Vrednosti  $\log K_s$  za sve ADK su se kretale oko 5. Ovi rezultati ukazuju na to da ispitivane ADK kompleksiraju  $Zn^{2+}$  jon na pH vrednosti krvi i da je najverovatnija stehiometrija kompleksa koji nastaje 1:1 (M:L). Detaljnija studija uticaja supstitucije fenilnog jezgra na jačine interakcija ADK sa  $Zn^{2+}$  jonom nije urađena jer su međusobne razlike u  $\log K_s$  male, kao i zbog toga što je za deo seta ispitivanih supstanci postojala sumnja u obrazovanje više kompleksnih čestica u rastvoru. U slučaju kada u rastvoru istovremeno nastaje više kompleksnih vrsta različite stehiometrije, sastav rastvora i konstante stabilnosti pojedinačnih kompleksnih vrsta mogu se odrediti primenom potenciometrijskih kiselinsko-baznih titracija. Potenciometrija je iskorišćena u okviru ove disertacije za detaljnije proučavanje reakcije

kompleksiranja ADK sa  $Zn^{2+}$  jonom. Potenciometrijske kiselinsko-bazne titracije izvedene su u opsegu pH vrednosti 2,5-11,0. Rastvori smeša pet različitih ADK (**1**, **3**, **5**, **6**, **15**) i  $Zn^{2+}$  (1:1 i 2:1, L:M) zakišeljani su standardnim rastvorom 0,1 M HCl, pa titrovani standardnim rastvorom 0,1 M NaOH. Eksperimentalno dobijeni podaci obrađeni su programom HYPERQUAD 2008;<sup>98</sup> na osnovu dobijenih rezultata konstruisani su dijagrami raspodele ispitivanih vrsta, prikazani na **Slikama 46a-46e**.



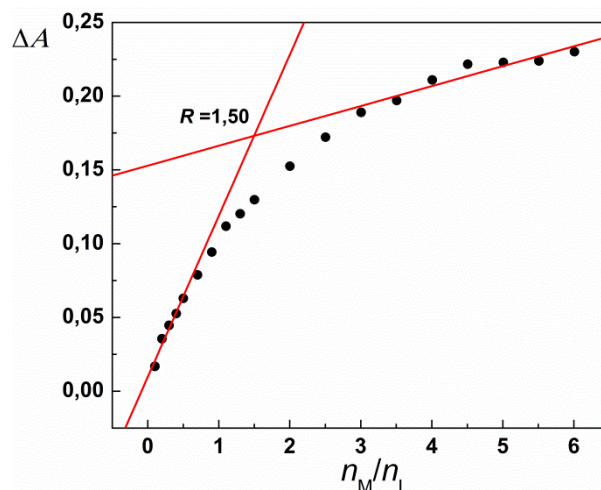
**Slika 46.** Dijagrami raspodele titrovanih sistema pet različitih ADK i  $Zn^{2+}$  jona: a) jedinjenje **1**; b) jedinjenje **3**; c) jedinjenje **5**; d) jedinjenje **6**; e) jedinjenje **15**; ADK i  $Zn^{2+}$  su pomešani u odnosu 2:1; naelektrisanja kompleksnih čestica su izostavljena radi jednostavnijeg prikaza rezultata.

Na prikazanim dijagramima se vidi da su kompleksi tipa ML i ML<sub>2</sub> zastupljeni u pH oblasti od 4,0 do 7,5. Primećeno je, takođe, da u rastvoru sa pH < 4, Zn-ADK kompleksi gotovo da ne postoje. Ovaj rezultat je u skladu sa rezultatom prikazanim na **Slici 43a**, gde je spektrofotometrijski pokazano da ne dolazi do kompleksiranja između ADK i Zn<sup>2+</sup> u vodenom rastvoru na pH 4,72. Molski udeo postojećih kompleksnih vrsta, kao i njihova stabilnost, se razlikuju kod svih ispitivanih ADK, što potvrđuje pretpostavku da vrsta i položaj supstituenata na fenilom jezgru bitno utiču na afinitet ka kompleksiranju ADK sa M<sup>2+</sup> jonima.<sup>104</sup> Na pH vrednosti krvi (7,4), najzastupljenije čestice su ZnADK (ML) i Zn(OH)ADK (**Tabela 10**). Na višim pH vrednostima dominantni su kompleksi Zn(OH)ADK i Zn(OH)<sub>2</sub>ADK.

**Tabela 10.** Zastupljenost čestica u odnosu na ukupnu koncentraciju Zn<sup>2+</sup> jona na pH = 7,4.

Jed.	Slobodan Zn <sup>2+</sup> (%)	ZnADK (%)	ZnADK <sub>2</sub> (%)	Zn(OH)ADK (%)	Zn(OH) <sub>2</sub> ADK (%)
<b>1</b>	4,628	32,428	39,488	23,168	0,083
<b>3</b>	9,025	57,369	28,303	5,159	0,008
<b>5</b>	46,085	14,825	2,504	33,209	1,912
<b>6</b>	13,215	34,144	20,689	29,841	1,535
<b>15</b>	6,058	9,358	0,407	69,419	14,510

Kompleks tipa ML<sub>2</sub> je takođe prisutan u manjoj meri, a na datom pH najzastupljeniji je u slučaju jedinjenja **1**. Ovaj podatak se može povezati sa odstupanjima primećenim na grafiku molskog odnosa jedinjenja **1** (**Slika 47**), gde je dobijena vrednost *R* (1,50) značajno različita od vrednosti *R* dobijenih za ostale ADK i od teorijske vrednosti 1 za kompleks tipa ML.



**Slika 47.** Grafik molskog odnosa za formiranje kompleksa jedinjenja **1** sa  $Zn^{2+}$  jonom. Snimano u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

Vrednosti konstanti stabilnosti svih kompleksnih vrsta prisutnih u ispitivanim sistemima su prikazane u **Tabeli 11**, a izračunate srednje vrednosti konstanti date su u **Tabeli 12**.

Dobijene vrednosti za konstante stabilnosti kompleksa ML se kreću u intervalu od 4,45 do 5,10, što je u skladu sa rezultatima dobijenim metodom molskog odnosa. Najnižu konstantu stabilnosti ima kompleks jedinjenja **6** sa  $Zn^{2+}$  jonom, a najvišu kompleks jedinjenja **15** sa  $Zn^{2+}$  jonom.

Vrednosti konstanti stabilnosti ( $\log\beta_2$ ) kompleksa tipa  $ML_2$  se kreću u intervalu od 8,21 do 9,40, pri čemu najnižu vrednost ima kompleks jedinjenja **6** sa  $Zn^{2+}$  jonom, a najvišu kompleks jedinjenja **1** sa  $Zn^{2+}$  jonom.



**Tabela 11.** Konstante stabilnosti  $Zn_pL_qH_r$  kompleksa (L = H-ADK (1), 3-Me ADK (3), 2,4-di-Me ADK (5), 2,4,5-tri-Me ADK (6) i 3-Br ADK (15)) i svih prisutnih vrsta u titrovanom sistemu; L/M predstavlja molski odnos liganda i metala u polaznoj smeši za titraciju. Negativne vrednosti indeksa  $r$  ( $H_1$  i  $H_2$ ) označavaju OH i  $(OH)_2$  u kompleksu;  $I = 0,1$  M (NaCl),  $t = 25 \pm 1^\circ C$ .

Vrste ( $p,q,r$ )	$\log\beta \pm sd$									
	H-ADK (1)		3-Me-ADK (3)		2,4-di-Me-ADK (5)		2,4,5-tri-Me-ADK (6)		3-Br-ADK (15)	
	L/M = 1	L/M = 2	L/M = 1	L/M = 2	L/M = 1	L/M = 2	L/M = 1	L/M = 2	L/M = 1	L/M = 2
(0, 1, 1) <sup>a</sup>	7,56		7,52		7,28		6,45		7,15	
(0, 1, 2) <sup>b</sup>	9,62		9,79		9,30		8,90		9,49	
(1, 1, 0)	4,91±0,03	5,18±0,05	4,92±0,03	5,09±0,03	4,88±0,05	4,77±0,13	4,22±0,11	4,54±0,11	5,05±0,05	5,18±0,04
(1, 2, 0)	–	9,42±0,08	9,20±0,07	9,07±0,05	–	9,26±0,10	–	8,45±0,08	–	8,81±0,06
(1, 1, -1)	-2,62±0,04	-2,76±0,08	-2,30±0,03	-2,89±0,04	-2,59±0,05	-2,18±0,12	-2,39±0,04	-2,82±0,09	-1,46±0,04	1,25±0,07
(1, 1, -2)	12,52±0,07	-12,62(9)	12,49±0,04	-12,64±0,08	11,90±0,08	10,72±0,13	10,87±0,09	11,41±0,10	10,08±0,08	9,23±0,09
Statistika	$\chi^2 = 11,24$ $sd = 0,91$	$\chi^2 = 12,10$ $sd = 1,01$	$\chi^2 = 12,76$ $sd = 1,03$	$\chi^2 = 13,07$ $sd = 1,14$	$\chi^2 = 12,43$ $sd = 1,08$	$\chi^2 = 12,10$ $sd = 1,13$	$\chi^2 = 12,46$ $sd = 0,61$	$\chi^2 = 41,56$ $sd = 0,54$	$\chi^2 = 13,56$ $sd = 0,54$	$\chi^2 = 14,65$ $sd = 0,36$

<sup>a</sup>  $pK_{a2}$  vrednost odgovarajuće ADK; <sup>b</sup> zbir  $pK_{a1}$  i  $pK_{a2}$  vrednosti odgovarajuće ADK

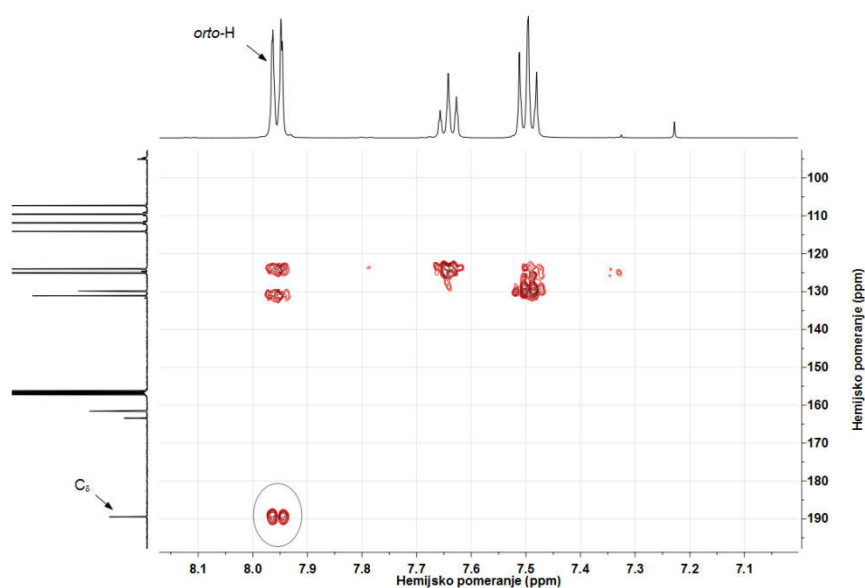
**Tabela 12.** Srednje vrednosti konstanti stabilnosti  $Zn_pL_qH_r$  kompleksa dobijenih potenciometrijskim titracijama rastvora smeše  $Zn^{2+}$  i ADK (L:Zn=1:1 i L:Zn=2:1);  $I = 0,1$  M (NaCl),  $t = 25 \pm 1^\circ C$ .

Vrste ( <i>p,q,r</i> )	$\log\beta \pm sd$				
	H-ADK (1)	3-Me ADK (3)	2,4-di-Me ADK (5)	2,4,5-tri-Me ADK (6)	3-Br ADK (15)
(0, 1, 1) <sup>a</sup>	7,56	7,52	7,28	6,45	7,15
(0, 1, 2) <sup>b</sup>	9,62	9,79	9,30	8,90	9,49
(1, 1, 0)	5,08±0,04	5,04±0,04	4,97±0,05	4,45±0,07	5,10±0,05
(1, 2, 0)	9,40±0,05	9,23±0,06	8,88±0,12	8,21±0,12	8,73±0,05
(1, 1, -1)	-2,37±0,04	-2,29±0,04	-2,21±0,05	-2,25±0,03	-1,51±0,04
(1, 1, -2)	-12,12±0,06	-12,36±0,06	-11,39±0,07	-10,86±0,04	-10,00±0,06
Statistika	$\chi^2 = 13,24$ $sd = 0,94$	$\chi^2 = 12,10$ $sd = 1,13$	$\chi^2 = 11,22$ $sd = 1,23$	$\chi^2 = 14,10$ $sd = 0,32$	$\chi^2 = 12,15$ $sd = 0,33$

<sup>a</sup>  $pK_{a_2}$  vrednost odgovarajuće ADK; <sup>b</sup> zbir  $pK_{a_1}$  i  $pK_{a_2}$  vrednosti odgovarajuće ADK

### 3.2.3. Tautomerija ADK u vodenoj sredini

ADK kao enolizabilni 1,3-diketoni podležu keto-enolnoj tautomeriji. One u rastvoru mogu postojati u dva enolna oblika (**Slika 21**, oblici **I** i **III**) koji su konformaciono „zaključani“ pseudo-šestočlanim prstenom (**IV**), i diketo obliku (**II**) koji je fleksibilniji usled postojanja dve rotabilne veze.<sup>116,120</sup> HMBC spektar jedinjenja **1** u čistoj  $CF_3COOD$  ( $pH < 0$ ), **Slika 48**, omogućio je utvrđivanje dominantnog tautomernog oblika u jako kiseljoj sredini, gde se **1** nalazi u obliku  $H_2A$ .<sup>119</sup>



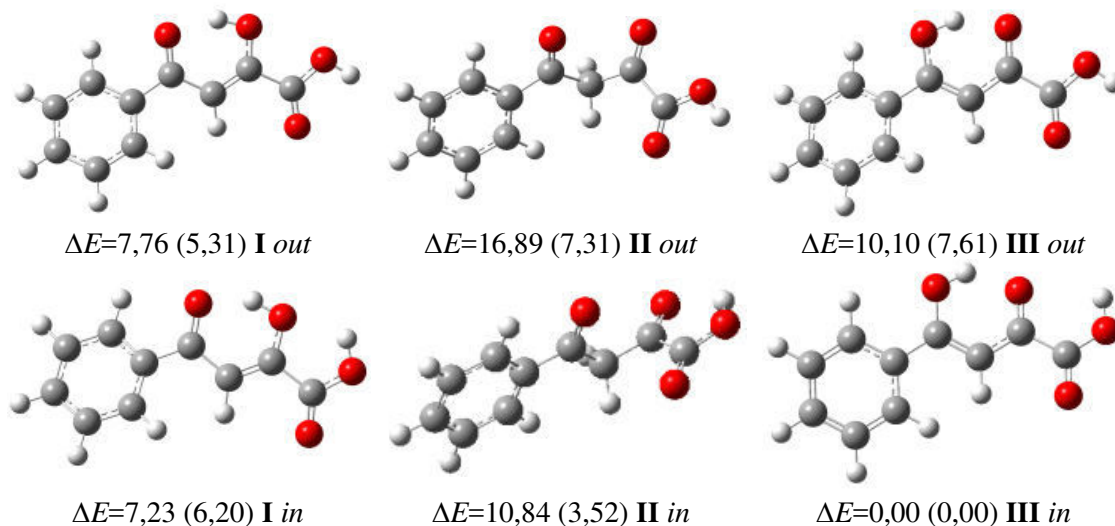
**Slika 48.** Karakteristični delovi 2D HMBC NMR spektra (500 MHz) jedinjenja **1** u čistoj  $\text{CF}_3\text{COOD}$ ;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1 \text{ M}$  ( $\text{NaNO}_3$ ). Signal koji potiče od kuplovanja između *orto*-H atoma benzenovog jezgra i keto grupe u položaju 4 alifatičnog dela molekula je zaokružen.

Jako kuplovanje kroz tri veze između *orto*-H atoma benzenovog jezgra i ugljenika keto grupe u položaju 4 alifatičnog dela molekula daje naznaku da je dominantni oblik u rastvoru enol **I**. U slučaju da je u rastvoru dominantan enolni oblik **III**, keto grupa bi se nalazila u položaju 2 alifatičnog niza i samim tim kuplovanje u HMBC spektru bi moralo ići kroz pet veza, što je manje verovatno. Postojanje diketo oblika **II** je isključeno iz dva razloga. Singlet na oko 4,5 ppm koji bi poticao od  $-\text{CH}_2-$  grupe, nije primećen, ali ovo nije dovoljna potvrda izostanka oblika **II** iz rastvora jer se H atomi  $-\text{CH}_2-$  mogu izmeniti sa D atomima iz rastvarača. Potvrda nepostojanja oblika **II** u rastvoru dobijena je iz  $^{13}\text{C}$  NMR spektra (**Slika P31**), gde signal  $\text{C}_3$  ugljenika diketo oblika na oko 50 ppm nije primećen.

### 3.2.3.1. Kvantno-hemijsko proučavanje stabilnosti različitih oblika jedinjenja **1** u rastvoru

Stabilnost različitih tautomerih oblika **1** u rastvoru proučavana je kvantno-hemijski, koristeći MP2 metod i 6-31G (d,p) bazis set. Uticaj rastvarača na stabilnost tautomera simuliran je koristeći PCM model vode. Vodonikov atom karboksilne grupe postavljen je na dva načina: orijentisan ka molekulu, gradeći intramolekulsku vodoničnu vezu sa atomima kiseonika (položaj označen kao *in*) i orijentisan ka spolja,

omogućavajući vodonično vezivanje sa molekulima rastvarača (položaj označen kao *out*). Optimizovane geometrije svih oblika i relativne energije u odnosu na najstabilniji oblik (u vakuumu i sa PCM modelom rastvarača) su prikazane na **Slici 49**.



**Slika 49.** Optimizovane geometrije svih tautomera jedinjenja **1**, izračunate koristeći MP2/6-31G (d,p) metod. Razlike u energijama ( $\Delta E$ , date u kJ/mol) predstavljaju relativne energije u odnosu na najstabilniji tautomer u vakuumu i sa PCM modelom vode (vrednosti date u zagradama).

Energije solvatacije i dipolni momenti svih oblika jedinjenja **1** su prikazane u **Tabeli 13**.

**Tabela 13.** Razlike u energijama između solvatisanih i nesolvatisanih tautomernih oblika jedinjenja **1** i dipolni momenti ( $\mu$ ) ovih oblika.

Oblik	$\Delta E_{\text{solvatacije}}$ (kJ/mol)	$\mu$ (D)
<b>I out</b>	25,65	3,44
<b>I in</b>	24,18	4,98
<b>II out</b>	32,76	5,50
<b>II in</b>	30,50	6,73
<b>III out</b>	25,69	3,72
<b>III in</b>	23,18	6,04

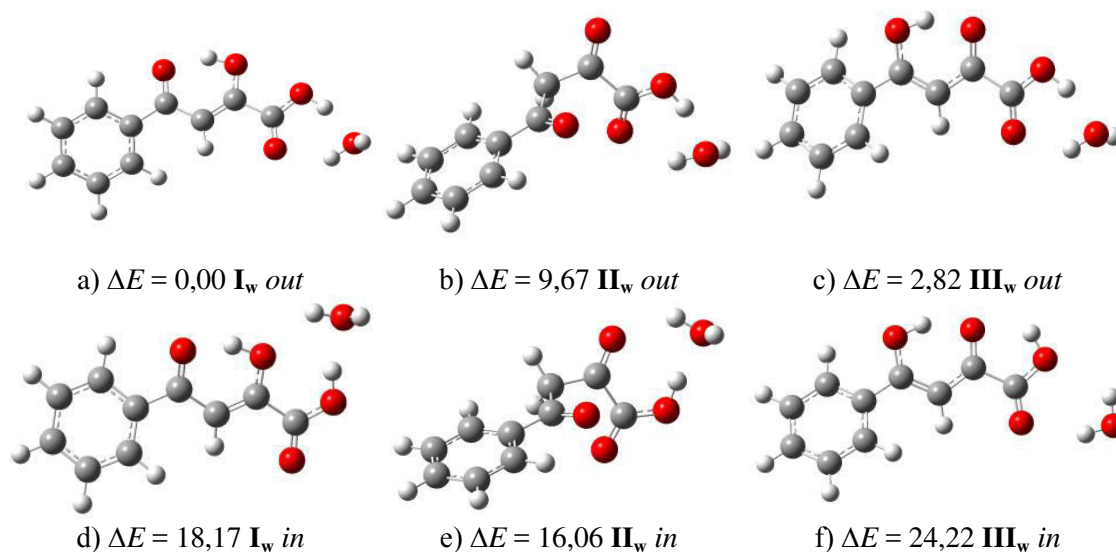
Diketo oblici **II** su se pokazali kao najmanje stabilni, ali se razlika u energiji značajno smanjila nakon primene implicitnog modela rastvarača (od 10,84 do 3,52 kJ/mol za diketo oblik **II in**). Objašnjenje leži u činjenici da diketo oblici **II** povoljnije elektrostatički interaguju sa polarnim dielektričnim kontinuumom rastvarača usled većih dipolnih momenata u odnosu na enolne oblike **I** i **III**. Razlika u energijama između dva enolna oblika sa *in* orijentacijom karboksilnog H atoma iznosila je 7,23 kJ/mol u

vakuumu i 6,20 kJ/mol u implicitnom modelu rastvarača. Poredeći tri tautomera sa *out* orijentacijom karboksilnog H atoma, najstabilniji oblik je enol **I**. Razlika u energiji između enol **I** *out* i enol **III** *out* oblika iznosi 2,34 kJ/mol u vakuumu, odnosno 2,30 kJ/mol kada se primeni model implicitne solvatacije. Enol **I** *out* je za 9,13 kJ/mol stabilniji od diketo **II** *out* oblika u vakuumu, a samo 2,00 kJ/mol kada se uzme u obzir i (PCM) solvatacija.

Iako ova izračunavanja predlažu oblike sa *in* orijentacijom karboksilnog H atoma kao energetske stabilnije oblike, realno je očekivati postojanje stabilnih *out* oblika u protičnom rastvaraču kakav je voda. Postojanje tautomera **III** *in* koji je po MP2/PCM izračunavanjima najstabilniji oblik u rastvoru je upitno, pošto ne postoje eksperimentalni podaci o njegovom postojanju kod ADK ili strukturno sličnih jedinjenja. Kvantno hemijska izračunavanja stabilnosti jedinjenja L-731,988, aril-diketo kiseline sa *N*-benzil supstituisanim pirolom kao aroil delom molekula, takođe opisuju analog enola **III** kao najstabilniji tautomer, kada se efekti solvatacije simuliraju primenom PCM modela vode.<sup>120</sup>

S obzirom da PCM model rastvarača ne uzima u obzir vodonično vezivanje molekula sa vodom već samo obračunava dipolarne interakcije, uradili smo seriju novih optimizacija geometrije u kojima smo eksplicitno uključili i jedan molekul vode vodonično vezan za karboksilnu grupu. Optimizovane geometrije svih tautomera i njihove energije su prikazane na **Slici 50**.

Enol **I** *out* oblik u paru sa molekulom vode (enol **I<sub>w</sub>** *out*) je najstabilniji od svih šest oblika, nakon čega slede enol **III<sub>w</sub>** *out I* ( $\Delta E = 2,82$  kJ/mol) i diketo **II<sub>w</sub>** *out* ( $\Delta E = 9,67$  kJ/mol) oblici. Svi oblici sa *in* orijentacijom karboksilnog H atoma su manje stabilni. Dodatak jednog molekula vode, koji je omogućio karboksilnoj grupi da ispolji HBD sposobnost doveo je do rezultata koji su u skladu sa eksperimentima.

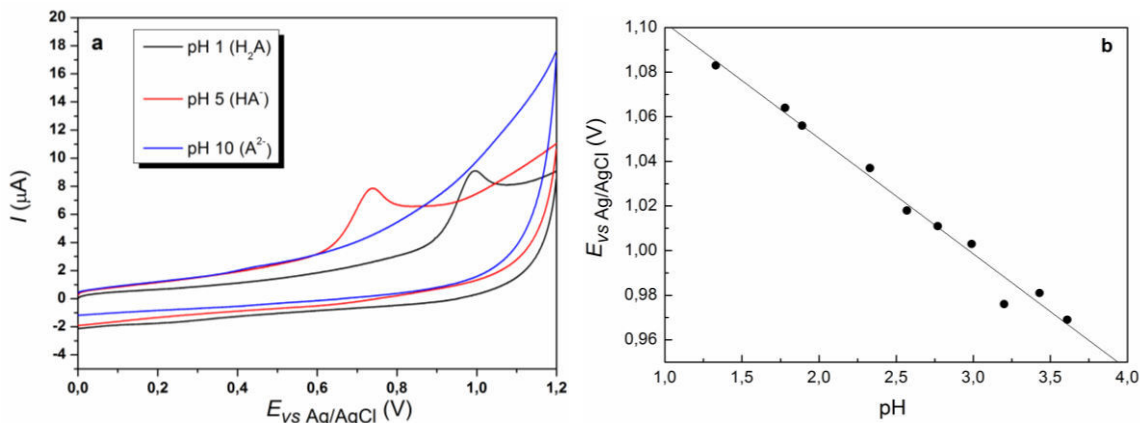


**Slika 50.** Optimizovane strukture svih tautomera **1** sa jednim molekulom vode, optimizovane na MP2/6-31G (d,p) nivou. Prikazane su relativne energije ( $\Delta E$ , u kJ/mol) u odnosu na enol **I<sub>w</sub> out** oblik.

### 3.2.4. Elektrohemijske osobine ADK

Elektrohemijske osobine nekoliko alkil i poli-alkil supstituisanih ADK (**Tabela 14**) proučavane su pomoću ciklične voltametrije (CVO) i diferencijalne pulsne polarografije (DPP). Ispitivan je uticaj supstituenata fenilnog prstena na elektrohemijsko ponašanje ADK i eksperimentalno dobijeni potencijali oksidacije i redukcije korelisani su sa različitim strukturnim deskriptorima.

Cikični voltamogrami (CVM) ispitivanih derivata snimljeni su na elektrodi od staklastog ugljenika (Glassy Carbon Electrode, GCE) u vodenim Britton-Robinson puferima pH opsega od 1 do 10. Reprezentativni CVM čistih  $H_2A$ ,  $HA^-$  i  $A^{2-}$  oblika 4-Me supstituisane ADK (**22**) su prikazani na **Slici 51a**, kao i zavisnost potencijala oksidacije ( $E_{oks}$ ) od pH (**Slika 51b**). CVM ostalih derivata dati su u Prilogu, **Slika P32**.



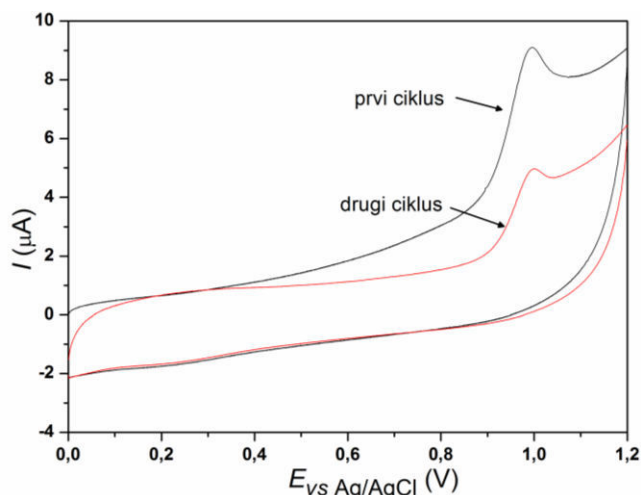
**Slika 51.** a) Ciklični voltamogrami jedinjenja **22** snimljeni u Britton-Robinson puferu na pH 1, pH 5 i pH 10; b)  $E = f(\text{pH})$  zavisnost za jedinjenje **22**,  $E = a + b \cdot \text{pH}$ ,  $a = (1,154 \pm 0,006)$  V,  $b = (-52 \pm 2)$  mV/pH,  $r^2 = 0,992$ ; ( $c_{22} = 4,851 \cdot 10^{-5}$  M, brzina skeniranja 200 mV/s,  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

Kod svih proučavanih ADK uočeno je postojanje samo jednog oksidacionog pika na  $\text{pH} = 1$ . Potencijali na kojima se nalaze oksidacioni pikovi svih proučavanih ADK dati su u **Tabeli 14**. Odnos broja protona i elektrona koji su uključeni u oksidaciju ADK određen je iz promene potencijala oksidacionog pika u funkciji pH vrednosti rastvora, u opsegu pH od 1 do 3,5 (**Slika 51b**). Dobijeni nagib  $(-52 \pm 2 \text{ mV/pH})$  je blizu po vrednosti idealnom Nernstovom nagibu ( $59 \text{ mV/pH}$ ), što navodi na zaključak da u elektrodnoj reakciji oksidacije u proučavanoj pH oblasti učestvuje isti broj protona i elektrona. Pretpostavljeno je da je oksidacija ADK jednoelektronski proces koji uključuje gubitak jednog protona (najverovatnije protona karboksilne grupe ADK).

Sa porastom pH vrednosti rastvora oksidacija je olakšana, što se vidi po pomeranju oksidacionih pikova ka nižim elektrodnim potencijalima. Istovremeno, jačina struje opada sa porastom pH vrednosti što se objašnjava jačom adsorpcijom mono- ( $\text{HA}^-$ ) i dianjona ADK ( $\text{A}^{2-}$ ) na površini GCE. Na  $\text{pH} = 10$  oksidacioni pik ne postoji ili je zanemarljivog intenziteta (**Slika 51a**). CVM su snimani pri brzini skeniranja od 50 do 500 mV/s; pri svim brzinama skeniranja dobijen je voltamogram koji odgovara ireverzibilnom elektrohemijском sistemu (odsustvo redukcionog pika).

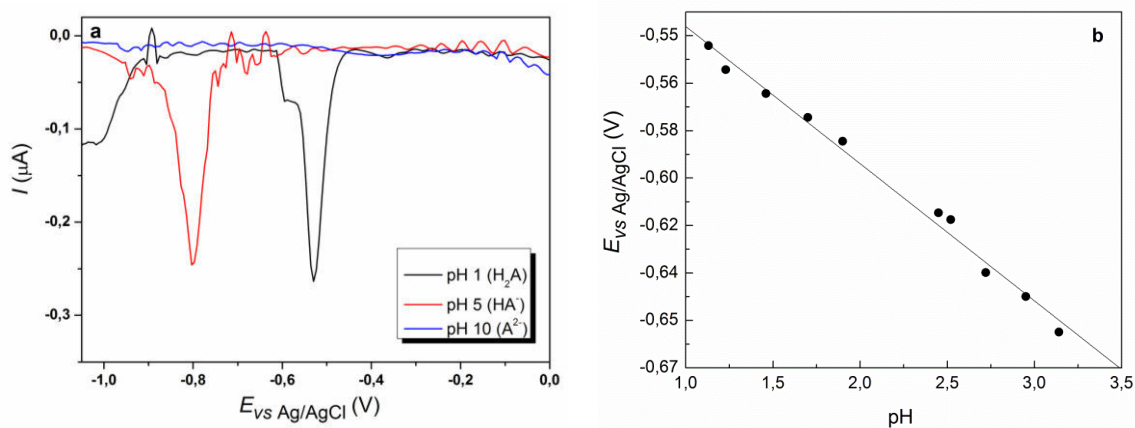
Jednoelektronskom oksidacijom ADK nastaje radikal-katjon, od čije stabilnosti zavisi da li će se on dalje transformisati elektrohemijски ili hemijски. Usled izostanka reverzibilnog katodnog pika, zaključeno je da radikal-katjon stupa u hemijску reakciju polimerizacije na površini elektrode. U drugom ciklusu snimanja (**Slika 52**) jačina struje

značajno opada, što se dešava u slučaju jake adsorpcije analita na površini elektrode od staklastog ugljenika. Adsorpcija strukturno sličnih molekula na površini GCE opisana je u literaturi.<sup>159,160</sup>



**Slika 52.** Ciklični voltamogrami jedinjenja **22** snimljeni u dva ciklusa ( $c_{22} = 4,851 \cdot 10^{-5}$  M, brzina skeniranja 200 mV/s,  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

Pošto je CVO pokazala da je elektrohemijsko ponašanje ADK ireverzibilno, DPP sa kapljućom živinom elektrodom upotrebljena je u svrhu ispitivanja redukcionih osobina ADK u vodenim rastvorima čije su pH vrednosti od 1 do 10. Polarogrami jedinjenja **1** na pH 1, pH 5 i pH 10 i zavisnost potencijala redukcije ADK od pH rastvora su prikazani na **Slici 53**.



**Slika 53.** a) Diferencijalno pulsni polarogrami jedinjenja **1** u Britton-Robinson-ovom puferu pH vrednosti 1, 5 i 10; b)  $E = f(\text{pH})$  zavisnost za jedinjenje **1**,  $E = a + b \cdot \text{pH}$ ,  $a = (-0,538 \pm 0,005)$  V,  $b = (-58 \pm 2)$  mV,  $r^2 = 0,995$ ; ( $c_1 = 5,214 \cdot 10^{-5}$  M, brzina skeniranja 13 mV/s,  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

Polarogrami ostalih proučavanih ADK dati su u Prilogu, **Slika P33**. Pošto je nagib  $E = f(\text{pH})$  zavisnosti veoma blizu Nernstovskog ( $58 \pm 2$ ) mV, redukcija je kao i oksidacija



najverovatnije jednoelektronski proces. Sa porastom pH vrednosti, redukcionni potencijali se pomeraju ka negativnijim vrednostima da bi na pH 10 redukcionni pik potpuno iščezao. Na pH vrednosti 10 ADK se nalaze u A<sup>2-</sup> obliku i dodatak jednog elektrona redukcijom je energetski nepovoljan proces. Oksidacioni i redukcionni potencijali proučavanih ADK su prikazani u **Tabeli 14**.

**Tabela 14.** Oksidacioni i redukcionni potencijali elektrohemijски proučavanih ADK u Britton–Robinson puferu pH vrednosti 1, 5 i 10.

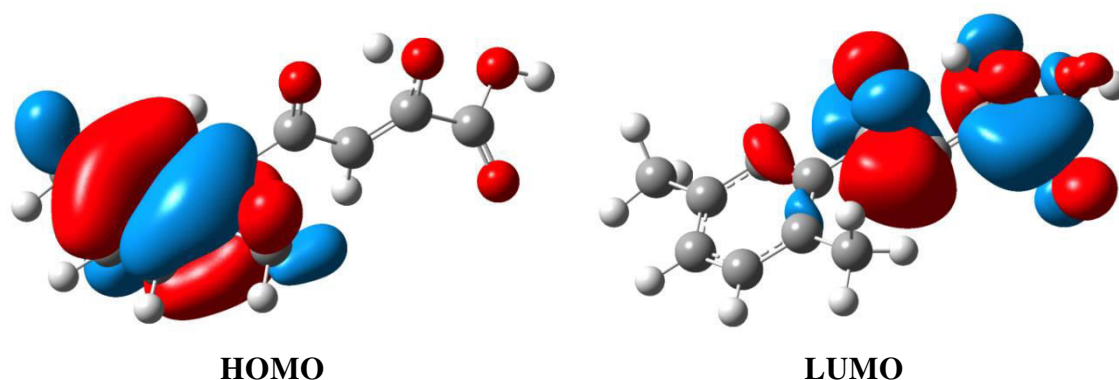
Jed.	R-	$E_{ox}$	$E_{ox}$	$E_{ox}$	$E_{red}$	$E_{red}$
		pH 1 (V)	pH 5 (V)	pH 10 (V)	pH 1 (V)	pH 5 (V)
1	H	1,008	0,717	Nije primećen	-0,530	-0,797
2	2-Me	1,004	0,744	0,568	-0,542	-0,786
3	3-Me	0,994	0,748	0,625	-0,530	-0,774
5	2,4-di-Me	0,997	0,750	0,514	-0,553	-0,792
6	2,4,5-tri-Me	1,002	0,795	0,510	-0,548	-0,762
7	2,3,5,6-tetra-Me	0,936	0,713	0,524	-0,500	-0,738
22	4-Me	0,993	0,737	Nije primećen	-0,548	-0,809
23	2,5-di-Me	0,996	0,736	0,520	-0,548	-0,762
24	3,4-di-Me	1,005	0,751	0,444	-0,553	-0,780

Elektrohemijске redoks reakcije uključuju transfer elektrona između elektroaktivne vrste i površine elektrode. U pitanju je heterogeni proces na koji utiču i mnogi drugi efekti pored čisto elektronskih. Način prilaska molekula elektrodi, njegova orijentacija kao i priroda dvostrukog električnog sloja na površini elektrode imaju dobro poznat uticaj na transfer elektrona.<sup>161</sup>

U pokušaju da se napravi kvantitativna, statistički značajna i fizički smisljena korelacija između eksperimentalno dobijenih elektrodnih potencijala oksidacije i redukcije i strukturnih osobina proučavanih jedinjenja upotrebljeno je nekoliko kvantno-mehanički izračunatih deskriptora. Pošto se očekuje da se energije graničnih molekularskih orbitala (Frontier Molecular Orbital – FMO) - najviše popunjene molekulske orbitale (HOMO – Highest Occupied Molecular Orbital) i najniže nepopunjene molekulske orbitale (LUMO – Lowest Unoccupied Molecular Orbital) korelišu sa oksidacionim i redukcionim potencijalima, izračunate su energije FMO

enol **I** oblika sa *out* orijentacijom COOH<sub>2</sub> vodonika svih proučavanih ADK pomoću MP2/6-31G(d,p), bez primene implicitnog modela rastvarača. Raspodela elektronske gustine HOMO i LUMO jedinjenja **23** data je na **Slici 54**, dok se slike FMO ostalih jedinjenja nalaze u Prilogu, **Slike P34 i P35**.

Kod svih proučavanih jedinjenja HOMO elektronska gustina je lokalizovana pretežno na fenilnom prstenu dok se LUMO nalaze uglavnom na butenolnom delu molekula. Ovakva lokalizacija FMO je izraženija kod *orto*-supstituisanih jedinjenja.



**Slika 54.** Raspodela elektronske gustine HOMO i LUMO jedinjenja **23**, prikazane na izokonturnom nivou od 0,03.

Polazeći od prethodno optimizovanih struktura jedinjenja **1-3**, **5-7**, **22-24**, izračunavanjima u jednom koraku (single point calculations) dobijene su energije najviših polupopunjenih molekulskih orbitala ( $\alpha$ SOMO - Singly Occupied Molecular Orbital) i energije  $\alpha$ LUMO orbitala radikal katjona i radikal anjona ovih jedinjenja. Takođe su optimizovane i geometrije monoanjona svih jedinjenja koristeći isti metod, polazeći opet od potpuno optimizovanih struktura molekulskih oblika. Izračunavanjima u jednom koraku su iz optimizovanih struktura HA<sup>-</sup> oblika dobijene  $\alpha$ SOMO i  $\alpha$ LUMO energije radikal dianjona.

Shodno eksperimentalno određenim pK<sub>a</sub> vrednostima (**Tabela 6**), na pH 1 sva jedinjenja se pretežno nalaze u H<sub>2</sub>A obliku, dok na pH 5 dominira HA<sup>-</sup> oblik. Zato su za korelacije sa redoks potencijalima korišćeni deskriptori oblika dominantnih na pH vrednosti eksperimenta. Vrednosti svih deskriptora i interkorelacione matrice date su u Prilogu, **Tabele P30-P32**.

Isključivanjem jedinjenja **7** iz seta podataka sledeće korelacije sa *r* vrednostima preko 0,9 postaju statistički beznačajne:

- $E_{red}$  na pH 1 i vrednosti razlike energija SOMO-LUMO za radikal katjone;

- $E_{\text{red}}$  na pH 1 i vrednosti razlike energija SOMO-LUMO za radikal anjone;
- $E_{\text{oks}}$  na pH 5 i vrednosti dipolnih momenata radikal katjona;
- $E_{\text{oks}}$  na pH 1 i vrednosti dipolnih momenata radikal katjona.

U pokušaju dobijanja fizički smislenih modela sa boljom statistikom, u set deskriptora uključena je i indikatorska varijabla ( $I$ ). Ova varijabla se odnosi na tip supstitucije fenilnog prstena, i to na način da za svaku *orto*- i *meta*-metil grupu dodajemo vrednost 1, dok za *para*-metil grupu računamo vrednost 0, kao i za odsustvo supstituenta u bilo kom položaju. Ovako definisana indikatorska varijabla na neki način kvantifikuje sterna uticaj supstituenata, a sterna efekti mogu uticati na način orijentacije i prilaska molekula elektrodi. Uvođenje indikatorske varijable se pokazalo korisnim, pošto su za redukcione potencijale na pH 5 dobijene dve statistički značajne korelacije, koje uključuju energije LUMO orbitala anjona i radikal anjona i indikatorsku varijablu (jednačine 23 i 24):

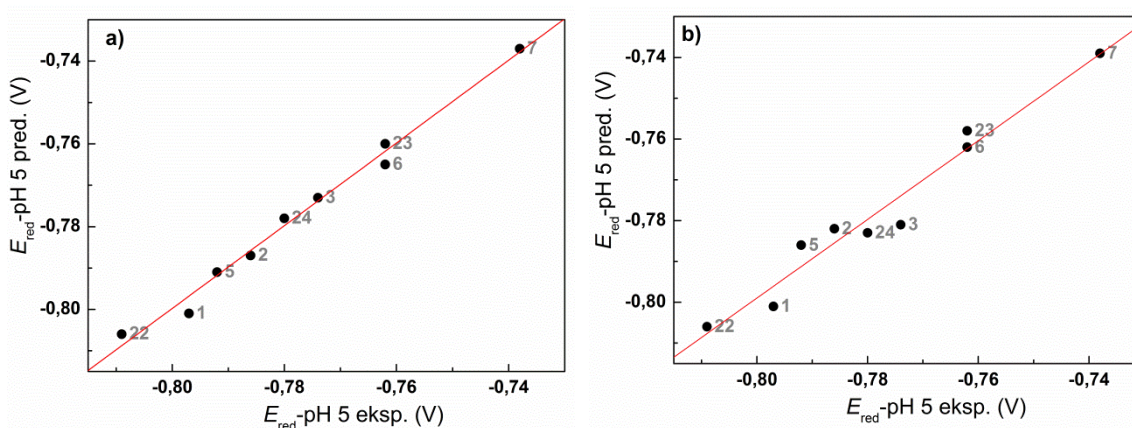
$$E_{\text{red\_pH\_5}} = -3,059(\pm 1,170) \cdot E_{\text{LUMO\_anjona}} + 0,0275(\pm 0,0045) \cdot I - 0,610(\pm 0,073) \quad (23)$$

( $n = 9$ ;  $r = 0,994$ ;  $sd = 0,003$ ;  $F = 253,878$ ;  $q^2 = 0,977$ ;  $sd_{\text{PRESS}} = 0,004$ )

$$E_{\text{red\_pH\_5}} = -0,91(\pm 0,78) \cdot E_{\text{LUMO\_radikal\_anjona}} + 0,0231(\pm 0,0064) \cdot I - 1,15(\pm 0,30) \quad (24)$$

( $n = 9$ ;  $r = 0,980$ ;  $sd = 0,005$ ;  $F = 73,796$ ;  $q^2 = 0,709$ ;  $sd_{\text{PRESS}} = 0,013$ )

Grafički prikaz eksperimentalnih prema predviđenim vrednostima  $E_{\text{red}}$  na pH 5 dobijenim pomoću jednačina 10 i 11 dat je na **Slici 55**.



**Slika 55.** Korelacija eksperimentalno određenih potencijala redukcije i potencijala predviđenih na osnovu: a) jednačine 10; b) jednačine 11; pH = 5,  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

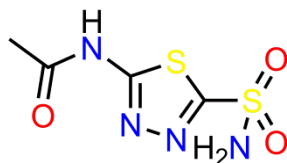
Slična korelacija se dobija uključivanjem razlike u energijama između  $\alpha$ SOMO i  $\alpha$ LUMO za radikal anjone i indikatorske varijable, ali je prediktivnost ( $q^2$  vrednost)

dobijena primenom LOO CV značajno niža. Treba napomenuti da je korelacioni koeficijent između  $E_{red}$  na pH 5 i same indikatorske varijable velik (0,953).

Posmatrajući brojčane vrednosti varijabli u jednačinama 23 i 24 i vrednosti odgovarajućih X koeficijenata, može se kvantifikovati relativni značaj svake varijable u objašnjavanju redukcionog potencijala ispitivanih jedinjenja. U oba slučaja značaj graničnih molekularskih orbitala dominira u odnosu na indikatorske varijable (dva puta veći kod jednačine 23 i četiri puta veći kod jednačine 24). Iz ovih podataka možemo izvući uopšteni zaključak da elektronski uticaj, kvantifikovan kroz energije graničnih molekularskih orbitala, ima značajniju ulogu od sternog faktora kvantifikovanog pomoću indikatorske varijable u procesu elektrohemijske redukcije jedinjenja na pH = 5. Korelacije seta deskriptora sa potencijalima redukcije na pH 1, kao i sa potencijalima oksidacije na pH 1 i pH 5 nisu bile statistički značajne kao prethodno opisane. Kod procesa oksidacije adsorpcija proizvoda elektrooksidacije na elektrodi (**Slika 52**) može biti uzrok statistički slabijih korelacija jer je takve adsorpcione uticaje teško kvantifikovati.

### 3.3. Inhibitorna aktivnost ADK i APK prema humanim karboanhidrazama

Trenutno poznati inhibitori karboanhidraza mogu se podeliti u dve grupe: oni koji direktno koordinuju cink u aktivnom mestu enzima i oni koji se indirektno vezuju za cink, uglavnom preko molekula vode kao vodonično vezanog medijatora. Većina inhibitora KA kao GVC poseduje sulfonamidnu grupu (npr. acetazolamid, AAZ, **Slika 56**), rede sulfamatnu ili sulfamidnu grupu.



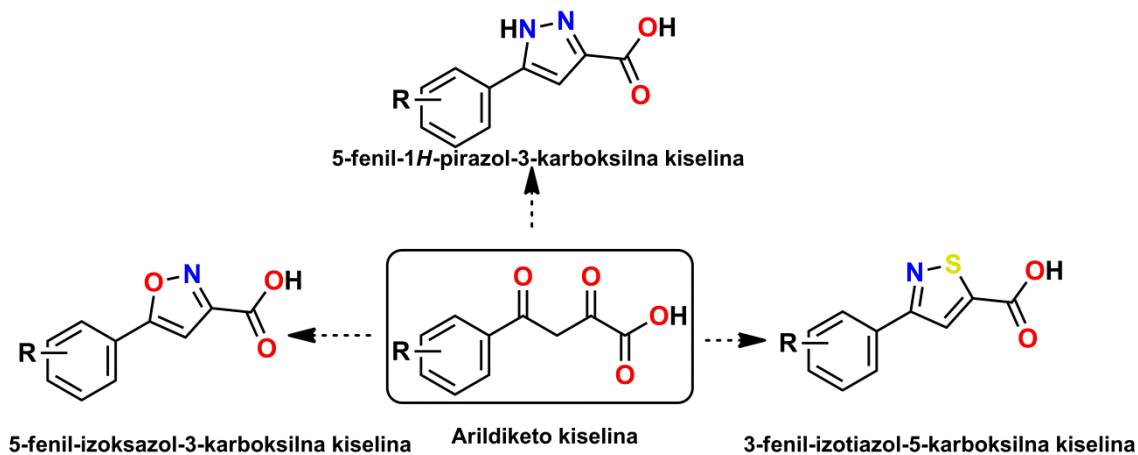
**Slika 56.** Struktura *N*-(5-sulfamoil-1,3,4-tiadiazol-2-il)acetamida (acetazolamida).

Ostale poznate GVC su hidroksamati, merkaptofenoli i kompleksirajući anjoni.<sup>64</sup> Brojni aromatični sulfonamidi su u kliničkoj upotrebi u terapiji različitih patoloških stanja kao što su glaukom, epilepsija, edem, visinska bolest, idiopatska intrakranijalna

hipertenzija.<sup>64,162</sup> Najveći problem većine inhibitora KA je to što se vezuju ne samo za željenu izoformu KA već i za mnoge druge KA koje nisu ciljane, čime izazivaju nuspojave. Zbog toga postoji potreba za razvojem novih struktura koje bi bile približno aktivne kao i sulfonamidi ali znatno selektivnije. Pokazano je da ADK i strukturno slična jedinjenja predstavljaju novu farmakoforu koja je aktivna i selektivna prema nekim izoformama KA.<sup>55</sup>

Pošto su karboksilati poznate GVC, a dokazana je sposobnost ADK da kompleksiraju  $Zn^{2+}$  jon, ispitana je inhibitorna aktivnost serije ADK prema izoformama humanih KA I i II. Nijedna od ispitanih ADK (**Tabela P33**) nije pokazala 50% inhibicije na krivama % inhibicije =  $f$ (koncentracija inhibitora) u opsegu koncentracija od 0,1 nM do 10  $\mu$ M (primer ovakve krive dat je za jedinjenje **3** na **Slici P36**). Mono-alkil supstituisane ADK (jedinjenja **3**, **4**, **22**) su pokazale najbolje inhibitorno dejstvo na KA I, dok su amino-supstituisane ADK (**17-21**) bile najaktivnije prema izoformi II. Pošto procenat inhibicije ni u jednom slučaju nije prelazio 50%, nije bilo moguće izračunati  $IC_{50}$  i  $K_i$  vrednosti i zaključeno je da su ispitivane ADK neaktivne prema ove dve izoforme KA. Moguće objašnjenje ovakvih rezultata može biti u tome da su ispitivane ADK u uslovima eksperimenta nestabilne (pre merenja koncentracije  $CO_2$  supstanca i enzim se inkubiraju najmanje 15 minuta)<sup>163</sup> i da dolazi do njihove dekarboksilacije tokom perioda inkubacije.

Poznato je da su jedinjenja koja sadrže 1,3-diketo strukturni fragment biološki labilna. Jedna od strategija za povećavanje metaboličke stabilnosti jedinjenja sa diketo fragmentom je njegovo prevođenje u metabolički stabilnu heteroaromatičnu grupu kao što je izoksazol, izotiazol ili 1*H*-pirazol (**Slika 57**).<sup>164</sup>

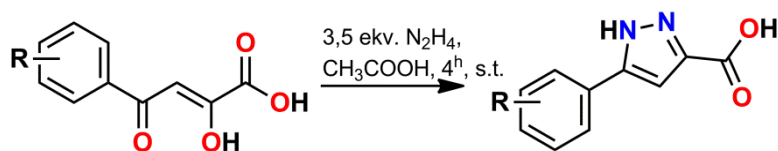


**Slika 57.** Dizajn fenil-supstituisanih heteroaromatičnih karboksilnih kiselina kao izostera arildiketo kiselina.

Prethodno pomenute strategije primenljive su i na ADK radi povećavanja metaboličke stabilnosti, i u okviru ovog rada sintetisana je serija jedinjenja gde je 1,3-diketo fragment zamenjen 1H-pirazolom.

### 3.3.1. Sinteza aril-pirazol karboksilnih kiselina

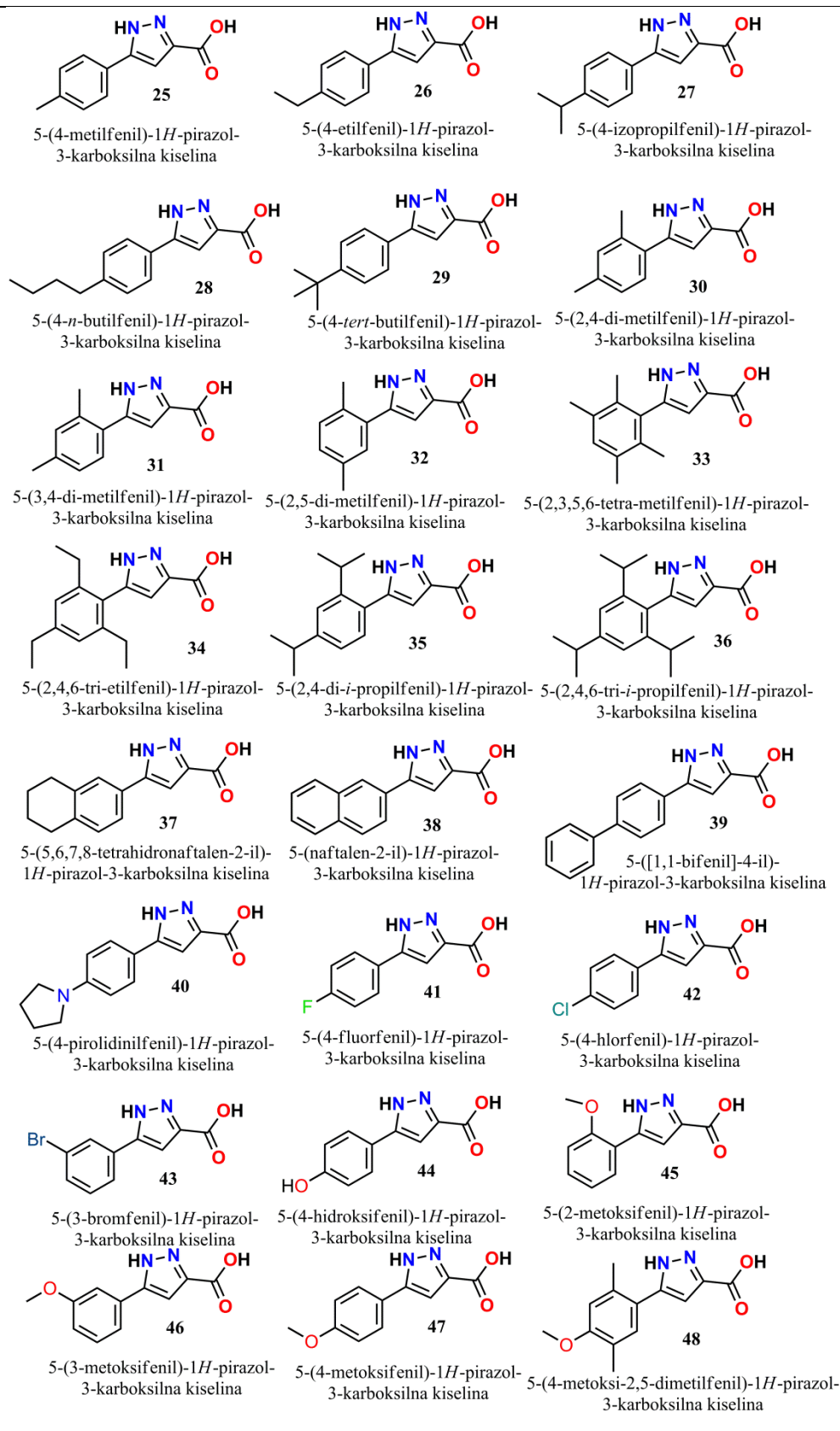
Seriya ADK prevedena je u supstituisane APK koristeći hidrazin-hidrat u glacijanoj sirćetnoj kiselini kao rastvaraču (**Slika 58**).



**Slika 58.** Sinteza APK polazeći od ADK.

Strukture sintetisanih APK date su u **Tabeli 15**. Potpuna karakterizacija ( $^1H$ ,  $^{13}C$  NMR spektri, MS spektri visoke rezolucije i IC spektri) opisana je u Eksperimentalnom delu a NMR spektri dati su u Prilogu.

**Tabela 15.** Strukturne formule dvadeset i četiri proučavane fenil-supstutuisane 5-fenil-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline



### 3.3.2. Inhibitorna aktivnost aril-pirazol karboksilnih kiselina prema karboanhidrazama

U okviru ovog rada ispitana je inhibitorna aktivnost kongenernog seta od 23 različito fenil-supstutuisane APK prema izoformama I, II, IX i XII humane KA. Vrednosti konstante inhibicije ( $K_i$ , **Tabela 17**) određene su merenjem brzine hidratacije CO<sub>2</sub> metodom zaustavljenog protoka (stopped-flow).

**Tabela 17.** Inhibitorne aktivnosti APK prema četiri izoforme KA (izražene kao  $K_i$ )

Jedinjenje	R-	$K_i$ ( $\mu\text{M}$ )*			
		hKA I	hKA II	hKA IX	hKA XII
25	4-Me-	>50	>50	>50	>50
26	4-Et-	>50	>50	42	4,5
27	4- <i>i</i> -Pr-	>50	>50	>50	>50
28	4- <i>n</i> -Bu-	>50	>50	39	5,5
29	4- <i>t</i> -Bu-	>50	>50	5	21
30	2,4-di-Me-	>50	>50	45	>50
31	3,4-di-Me-	>50	>50	48	>50
32	2,4,5-tri-Me-	>50	>50	23,5	>50
33	2,3,5,6-tetra-Me-	>50	>50	5	>50
34	2,4,6-tri-Et-	>50	>50	>50	>50
35	2,4-di- <i>i</i> -Pr-	>50	>50	16	>50
36	2,4,6-tri- <i>i</i> -Pr-	>50	>50	39	39
37	$\beta$ -tetralinil-	>50	>50	>50	43,5
38	$\beta$ -naftil-	>50	>50	>50	5,5
39	4-fenil-	>50	>50	>50	4
40	4-pirolidinil-	>50	>50	>50	33,5
41	4-F-	>50	>50	>50	38,5
42	4-Cl-	>50	>50	>50	50
43	3-Br-	>50	>50	23,5	>50
44	4-OH-	>50	>50	>50	41
45	2-OMe-	>50	>50	>50	50
47	4-OMe-	>50	>50	49,5	>50
48	4-OMe-2,5-di-Me-	>50	>50	22,5	>50
AAZ**	/	0,25	0,012	0,025	0,006

\*Srednja vrednost tri merenja; greške su u opsegu 5-10% prijavljenih vrednosti (podaci nisu prikazani).\*\*Acetazolamid (AAZ) je korišćen kao standardni inhibitor.

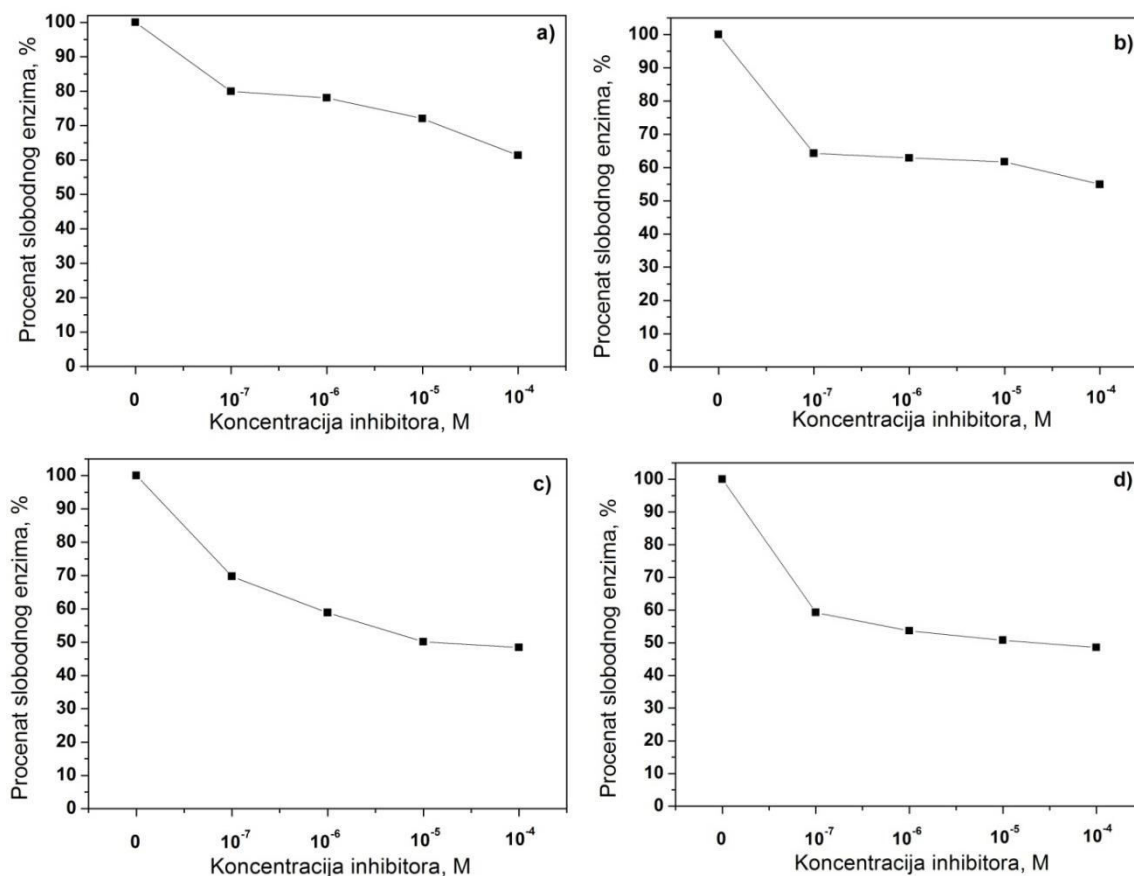


Sva jedinjenja su se pokazala neaktivnim prema KA I i KA II izoformama jer nisu inhibirala delovanje enzima čak ni pri koncentraciji od 50  $\mu$ M. Različito supstituisani derivati APK pokazali su se aktivnim prema izoformi KA IX i/ili KA XII. Pored podataka datih u **Tabeli 17**, selektivna inhibitorna aktivnost APK prema KA izoformama IX i XII vidljiva je i sa krivih zavisnosti doza-odgovor (dose response curves). Procenti inhibicije dejstva četiri izoforme KA na dve koncentracije dati su u **Tabeli 18**.

**Tabela 18.** Procenat inhibicije humanih KA I, II, IX i XII dejstvom APK kao inhibitora (u dve koncentracije).

Jedinjenje	R-	Procenat inhibicije pri $c_{APK}=10^{-7}$ ( $10^{-4}$ ) M			
		hKA I	hKA II	hKA IX	hKA XII
25	4-Me-	20 (30)	34 (35)	29 (44)	33 (48)
26	4-Et-	21 (37)	35 (37)	29 (46)	41 (52)
27	4- <i>i</i> -Pr-	17 (36)	31 (45)	24 (47)	33 (47)
28	4- <i>n</i> -Bu-	25 (39)	35 (45)	33 (51)	42 (52)
29	4- <i>t</i> -Bu-	20 (39)	36 (45)	30 (52)	41 (51)
30	2,4-di-Me-	15 (32)	36 (38)	33 (50)	42 (49)
31	3,4-di-Me-	19 (30)	33 (37)	28 (50)	35 (46)
32	2,4,5-tri-Me-	20 (33)	33 (39)	30 (54)	35 (48)
33	2,3,5,6-tetra-Me-	28 (34)	34 (41)	29 (50)	36 (46)
34	2,4,6-tri-Et-	24 (33)	35 (45)	30 (49)	39 (47)
35	2,4-di- <i>i</i> -Pr-	22 (44)	35 (43)	27 (52)	33 (49)
36	2,4,6-tri- <i>i</i> -Pr-	17 (39)	34 (49)	26 (52)	37 (52)
37	$\beta$ -tetralinil-	24 (33)	19 (25)	33 (49)	43 (51)
38	$\beta$ -naftil-	21 (36)	35 (38)	29 (48)	42 (54)
39	4-fenil-	19 (34)	34 (45)	32 (48)	42 (55)
40	4-pirolidinil-	20 (36)	34 (48)	33 (46)	35 (52)
41	4-F-	20 (29)	32 (36)	29 (45)	36 (51)
42	4-Cl-	17 (30)	36 (38)	31 (45)	42 (50)
43	3-Br-	20 (32)	32 (35)	30 (54)	38 (49)
44	4-OH-	23 (30)	35 (41)	30 (45)	35 (51)
45	2-OMe-	21 (30)	28 (40)	27 (44)	35 (50)
47	4-OMe-	25 (30)	36 (40)	33 (51)	34 (47)
48	4-OMe-2,5-di-Me-	22 (35)	35 (40)	33 (52)	42 (47)

Oblik krivih doza-odgovor za izoforme I i II je prilično ravan (Slika 59a i b), gde se enzimaska aktivnost zadržavala na nivou iznad 50% čak i pri koncentracijama  $1 \cdot 10^{-4}$  M, slično kao i kod ADK (Tabela P33). Na primeru jedinjenja 29 (Slika 59c i d) vidimo strmije krive doza-odgovor i procenat inhibicije preko 50% (enzimska aktivnost je padala ispod 50%).



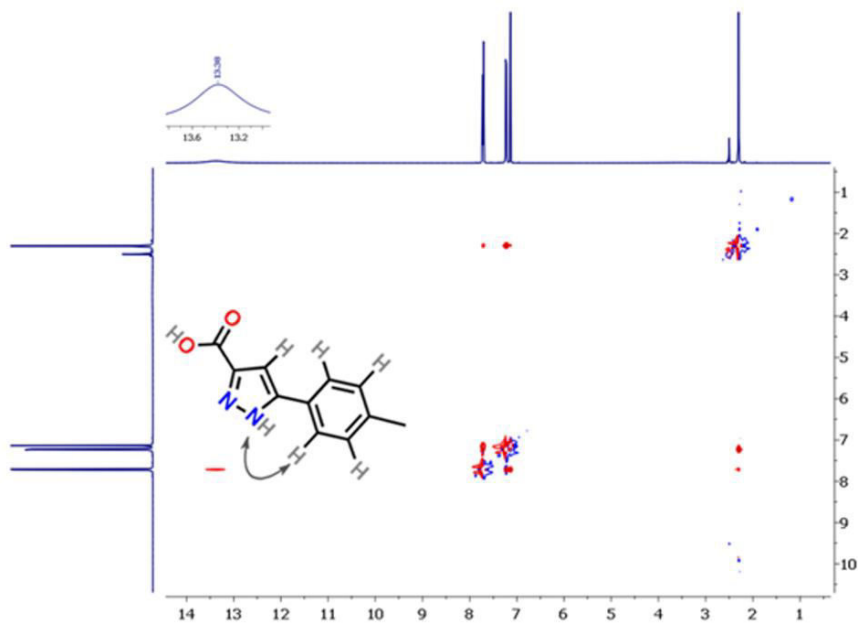
Slika 59. Krive zavisnosti procenta inhibicije hKA I (a), hKA II (b), hKA IX (c) i hKA XII (d) dejstvom različitih koncentracija jedinjenja 29.

Selektivnost APK prema membranskim izoformama KA IX i XII u odnosu na citosolne izoforme I i II, kao i aktivnost porediva sa prethodno publikovanim jedinjenjima koja imaju  $-\text{COOH}$  kao GVC ukazuju na to da su APK dobra polazna osnova za razvoj selektivnih inhibitora membranskih izoformi hKA. Ovi rezultati mogu biti značajni za razvoj novih antitumorskih lekova jer su hKA IX i hKA XII prepoznate kao nove mete za razvoj lekova protiv raka.<sup>61,69</sup>

### 3.4. Fizičko-hemijsko profilisanje APK

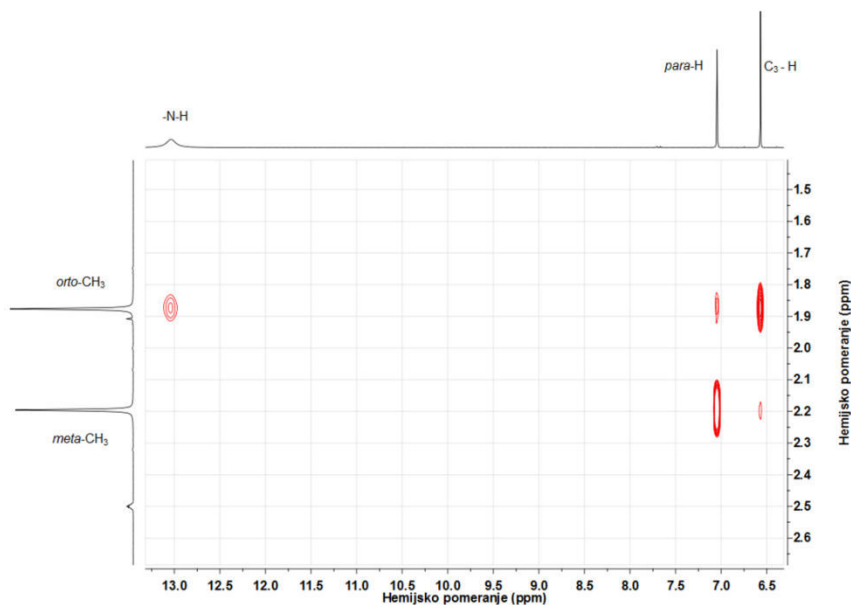
#### 3.4.1. Tautomerija aril-pirazol-karboksilnih kiselina

APK u rastvoru mogu postojati u tri tautomerna oblika (**Slika 24**). Dva oblika sa protonovanim pirazolskim azotima (**A** i **B**) su mnogo verovatnija nego tautomer **C**. Iz kristalne strukture APK utvrđeno je da je u čvrstom stanju prisutan tautomer **A**.<sup>124</sup> Radi utvrđivanja dominantnog tautomernog oblika APK u rastvoru, snimljen je NOESY spektar 4-Me derivata (**25**) u DMSO-*d*<sub>6</sub>. DMSO je izabran za rastvarač iz dva razloga: odlično rastvara ispitivanu supstancu i usled velike polarnosti (dielektrična konstanta  $\epsilon = 47$ ) sprečava moguću agregaciju molekula intermolekulskim vodoničnim vezama primećenu u čvrstom stanju. Intenzivan NOESY signal između <sup>1</sup>H pika na 13,38 ppm i dubleta na 7,71 ppm (**Slika 60**) ukazuje na to da je glavni oblik u rastvoru DMSO-a tautomer **A**. Dublet na 7,71 ppm odgovara atomima vodonika u *orto*-položaju fenilnog jezgra, dok široki signal na 13,38 ppm pripada pirazolskom NH atomu. Nakon dodatka jednog ekvivalenta piperidina u rastvor, radi deprotonovanja karboksilne grupe, široki signal na 13,38 ppm se pomerio na 9,75 ppm i NOESY signal je nestao (**Slika P37**). Ovi preliminarni rezultati ukazuju na to da tautomerni oblik **A** nije predominantni oblik u rastvoru kada je karboksilna grupa u anjonskom obliku. Poznato je, takođe, da zastupljenost tautomera zavisi i od rastvarača, tako da rezultati dobijeni u DMSO-u ne moraju odgovarati situaciji u fiziološkim uslovima.



**Slika 60.** NOESY spektar jedinjenja **25** u DMSO-*d*<sub>6</sub>.

Pored jedinjenja **25**, snimljeni su i NOESY spektri jedinjenja **33** i **46** u DMSO-*d*<sub>6</sub> (**Slika 61** i **Slika 62**).

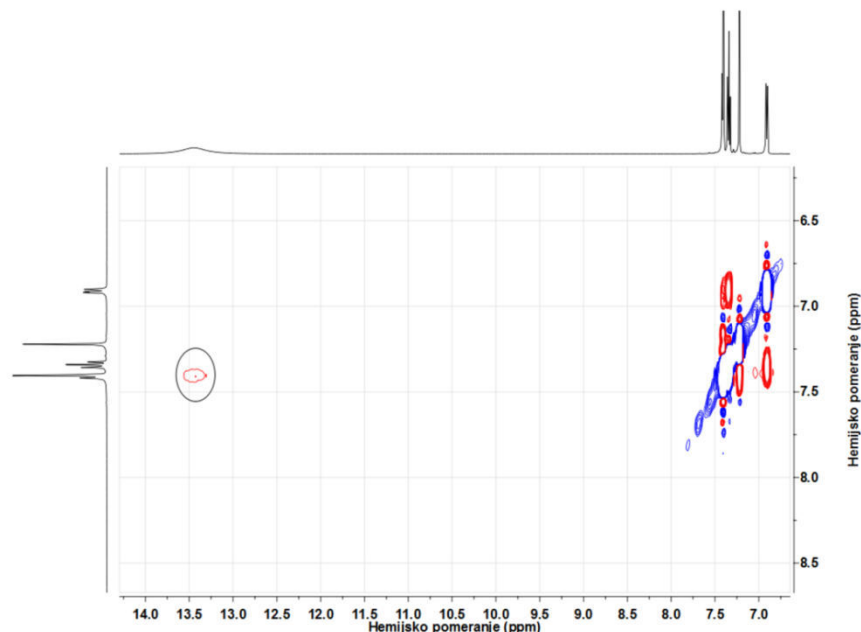


**Slika 61.** Uvećani deo NOESY spektra jedinjenja **33**.

Na prikazanom spektru jedinjenja **33** vidi se signal koji ukazuje na korelaciju protona metil grupe koja se nalazi u *orto*-položaju fenilnog jezgra (1,89 ppm) i protona vezanog za azot pirazolskog prstena, bližeg fenil grupi (13,03 ppm). Protoni metil grupe u *meta*-položaju (2,19 ppm) nisu u korelaciji sa  $\text{-NH}$  protonom (13,03 ppm), ali se

veoma dobro korelišu sa *para*-H atomom fenilnog jezgra (7,04 ppm), a nešto slabije sa protonom vezanim za C $\gamma$  atom pirazolskog prstena (6,57 ppm). Iz  $^1\text{H}$  NMR i NOESY spektara može se zaključiti da je u rastvoru prisutan samo tautomer **A**.

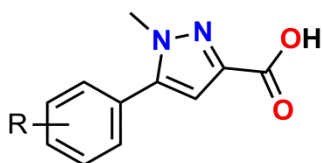
Na **Slici 62** se takođe jasno uočava kuplovanje *orto*-H atoma fenilnog jezgra (7,41 ppm, preklopljeni *s* i *d*) sa  $-\text{NH}$  protonom (13,44 ppm) jedinjenja **46**.



**Slika 62.** Uvećani deo NOESY spektra jedinjenja **46**.

Dobijeni rezultati ukazuju na to da je tautomer **A** dominantan oblik APK u rastvoru kada je rastvarač DMSO. Pretpostavljeno je da je tautomer **A** oblik u kome će se APK naći i u fiziološkim uslovima, što će biti od koristi kod proučavanja kvantitativnog odnosa između strukture i biološke aktivnosti APK.

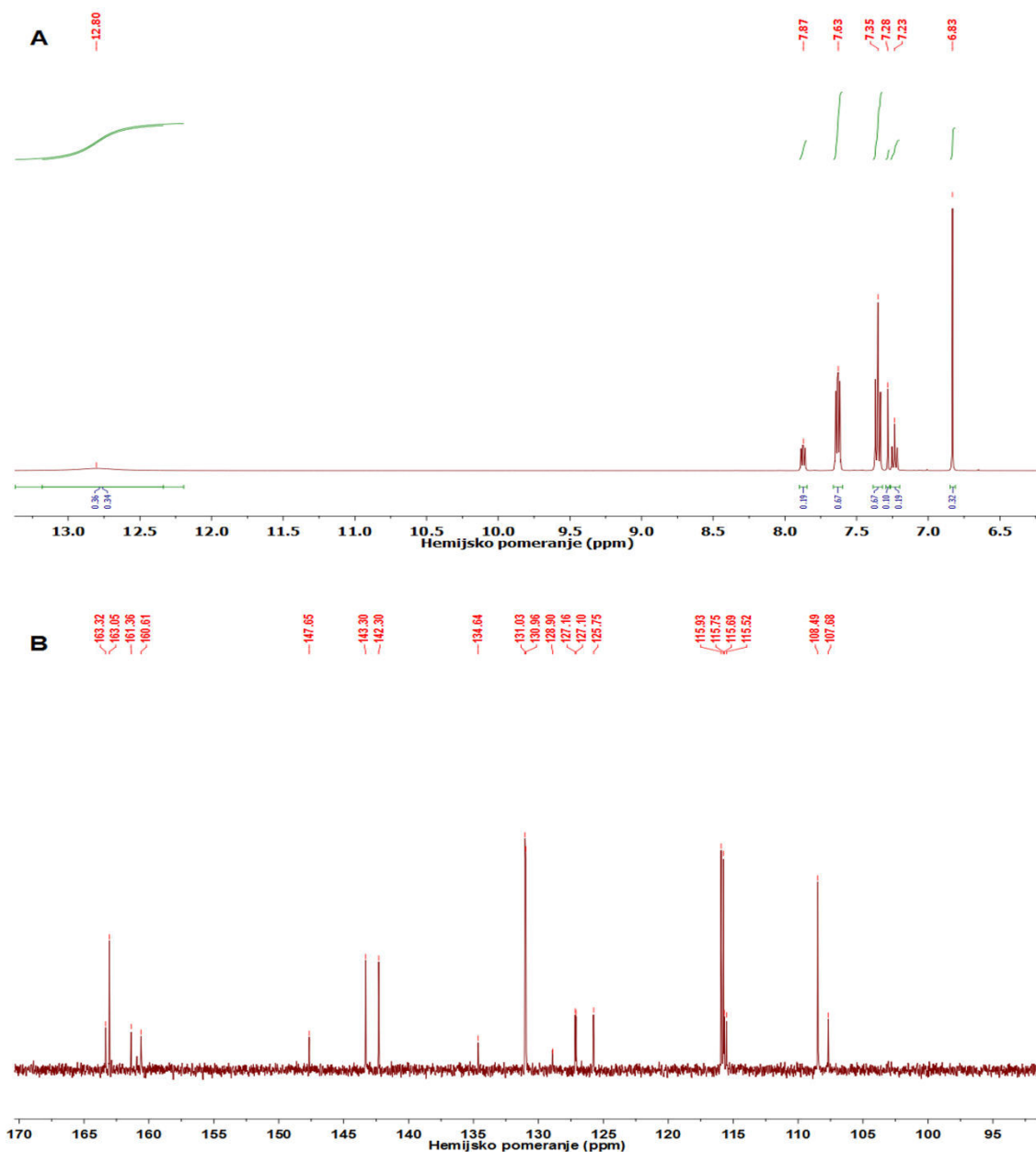
Važni podaci o strukturama APK u rastvoru dobijeni su snimanjem NOESY spektara tri derivata sa metil-supstituisanim atomom azota u položaju 1 pirazolskog prstena (**Slika 63**). Ova jedinjenja sintetisana su prema proceduri prikazanoj na **Slici 58**, koristeći metil-hidrazin umesto hidrazin-hidrata.



R: 4-F (**49**); 3-OMe (**50**); 2,3,5,6-tetraMe (**51**)

**Slika 63.** Struktura tri proučavane 5-aril-1-metil-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline

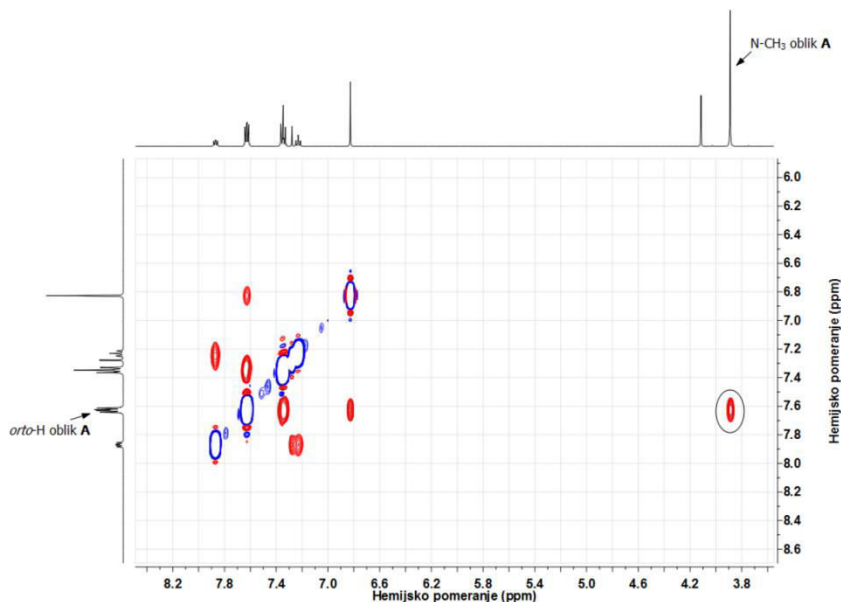
Na **Slici 64** prikazani su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jedinjenja **49**. Na osnovu odnosa površina ispod pikova i multipliciteta signala  $^1\text{H}$  spektra, zaključeno je da se u rastvoru nalaze dva oblika i to u odnosu 7:2. Pretpostavljeno je da su u pitanju oblici analogni tautomerima **A** i **B**, sa  $-\text{N}-\text{CH}_3$  grupom umesto  $-\text{N}-\text{H}$  dela na pirazolskom prstenu.



**Slika 64.**  $^1\text{H}$  (A) i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri (B) jedinjenja **49**. Snimano u  $\text{DMSO}-d_6$ ; radi jednostavnosti izostavljen je deo 0-6,5 ppm kod  $^1\text{H}$  i 0-95 ppm kod  $^{13}\text{C}$  spektra.

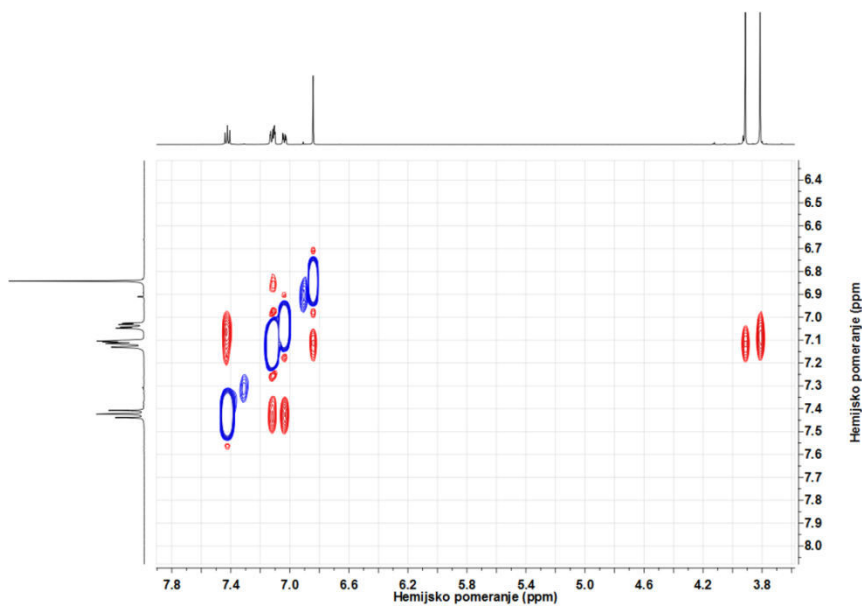
Na prikazanom NOESY spektru jedinjenja **49** (**Slika 65**) može se uočiti jasan NOESY signal između singleta na 3,89 ppm, koji potiče od H-atoma metil grupe sa pirazolskog prstena i signala na 7,63 ppm, koji potiče od *orto*-H atoma fenilnog jezgra. Ovo ukazuje

na to da signali zastupljenijeg oblika pripadaju analogu oblika **A**. Odgovarajući signali koji bi poticali od oblika **B** u prikazanom delu NOESY spektra se ne vide, iz razloga što nema korelacije između protona sa metil grupe i protona aromatičnog jezgra zbog velike međusobne udaljenosti. Na osnovu ovakvog spektra zaključeno je da je u rastvoru dominantan tautomerni oblik **A**.



**Slika 65.** NOESY spektar jedinjenja **49**.

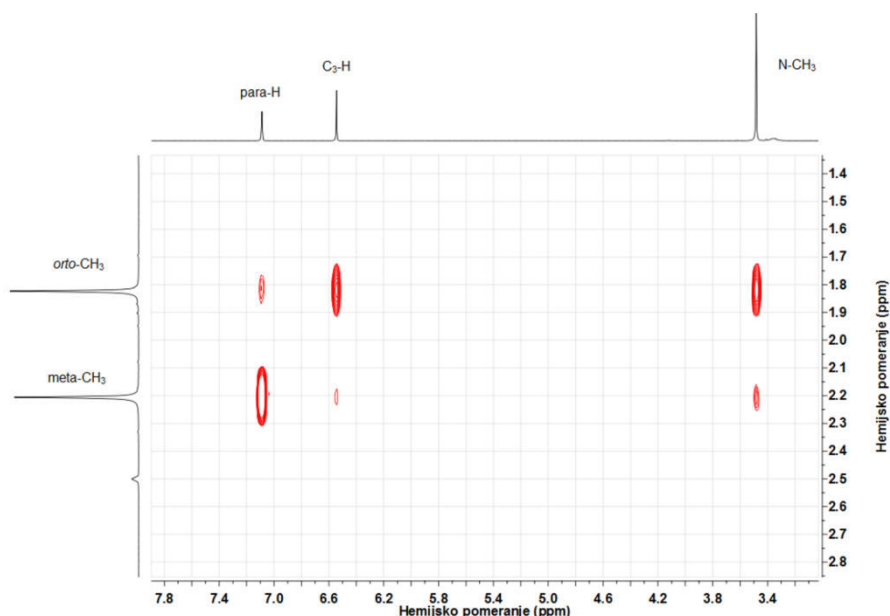
Uvećani deo NOESY spektra jedinjenja **50** prikazan je na **Slici 66**.



**Slika 66.** NOESY spektar jedinjenja **50**.

Jako kuplovanje između *ortho*-H atoma i H atoma metil grupe pirazolskog prstena ponovo ukazuje na postojanje oblika **A** u rastvoru, dok oblik **B** nije primećen.

Na **Slici 67** prikazan je NOESY spektar jedinjenja **51**. Dominantni oblik u rastvoru je ponovo oblik **A**.



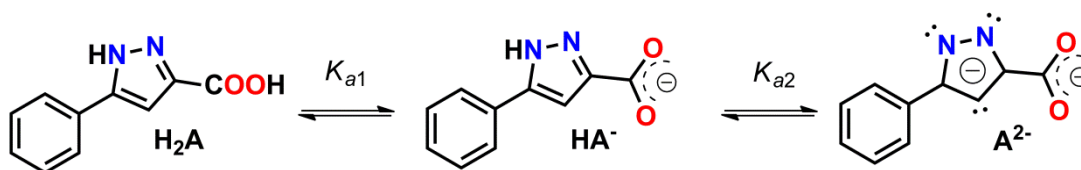
**Slika 67.** NOESY spektar jedinjenja **51**.

Infracrveni spektri jedinjenja snimani su iz čvrstih uzoraka, pomoću ATR (Attenuated Total Reflectance) tehnike. U spektrima nekih jedinjenja primećene su široke trake u oblasti  $3100\text{-}3250\text{ cm}^{-1}$ , gde se N-H istežuće vibracije preklapaju sa C-H i O-H trakama. Ovakav oblik IC signala ukazuje na agregaciju putem vodoničnih veza kod nekih derivata (**Slika P38**), što je primećeno i u kristalnoj strukturi nesupstituisanog derivata,<sup>124</sup> gde postoji vodonična veza između karboksilne grupe i pirazolskog –NH–N= dela molekula.

### 3.4.2. Protolitičke ravnoteže aril-pirazol karboksilnih kiselina

Većina ispitivanih APK u predstavlja u vodi slabo rastvorne diprotične kiseline čija se disocijacija može predstaviti sledećom shemom (**Slika 68**).

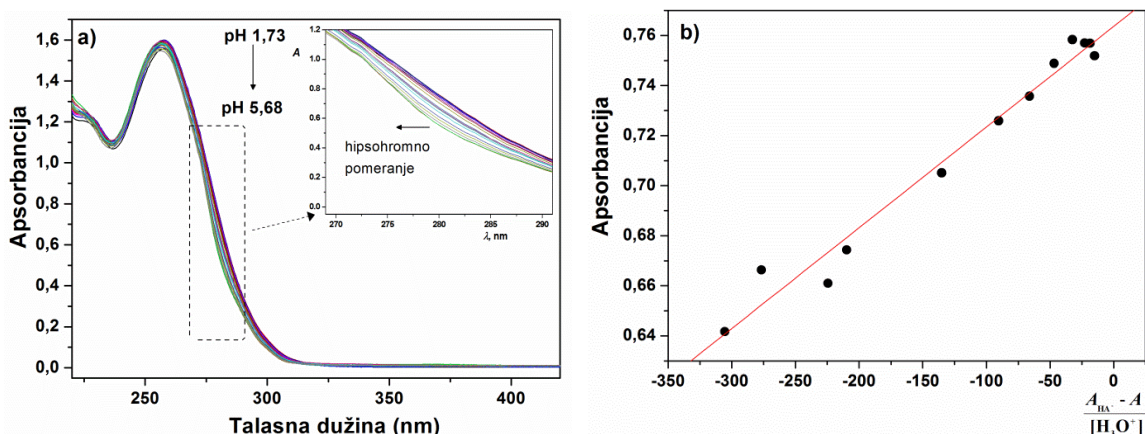




**Slika 68.** Protolitičke ravnoteže APK.

Predviđanjem stanja protonovanosti jedinjenja **25** pomoću programa ADMET predictor<sup>123</sup> dobijena je  $pK_a$  vrednost karboksilne grupe u intervalu 3,63-4,06, dok je  $pK_a$  vrednost pirazolskog azota 10,23-10,71, u zavisnosti od tautomernog oblika (**Slika P39**).

Eksperimentalna  $pK_{a1}$  vrednost 4-OCH<sub>3</sub> derivata (**47**) određena je spektrofotometrijski. Tri talasne dužine (270, 280, 290 nm) su uzete za linearnu regresionu analizu jer su na njima primećene maksimalne razlike u apsorbancijama čestica prisutnih u rastvoru. Apsorpcioni spektri i grafik korišćen za izračunavanje vrednosti konstante kiselosti ( $pK_{a1}$ ) dati su na **Slici 69**.



**Slika 69.** Apsorpcioni spektri jedinjenja **47** u pH opsegu od 1,73 do 5,68; deo spektra korišćen za izračunavanja je uvećan;  $c = 1,032 \cdot 10^{-4}$  M,  $t = 25 \pm 1$  °C,  $I = 0,1$  M (NaCl), brzina snimanja spektara 500 nm/min; b) grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom 8,  $\lambda = 280$  nm.

Dobijena je vrednost  $pK_{a1}$  iznosi  $3,31 \pm 0,07$ . Iako je vrednost kiselinske konstante bila približna predviđenim, spektrofotometrijsko određivanje  $pK_a$  drugih APK nije izvedeno. Kao što se sa **Slike 69a** može videti, deprotonovanjem karboksilne grupe jedinjenja **47** dešava se veoma mala promena u izgledu apsorpcionog spektra i nema primetne izosbestične tačke, koja je nedvosmisleni dokaz uspostavljanja ravnoteže između dva člana konjugovanog kiselinsko-baznog para. Iako je topološka distanca između fenilnog

jezgra (hromofore) i  $-\text{COOH}$  grupe (jonizacionog centra) APK skoro identična kao kod ADK, kod APK je uticaj jonizacionog centra na hromoforu mali, što je posledica slabije konjugacije ova dva dela molekula. Iz tih razloga,  $\text{p}K_a$  vrednosti serije APK određene su potenciometrijski. Titracije su izvedene u smeši metanola i vode (1/1, v/v) radi postizanja dovoljno velike rastvorljivosti ( $>1 \cdot 10^{-4}$  M) u celoj pH oblasti titracije. Titracione krive za analizirane APK date su u Prilogu, **Slike P40-P45**. Rezultati su prikazani u **Tabeli 18**.

**Tabela 18.** Potenciometrijski određene  $\text{p}K_a$  vrednosti stehiometrijskih konstanti ( $\text{p}K_{a1} \pm \text{sd}$ ) različito supstituisanih APK u smeši u smeši metanola i vode (1/1, v/v);  $I = 0,1$  M (NaCl);  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Jedinjenje	$R_1$ -	$R_2$ -	Određene $\text{p}K_a$ vrednosti				$\langle \text{p}K_{a1} \rangle$ $\pm \text{sd}$
			proba 1	proba 2	proba 3	proba 4	
<b>41</b>	4-F-	H-	4,04 $\pm$ 0,01	4,04 $\pm$ 0,01	4,06 $\pm$ 0,01	3,96 $\pm$ 0,01	4,03 $\pm$ 0,04
<b>49</b>	4-F-	Me-	4,59 $\pm$ 0,01	4,57 $\pm$ 0,01	4,52 $\pm$ 0,01	4,50 $\pm$ 0,01	4,54 $\pm$ 0,04
<b>33</b>	2,3,5,6-tetra-Me	H-	4,66 $\pm$ 0,01	4,68 $\pm$ 0,01	4,68 $\pm$ 0,02	4,67 $\pm$ 0,02	4,67 $\pm$ 0,01
<b>51</b>	2,3,5,6-tetra-Me	Me-	4,75 $\pm$ 0,01	4,65 $\pm$ 0,01	4,84 $\pm$ 0,02	4,74 $\pm$ 0,01	4,75 $\pm$ 0,07
<b>46</b>	3-OMe	H-	4,24 $\pm$ 0,01	4,28 $\pm$ 0,01	4,15 $\pm$ 0,01	-	4,22 $\pm$ 0,07
<b>50</b>	3-OMe	Me-	4,65 $\pm$ 0,01	4,61 $\pm$ 0,01	4,61 $\pm$ 0,01	4,66 $\pm$ 0,01	4,63 $\pm$ 0,03

Iako predviđena  $\text{p}K_{a2}$  vrednost pirazolskog azota leži u opsegu 10-11, preliminarnim potenciometrijskim titracijama do pH 11,5 nismo uspeli da uočimo disocijaciju ove grupe. Titracije nisu izvođene na pH većim od 11,5 jer su u tim uslovima merenja pH nepouzdana zbog rastuće bazne greške elektrode. Pored toga, određivanje ovako visoke  $\text{p}K_a$  vrednosti nema neki fiziološki značaj jer je van pH opsega koji se nalazi u ljudskom organizmu.

Poređenjem  $pK_{a_1}$  vrednosti APK i njihovih prekursora ADK, uočava se da su vrednosti niže za ADK. Ovakav rezultat može se objasniti većom stabilnošću monoanijona ADK u odnosu na anjon APK. U slučaju ADK, negativno naelektrisanje na kiseoniku karboksilne grupe stabilizovano je konjugacijom, dok je kod APK smanjena konjugacija karboksilne grupe preko pirazolskog prstena sa fenilnim jezgrom, najverovatnije usled narušavanja planarnosti sistema. Takođe, atomi kiseonika koji se nalaze u susedstvu karboksilne grupe ADK su elektronegativniji nego atomi azota kod APK, pa odvlačenjem elektronske gustine sa  $-COOH$  grupe negativnim induktivnim efektom snižavaju  $pK_{a_1}$  vrednost. Uticaj fenil supstituenata na  $pK_a$  vrednosti je takođe vidljiv. Jedinjenje **41**, *para*-F susptituisani derivat, ima najnižu  $pK_{a_1}$  vrednost, dok jedinjenje **33** sa četiri metil grupe na fenilnom jezgru ima za 0,6 jedinica višu  $pK_{a_1}$  vrednost.

Pored supstituenata na fenilnom jezgru, na  $pK_{a_1}$  vrednost APK utiče i metil grupa vezana za azotov atom pirazolskog prstena. Iz dobijenih vrednosti konstanti kiselosti, uočava se da su  $pK_{a_1}$  vrednosti niže u odnosu na njihove analoge kod kojih pirazolski prsten sadrži metil grupu. Ovakav trend se može objasniti pozitivnim induktivnim efektom metil grupe, čime se otežava disocijacija karboksilnog protona. Detaljnija studija uticaja induktivnog i rezonancionog efekta fenil supstituenata na  $pK_{a_1}$  vrednosti većeg seta APK biće predmet daljih istraživanja.

### 3.5. Tehnike molekuskog modelovanja u cilju racionalizacije odnosa između strukture i biološke aktivnosti

Ispitivanje biološke aktivnosti potencijalnih lekova najčešće se izvodi na dva načina: dejstvom na određenu biološku metu ili testiranjem na celim ćelijama (tkivima). Iako je šansa za nalaženje novih aktivnih molekula uz pomoć testova na celim ćelijama velika, glavno ograničenje ove metode je što se ne dobija nikakva informacija o potencijalnoj biološkoj meti. Određivanje tačne mete dejstva novog leka nije trivijalno<sup>165</sup> i često je najzahtevniji deo projekta dizajna novog leka. Jedinjenje takođe može istovremeno delovati na više bioloških meta uključenih u isti ili različiti metabolički put, što dodatno komplikuje dizajn lekova efikasnih prema određenoj biološkoj meti.

Dizajn lekova zasnovan na strukturi biološke mete (Structure based drug design, SBDD) zasniva se na poznatoj strukturi proteina. U dizajnu lekova zasnovanom na strukturi liganda (Ligand-based drug design, LBDD) koriste se strukture aktivnih molekula i iz njih se izvodi hipoteza o strukturnim fragmentima koji doprinose biološkoj aktivnosti jedinjenja (koncept farmakofore). Dobijena farmakofora dalje se koristi za pretraživanje velikih baza hemijskih struktura, a jedinjenja koja se najbolje preklapaju sa farmakofornim tačkama se dalje sintetišu i eksperimentalno testiraju.

#### 3.5.1. Ispitivanje primenljivosti 3D QSAR metode izvedene iz polja molekulskih interakcija (GRIND metodologije)

U okviru Opšteg dela ove disertacije detaljno je opisano izračunavanje polja molekulskih interakcija i GRIND molekulskih deskriptora. U LBDD, MIF-ovi se mogu koristiti za identifikaciju farmakološki sličnih liganada, objašnjenje farmakofore, predviđanje aktivnosti novih struktura kroz 3D QSAR modele i za predviđanje farmakokinetičkih parametara kao što su propustljivost kroz ćelijske membrane i metabolizam leka. *In silico* metode se danas često primenjuju u farmaceutskoj industriji jer znatno pojeftinjuju i olakšavaju istraživanje, pomažući medicinskom hemičaru u selekciji jedinjenja za sintezu i biološko testiranje. Jedna od prvih i najpoznatijih studija koja je pokazala značaj MIF-ova u dizajnu lekova objavljena je još 1993. godine.<sup>166</sup> U

ovoj studiji izračunavanjem MIF-ova aktivnog mesta enzima neuroaminidaze virusa influence pomoću programa GRID<sup>143</sup> otkriven je dodatni prostor oko ostatka Glu119 sa kojim amino ili guanidino- grupa mogu ostvariti povoljne elektrostatičke interakcije. Ovi rezultati doveli su do otkrića čuvenog antivirusnog leka Zanamivira (Relenza™).

U okviru ove disertacije sintetisane su dve grupe jedinjenja (ADK i APK) i ispitana je njihova biološka aktivnost prema MDR sojevima bakterijama, odnosno enzimu karboanhidrazi. Racionalizacija dobijenih bioloških podataka i dizajn novih, aktivnijih struktura, moguća je uz pomoć primene MIF-ova i 3D QSAR-a zasnovanog na GRIND deskriptorima.

Radi ispitivanja primenljivosti GRIND metodologije u LBDD, kao test set upotrebljene su strukture i antiproliferativne aktivnosti jedinjenja tetroksanskog tipa (**Tabela 19**). Kao što je već opisano u Uvodu, kritični korak u 3D QSAR analizi je odabir odgovarajuće, *aktivne* konformacije molekula. Fleksibilni molekuli mogu postojati u nekoliko stabilnih konformacija što otežava izbor *aktivne* konformacije. Konformaciono kruti molekuli kao što su tetroksani predstavljaju odličan model sistem za proučavanje 3D QSAR metodologije jer će energetski najpovoljnija konformacija molekula sa velikom sigurnošću odgovarati *aktivnoj* konformaciji. Pouzdani strukturni i biološki podaci su takođe neophodni da bi se varijacija usled eksperimentalnih grešaka prilikom provere mogućnosti ove metode svela na minimum. Ova grupa jedinjenja sintetisana je u okviru grupe prof. Bogdana Šolaje sa Hemijskog fakulteta u Beogradu, dok su biološki testovi urađeni su na Institutu za onkologiju i radiologiju Srbije.




Struktura i antiproliferativne aktivnosti serije od trideset i tri jedinjenja tetroksanskog tipa (jedinjenja **1b-33b**) su prikazane u **Tabeli 19**. Koristeći molekulske deskriptore zasnovane na MIF-ovima, napravljena su modeli u cilju identifikacije farmakofornih tačaka značajnih za antiproliferativnu aktivnost ovih jedinjenja.<sup>167</sup>

#### 3.5.1.1. 3D QSAR

Sinteza i antiproliferativna aktivnost jedinjenja **1b-33b** su prethodno opisane (za reference videti **Tabelu 19**). Napravljena su dva PLS modela, jedan za aktivnosti prema HeLa (ćelije raka grlića materice) i jedan za aktivnosti prema FemX ćelijskim linijama

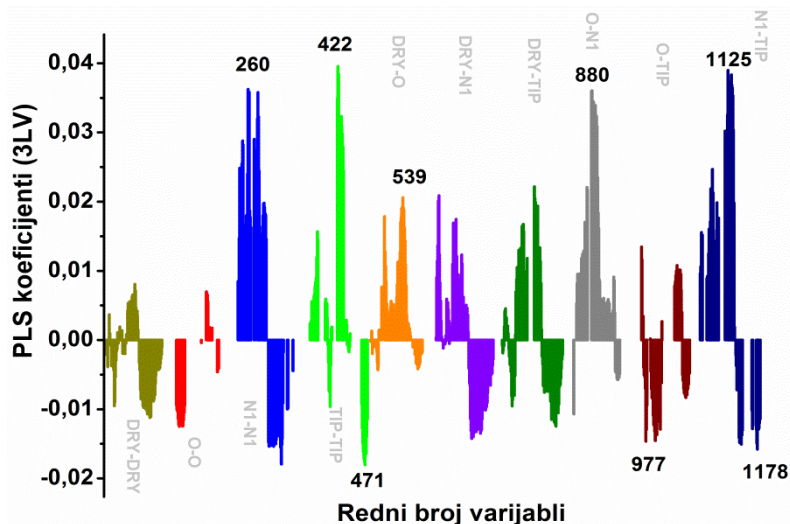
(ćelije melanoma). Kao zavisna varijabla korišćene su biološke aktivnosti predstavljene kao  $p(IC_{50})$  vrednosti. Aktivnosti oba epimera jedinjenja **28b-29b**, **30b-31b** i **32b-33b** eksperimentalno su određene, ali apsolutne konfiguracije nisu mogle biti pouzdano pripisane. Stereochemija epimera (**Tabela 19**) pripisana je po analogiji sa 4''-metil derivatom, čija je konfiguracija u položaju 4'' nedvosmisleno određena iz kristalne strukture.<sup>168</sup> Pošto su oba epimera svakog para imala jako slične aktivnosti, naši QSAR modeli nisu mogli da objasne tako male razlike. Zbog toga su napravljena dva modela gde je svakom epimeru pripisivan jedan set aktivnosti, da bismo videli da li neka od kombinacija daje model poboljšanog statističkog kvaliteta. Dobijeni modeli bili su skoro identični. Male razlike primećene su kod DRY-DRY, TIP-TIP i DRY-TIP grupa varijabli različitih epimera, što je posledica različite orijentacije 4''-etil grupe u odnosu na steroidno jezgro. Ove razlike nisu značajno uticale na rezultate dobijenih modela.

**Tabela 19.** Struktura jedinjenja **1b-33b** i antiproliferativna aktivnost prema HeLa i FemX ćelijskim linijama.

Jedinjenje	R <sup>1</sup>	R <sup>2</sup>	Y	X	<i>p</i> (IC <sub>50</sub> ) (HeLa)	<i>p</i> (IC <sub>50</sub> ) (FemX)	Ref.
<b>1b</b>	I	II	/	-OCH <sub>3</sub>	4,12	4,14	169,170
<b>2b</b>	I	II	/	-OH	3,92	3,81	169,170
<b>3b</b>	I	II	-NH-	-H	3,94	3,92	169,170
<b>4b</b>	I	II	-NH-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	3,93	3,99	169,170
<b>5b</b>	I	II	-NH-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3,87	3,92	169,170
<b>6b</b>	I	V	/	-OCH <sub>3</sub>	4,74	5,20	171
<b>7b</b>	I	V	/	-OH	5,16	4,60	171
<b>8b</b>	I	V	-NH-	-H	5,28	5,22	171
<b>9b</b>	I	V	-NH-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	5,19	4,88	171
<b>10b</b>	I	V	-N<	-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4,55	4,41	171
<b>11b</b>	I	V	/	-N 	5,14	5,04	171
<b>12b</b>	III	V	-OCH <sub>3</sub>	-H	4,73	4,28	168
<b>13b</b>	III	V	-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub> (4'' <i>R</i> )	4,96	4,13	168
<b>14b</b>	III	V	-OCH <sub>3</sub>	-CH <sub>3</sub> (4'' <i>S</i> )	5,3	4,60	168
<b>15b</b>	III	V	-OCH <sub>3</sub>	- spiro-ciklopentil	4,97	4,37	168
<b>16b</b>	III	V	-OCH <sub>3</sub>	- spiro-ciklooktil	4,99	4,29	168
<b>17b*</b>	V	V	-N<	-(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3,98	4,32	172,173
<b>18b</b>	V	V	/	-N 	4,05	4,1	172,173
<b>19b</b>	V	V	/	-H	5,43	5,51	172,173
<b>20b</b>	V	V	-NH-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	4,48	4,64	172,173
<b>21b</b>	V	V	/	-OH	5,28	5,38	172,173
<b>22b*</b>	V	V	-NH-	-CH <sub>2</sub> C(O)OCH <sub>3</sub>	5,44	5,33	172,173
<b>23b</b>	V	V	/	-N 	3,92	3,99	172,173
<b>24b</b>	V	V	-NH-	-H	5,22	5,21	172,173
<b>25b</b>	V	V	-NH-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	5,08	4,59	172,173
<b>26b</b>	V	V	/	-OH	5,04	5,12	172,173
<b>27b</b>	V	V	/	-OCH <sub>3</sub>	4,69	4,71	172,173
<b>28b</b>	IV	V	-NH-	-H (4'' <i>R</i> )	5,28	5,30	168
<b>29b</b>	IV	V	-NH-	-H (4'' <i>S</i> )	5,39	5,37	168
<b>30b</b>	IV	V	-NH-	-CH <sub>3</sub> (4'' <i>R</i> )	5,31	5,16	168
<b>31b</b>	IV	V	-NH-	-CH <sub>3</sub> (4'' <i>S</i> )	5,17	5,35	168
<b>32b</b>	IV	V	-NH-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (4'' <i>R</i> )	5,16	5,17	168
<b>33b</b>	IV	V	-NH-	-CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> (4'' <i>S</i> )	5,16	5,05	168

\* Kod jedinjenja **17b-21b** R<sup>1</sup> i R<sup>2</sup> su jedan prema drugom u *trans* položaju; kod jedinjenja **22b-27b** R<sup>1</sup> i R<sup>2</sup> su jedan prema drugom u *cis* položaju.

Početni PLS model uključivao je 1190 varijabli. Nakon jednog ciklusa FFD broj varijabli je smanjen na 761, uz poboljšani statistički kvalitet modela. Statistički parametri modela aktivnosti prema HeLa ćelijskoj liniji dati su u Prilogu, **Tabela P35**. Na **Slika 70** prikazan je grafik PLS koeficijenata za HeLa model sa 3 LV.



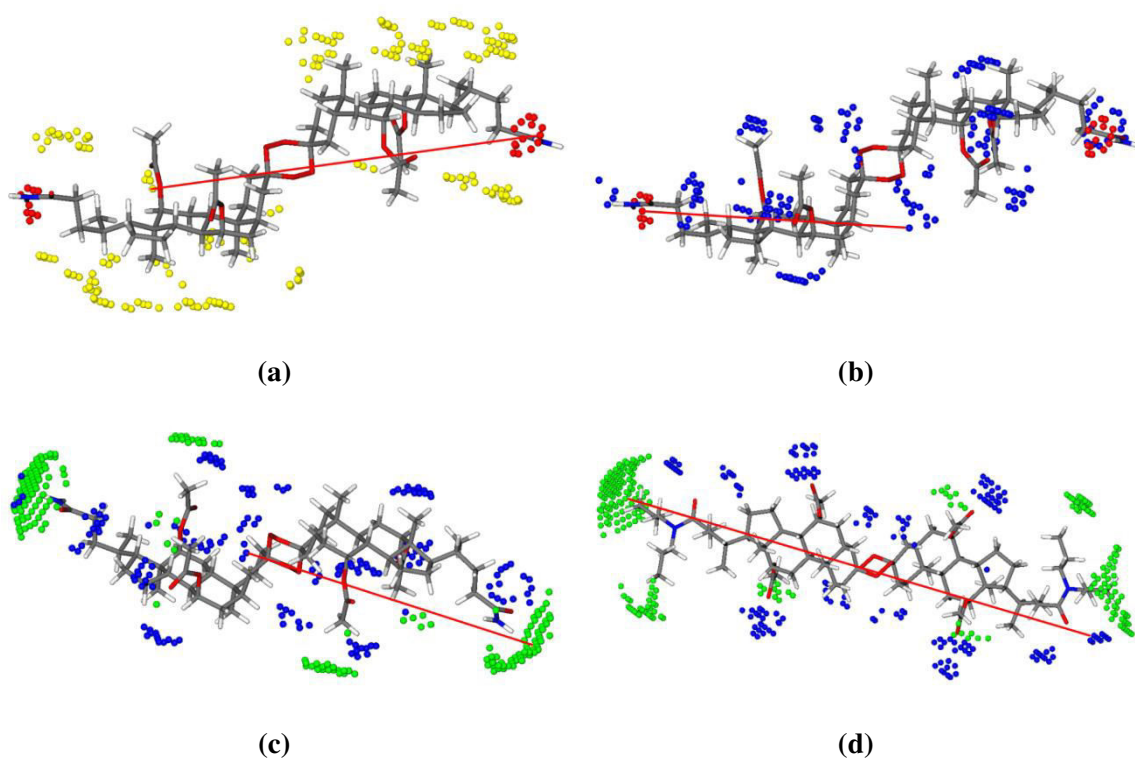
**Slika 70.** Koeficijenti varijabli PLS modela antiproliferativne aktivnosti jedinjenja **1b-33b** prema HeLa ćelijama.

Većina varijabli sa pozitivnim uticajem na aktivnost se nalaze na manjim međučvornim rastojanjima, dok na većim rastojanjima preovlađuju varijable negativno korelisane sa antiproliferativnom aktivnošću. Kratak opis varijabli sa najvećim uticajem na model dat je u **Tabeli 20**. Nekoliko najuticajnijih varijabli na HeLa model je prikazano na **Slici 71**.

**Tabela 20.** GRIND varijable sa najvećim uticajem (pozitivnim (+) ili negativnim (-)) na konačni PLS model, i strukturni elementi jedinjenja **1b-33b** obuhvaćeni ovim varijablama.

Blok proba	Broj varijable	Rastojanje (Å)	Uticaj	Strukturni elementi
N1-N1	260	7,04-7,36	+	Acetoksi (OAc) grupe na prstenu C (ili B za <b>21b</b> i <b>26b</b> ) i bliska OAc grupa (ili amido atom kiseonika). Nije izražena jedino u jedinjenjima <b>1b-4b</b> .
TIP-TIP	422	20,80-21,12	+	N-metil grupa prstena D ili OAc metil grupa, <i>i</i> udaljeni alkil niz. Prisutna kod svih jedinjenja izuzev <b>1b-5b</b> .
TIP-TIP	471	36,48-36,80	-	Nalazi se između dve amido <i>n</i> -propil grupe jedinjenja <b>17b</b> i <b>20b</b> .
DRY-O	539	20,16-20,48	+	Primarni ili sekundarni amido NH (čvor O probe) i angularna metil grupa ( <b>19b</b> , <b>20b</b> , <b>22b</b> i <b>24b-26b</b> ) ili cikloheksilni deo molekula ( <b>7b</b> , <b>8b</b> , <b>9b</b> , <b>28b-33b</b> ).
O-N1	880	15,04-15,36	+	Primarni ili sekundarni amido azot i tetraoksanski prsten ( <b>7b</b> , <b>8b</b> , <b>9b</b> , <b>28b-33b</b> ) ili OAc grupa ( <b>19b</b> , <b>20b</b> , <b>22b</b> , <b>24b-27b</b> ).
N1-TIP	1125	17,28-17,60	+	N1 čvor je blizu karbonilnog kiseonika OAc grupe <i>a</i> TIP je u blizini metilenske grupe na C-24 atomu ili metil grupe udaljenog OAc fragmenta. Izražena kod svih jedinjenja osim <b>1b-4b</b> .
N1-TIP	1178	34,24-34,56	-	Amido kiseonik i udaljeni alkil deo jedinjenja <b>17b</b> , <b>18b</b> i <b>20b</b> .





**Slika 71.** Strukturni delovi povezani sa varijablama: (a) 539 (DRY-O); (b) 880 (O-N1); (c) 1125 (N1-TIP), za jedinjenje **19b**; i (d) 1178 (N1-TIP), za jedinjenje **17b**.

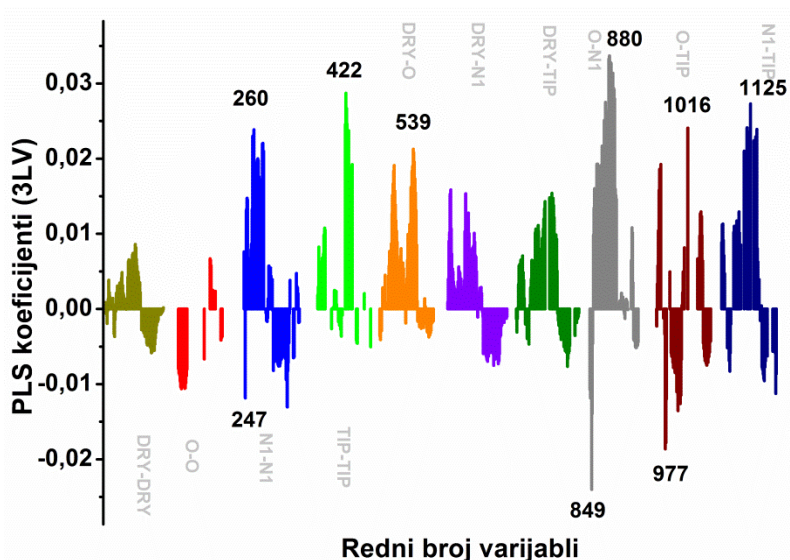
Ukupno, strukturni elementi koji doprinose povećanoj aktivnosti prema HeLa ćelijama su:

- acetoksi grupe (HBA) sa kojima interaguje N1 proba (sa energijama interakcije (EI) od  $-6,35$  do  $-5,65$  kcal/mol) i udaljene alkil grupe ( $17,28$ - $17,60$  Å) povezane sa TIP probom (izraženo kroz varijablu 1125, **Slika 71c**);
- acetoksi grupa povezana sa N1 probom istih energija interakcije kao kod varijable 1125, na rastojanju  $7,04$ - $7,36$  Å od regiona u kome se nalazi HBA grupa (komplementarna N1 probi), što je prikazano varijablom 260;
- nezaklonjena HBD grupa, uglavnom oko primarnog ili sekundarnog amidnog NH (interakcija sa O probom uz EI od  $-5,6$  do  $-4,7$  kcal/mol) i udaljeni ugljovodonični deo molekula, varijabla 539 (**Slika 71a**);
- amidni NH kao HBD, sa primarnih ili sekundarnih NH grupa povezanih sa C24 atomom steroidnog jezgra, i HBA acetoksi grupe ili tetroksanskog prstena na rastojanju  $15,04$ - $15,36$  Å, izraženo kroz varijablu 880 (**Slika 71b**).

Najaktivnija jedinjenja poseduju HBD grupe u obliku primarnog (**8b**, **19b**, **24b**, **28b**, **29b**) ili sekundarnog (**9b**, **20b**, **22b**, **25b**, **30b-33b**) amidnog azota ili u obliku karboksilne grupe (**7b**, **21b**, **26b**). Manje aktivna jedinjenja ispoljavaju slabije interakcije sa O probom u poređenju sa aktivnijim analogima usled sterne zaklonjenosti HBD grupe. Voluminozni alkil supstituenti u blizini amidnog atoma azota smanjuju aktivnost jedinjenja ovog tipa. Jedinjenja sa tercijarnom amidnom grupom, koja nema mogućnost doniranja H atoma, su najmanje aktivna. Na osnovu ovih zapažanja, vrlo je verovatno da su HBD grupe na krajevima molekula važne za antiproliferativnu aktivnost ovih jedinjenja.

Pored 3D QSAR modela sa aktivnostima prema HeLa ćelijskoj liniji, napravljen je i model sa aktivnostima prema FemX ćelijama. Primenjene su identične procedure kao i kod prethodnog modela. Statistički parametri dobijenog modela su prikazani u Prilogu, **Tabela P36**.

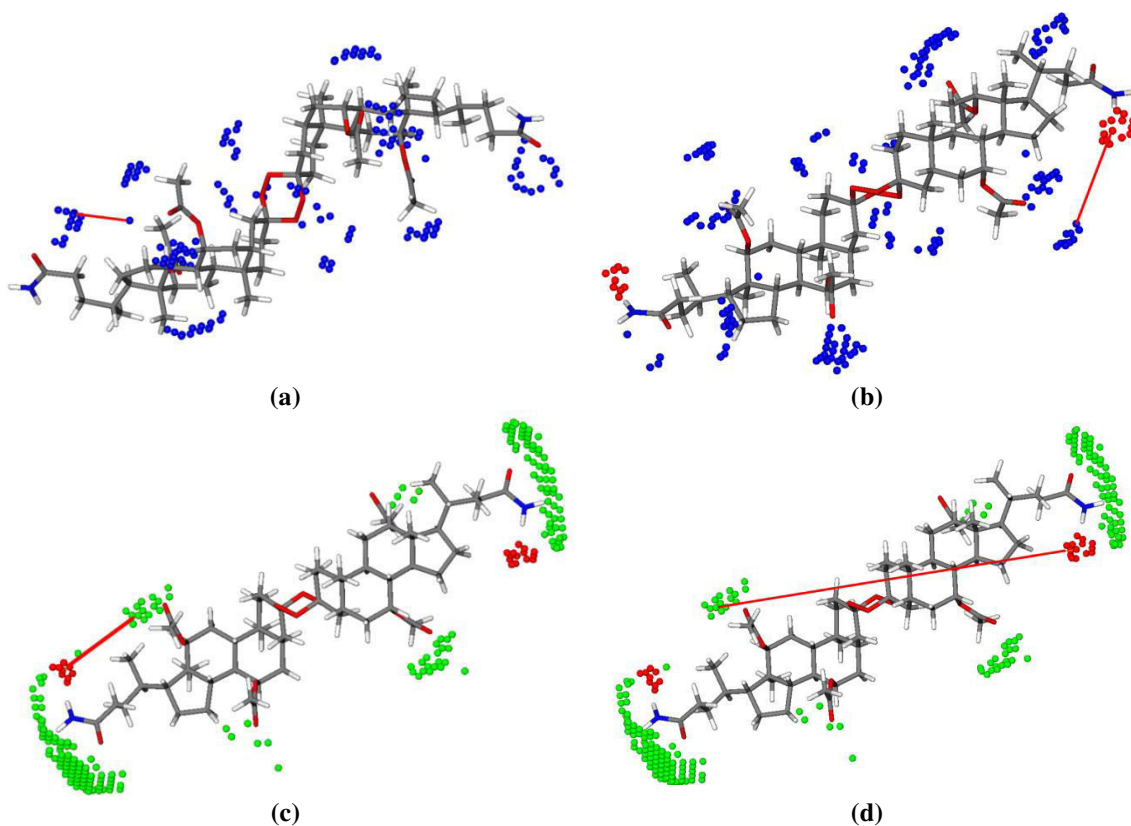
Dobijeni grafik PLS koeficijenata (**Slika 72**) jako je sličan grafiku za HeLa model. Varijable TIP-TIP 422, DRY-O 539, O-TIP 977 i N1-TIP 1125 imaju isti uticaj, težinu i povezani su sa istim strukturnim fragmentima jedinjenja kao i u HeLa modelu. Kratak opis najvažnijih varijabli dat je u **Tabeli 21**, dok je na **Slici 73** prikazano nekoliko najuticajnijih varijabli na FemX model.



**Slika 72.** Koeficijenti varijabli PLS modela antiproliferativne aktivnosti jedinjenja **1b-33b** prema FemX ćelijama.

**Tabela 21.** GRIND varijable sa najvećim uticajem (pozitivnim (+) ili negativnim (-)) na konačni PLS model i strukturni elementi jedinjenja **1b-33b** obuhvaćeni ovim varijablama

Blok proba	Broj varijable	Rastojanje (Å)	Uticaj	Strukturni elementi
N1-N1	247	2,88-3,20	-	Dve bliske HBA grupe. Prisutna kod svih jedinjenja izuzev <b>3b-5b</b> .
N1-N1	260	7,04-7,36	+	Acetoksi (OAc) grupe <i>i</i> karbonilni kiseonik sa prstena D steroidnog jezgra. Prisutna kod svih jedinjenja izuzev <b>3b-5b</b> .
DRY-O	539	20,16-20,48	+	Primarni ili sekundarni amido NH (čvor O probe) <i>i</i> angularna metil grupa ( <b>19b</b> , <b>20b</b> , <b>22b</b> i <b>24b-26b</b> ) ili cikloheksilni deo molekula ( <b>7b</b> , <b>8b</b> , <b>9b</b> , <b>28b-33b</b> ).
O-N1	849	5,12-5,44	-	Primarni ili sekundarni amido NH (O proba) <i>i</i> bliska OAc grupa (čvor N1 probe). Izražena kod jedinjenja <b>2b-5b</b> , <b>19b-22b</b> i <b>24b-26b</b> .
O-N1	880	15,04-15,36	+	Primarni ili sekundarni amido NH <i>i</i> N1 čvor na tetraoksanskom prstenu ( <b>7b</b> , <b>8b</b> , <b>9b</b> , <b>28b-33b</b> ) ili OAc grupi ( <b>19b-22b</b> , <b>24b-26b</b> ).
O-TIP	977	8,00-8,32	-	Čvor O probe je povezan sa amidnim atomom azota, dok je TIP proba povezana sa <i>N</i> -alkil supstituentom ili bliskom acetoksi grupom.
O-TIP	1016	20,48-20,80	+	Čvor O probe blizu primarnog ili sekundarnog amida <i>a</i> čvor TIP probe je blizu udaljene alkil-grupe (4''-Et, OAc ili alkil-supstituenti amidnog dela). Izražena kod najaktivnijih jedinjenja ( <b>7b-9b</b> , <b>19b-22b</b> , <b>24b-26b</b> , <b>28b-33b</b> ).
N1-TIP	1125	17,28-17,60	+	N1 čvor je blizu OAc grupe <i>a</i> čvor TIP probe je u blizini metilenske grupe na C-24 atomu ili metil grupe udaljene OAc grupe. Izražena kod svih jedinjenja osim <b>1b-4b</b> .



**Slika 73.** Strukturni delovi povezani sa varijablama: (a) 247 (N1- N1); (b) 849 (O-N1); (c) 977 (N1-TIP); (d) 1016 (O-TIP), za jedinjenje **19b**.

Sličan prostorni raspored HBD i HBA grupa molekula je važan za aktivnost prema obe ispitane ćelijske linije, što je pokazano varijablama 539, 880 i 1125. Jedinjenja sa acetoksi grupom u blizini (manje od ~5 Å) nesupstituisanog amidnog azota ili karbonilnog ili tetroksanskog atoma kiseonika ispoljila su manju aktivnost prema FemX ćelijskoj liniji, kao što je opisano varijablama N1-N1 247 (**Slika 73a**) i O-N1 849 (**Slika 73b**).

Udeo DRY MIF-ova u oba dobijena modela (**Slika 70** i **Slika 72**) je značajno manji nego udeo ostalih MIF-ova, što je izraženo kroz niže vrednosti PLS koeficijenata blokova koji sadrže DRY probu. S obzirom na to da su ispitivani molekuli vrlo hidrofobni jer sadrže veliko, nepolarno steroidno jezgro, dodatno je ispitano da li hidrofobnost molekula u značajnoj meri utiče na antiproliferativnu aktivnost jedinjenja **1b-33b**.  $VlogP$  i vrednost polarne površine (Polar Surface Area, PSA) izračunati su u programu Vega ZZ,<sup>174</sup> dok su zapremine DRY, O i N1 proba dobijene iz MIF-ova izračunatih u programu GRID<sup>143</sup> pomoću programa BIOCUBE.<sup>141</sup> Detaljniji opis ovih procedura dat je u Eksperimentalnom delu. Vrednosti svih parametara dati su u Prilogu, **Tabela P37**. Statistički značajan model dobijen je primenom metode višestruke linearne regresije i uključivao je  $p(IC_{50})$  vrednosti prema HeLa ćelijama kao zavisnu varijablu, a  $VlogP$  i zapreminu O probe kao nezavisne promenljive (jednačina 25):

$$p(IC_{50}) = -23,38(\pm 6,53) \cdot Vlog P + 0,40(\pm 0,31) \cdot O \text{ zapremina} + 6,15(\pm 0,38) \quad (25)$$

( $n = 26$ ,  $r = 0,87$ ,  $sd = 0,20$ ,  $F = 35,33$ ,  $q^2 = 0,63$ )

Jedinjenja **1b-5b**, **23b** i **25b** isključena su iz modela kao spoljne vrednosti. Jedinjenja **1b-5b** su manja od ostatka seta i imaju znatno niže  $VlogP$  vrednosti, dok su **23b** i **25b** produžena voluminoznim alkil supstituentima na amidnom delu molekula. Ova jedinjenja izlaze iz domena primenljivosti 3D QSAR modela jer su strukturno značajno različita od ostatka seta.

Veća hidrofobnost jedinjenja najčešće vodi do povećane biološke aktivnosti, jer hidrofobnija jedinjenja lakše prolaze kroz biološke membrane putem pasivnog transporta. U našem slučaju, negativna korelacija između antiproliferativne aktivnosti i  $VlogP$  vrednosti ukazuje na to da je moguć alternativni mehanizam transporta kroz membrane.

Ovom studijom pokazano je da 3D QSAR metode zasnovane na deskriptorima nezavisnim od međusobnog prostornog svrstavanja molekula mogu biti korisne u LBDD. Ekstrahovanjem podataka iz MIF-ova dobijeni su deskriptori za 2D QSAR koji je takođe dao statistički značajne korelacije uz moguće objašnjenje trendova u biološkoj aktivnosti. Kao glavno ograničenje ove metode možemo navesti mali domen primenljivosti, što znači da je pouzdano predviđanje biološke aktivnosti novih jedinjenja moguće samo za jedinjenja koja su strukturno jako slična jedinjenjima iz test seta. Ista metoda je iskorišćena i za nalaženje strukturnih karakteristika važnih za antibakterijsku aktivnost ADK prema MDR sojevima bakterija.

### *3.5.2. Proučavanje odnosa između strukture i antibakterijske aktivnosti ADK*

U prethodnoj studiji antibakterijskih aktivnosti ADK,<sup>1</sup> proučavana je sličnost između ispitivanih ADK i norfloksacina. Za svaku ispitivanu supstancu generisan je set konformera monoanjonskog oblika u programu OMEGA.<sup>175</sup> Svaki konformer iz seta je preklapljen sa reprezentativnom strukturom norfloksacina koristeći program ROCS.<sup>176</sup> Na ovaj način kvalitativno je pokazano da bolje preklapanje farmakofornih tačaka vodi ka aktivnijim derivatima. U okviru ove disertacije urađeno je slično preklapanje, s tim da je stepen preklapanja ADK i norfloksacina ovaj put kvantifikovan upotrebom Tanimoto funkcije ocenjivanja.<sup>177</sup> Primećeno je da se najaktivnija jedinjenja najbolje preklapaju sa norfloksacinom po kriterijumu oblika molekula, što je pokazano ROCS Overlap funkcijom (**Tabela 22**). Zanimljivo je da najaktivnija jedinjenja imaju najmanji *Color Tanimoto* skor, što ukazuje na to da je njihova farmakoforna sličnost sa norfloksacinom najmanja. Pretpostavka je da je mehanizam antibiotskog dejstva ADK različit od mehanizma dejstva norfloksacina.

**Tabela 22.** Vrednosti Tanimoto i ROCS overlap skoring funkcije koje pokazuju stepen preklapanja oblika i farmakofornih tačaka ADK sa norfloksacinom kao templatom

Jed.	Tanimoto Combo	Shape Tanimoto	Color Tanimoto	Overlap	Jed.	Tanimoto Combo	Shape Tanimoto	Color Tanimoto	Overlap
<b>1</b>	0,940	0,635	0,305	644,132	<b>14</b>	0,931	0,652	0,279	689,710
<b>2</b>	0,909	0,603	0,306	641,157	<b>15</b>	0,937	0,657	0,280	670,207
<b>3</b>	0,958	0,654	0,305	672,227	<b>16</b>	0,998	0,694	0,304	757,203
<b>4</b>	0,904	0,615	0,289	691,311	<b>17</b>	1,047	0,670	0,376	758,256
<b>5</b>	0,923	0,616	0,306	665,772	<b>18</b>	0,993	0,690	0,303	790,267
<b>6</b>	0,918	0,612	0,306	679,306	<b>19</b>	0,974	0,667	0,307	766,072
<b>7</b>	0,839	0,564	0,275	661,592	<b>20</b>	1,053	0,662	0,391	787,194
<b>8</b>	0,971	0,699	0,273	757,711	<b>21</b>	0,948	0,635	0,313	694,573
<b>9</b>	0,793	0,734	0,059	<b>860,108</b>	<b>1a</b>	0,846	0,703	0,143	878,132
<b>10</b>	0,844	0,564	0,280	661,289	<b>2a</b>	0,886	0,599	0,287	740,503
<b>11</b>	0,953	0,693	0,260	733,759	<b>3a</b>	1,064	0,708	0,355	783,744
<b>12</b>	0,805	0,672	0,133	<b>876,715</b>	<b>4a</b>	0,976	0,795	0,181	866,392
<b>13</b>	0,891	0,608	0,283	662,311	<b>5a</b>	0,735	0,569	0,166	655,108

U svrhu dobijanja modela koji bi dao više informacija o farmakofornim tačkama važnim za antibakterijsku aktivnost ADK, napravljena je baza podataka ADK aktivnih prema SA1199B soju bakterija otpornom na hidrofilne fluorohinolonske antibiotike. Objedinjeni su podaci dobijeni u okviru ovog (jedinjenja **1-21**) i prethodnog istraživanja (jedinjenja **22d-26d**)<sup>1</sup> i njima dodati podaci o aktivnosti jedinjenja bez keto-enolnog dela (**1a-5a**), kao i aktivnosti nekoliko antibiotika floksacinskog tipa prema istom soju MDR bakterija (podaci preuzeti iz literature). Antibakterijske aktivnosti svih jedinjenja su date u **Tabeli 3**.

Napravljen je 3D QSAR model zasnovan na MIF-ovima, gde je kao zavisna varijabla korišćena aktivnost jedinjenja prema SA1199B soju bakterija. Za dobijanje MIF-ova korišćeno je mapiranje molekula pomoću četiri hemijske probe: DRY, O, N1 i TIP. Detalji o tipovima hemijskih proba i načinima prevođenja informacija iz MIF-ova u varijable dati su u Eksperimentalnom i Opštem delu.

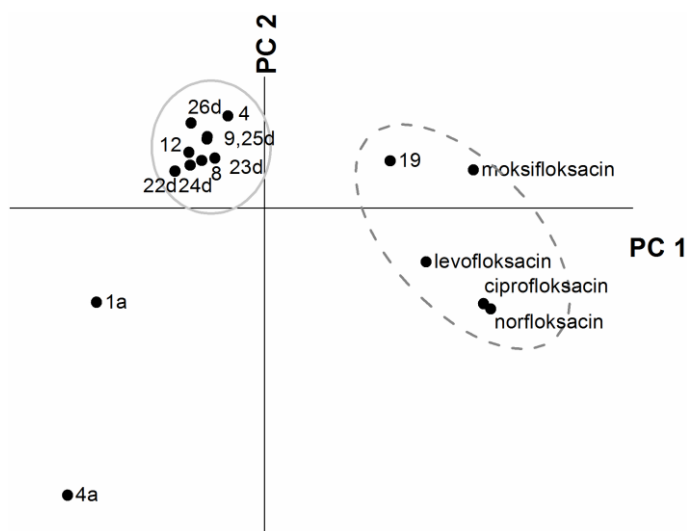
### 3.5.2.1. Analiza glavne komponente (PCA)

Sličnosti i razlike između MIF-ova datih jedinjenja proučavane su pomoću PCA. PCA model sa 5 glavnih komponenti (PC) koji je obuhvatao ceo set varijabli, objasnio je 84,45% sume X kvadrata ( $SSX_{acc}$ ), i 76,43% X varijanse ( $VarX_{acc}$ ). Da bi varijable bez značajnih informacija bile uklonjene, primenjen je jedan ciklus FFD i statistika dobijenog modela je prikazana u **Tabeli 23**.

**Tabela 23.** Statistički parametri PCA modela dobijenog nakon jednog FFD ciklusa (od 490, u modelu je zadržano 272 varijabli)

PC	SSX	SSX <sub>acc</sub>	VarX	VarX <sub>acc</sub>
1	48,11	48,11	44,29	44,29
2	14,87	62,98	12,82	57,11
3	9,65	72,63	8,47	65,57
4	8,22	80,85	8,09	73,67
5	3,60	84,45	2,76	76,43

Posmatranjem grafika PCA skorova - PC1 prema PC2, uočavamo grupisanje jedinjenja u dve grupe (**Slika 74**).



**Slika 74.** Raspored jedinjenja u prostoru prve dve PC.

Jedinjenja su grupisana prema broju donora vodoničnih veza (HBD). Klaster na desnom delu grafika sadrži jedinjenja sa dve HBD grupe, klaster levo sadrži molekule sa jednom HBD grupom, dok jedinjenja **1a** i **4a** nemaju HBD grupe i zbog toga odstupaju.

### 3.5.2.2. Regresiona analiza PLS metodom

Kvantitativni odnos između varijabli zasnovanih na MIF-ovima i antibakterijske aktivnosti uspostavljen je PLS regresionom analizom. Koristeći ceo set GRIND-2 varijabli, dobijen je model od dve latentne varijable (LV) sa  $r^2 = 0,88$ ;  $q^2 = 0,43$  (LOO) i SDEP = 0,62. Nakon primene jednog ciklusa FFD, prediktivnost modela je značajno

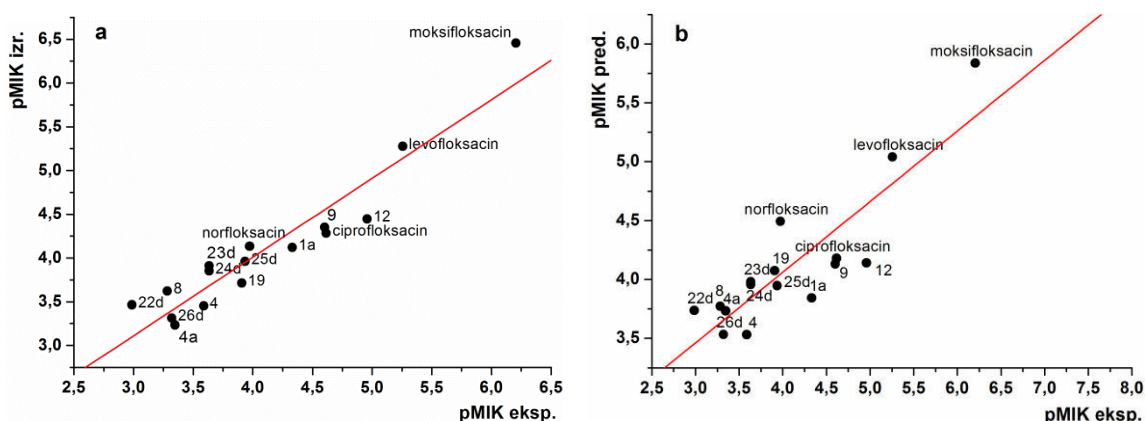
poboljšana (2LV,  $r^2 = 0,90$ ;  $q^2$  (LOO) = 0,72; SDEP = 0,43) i broj varijabli je smanjen sa 490 na 272. Pored LOO primenjene su i LTO i RG metode unakrsne validacije (CV). Poznato da je velika  $q^2$  (LOO) vrednost nedovoljna da bi se model smatrao prediktivnim<sup>178</sup> i CV pomoću više metoda daje bolju potvrdu o validnosti modela. Najbolji i preporučeni metod validacije, koji se sastoji od deljenja seta podataka na trening i test set nije urađen, iz razloga što je naš set sadržavao mali broj jedinjenja (ukupno 16) i takođe što RG validacija daje slične podatke o validnosti modela kao i deljenje podataka na trening i test set. Statistički parametri PLS modela nakon primene svake od pomenutih CV procedura su prikazani u **Tabeli 24**.

**Tabela 24.** Statistički parametri PLS modela sa dve LV nakon primene tri različite CV procedure

Model	SSX <sub>acc</sub>	SDEC*	SDEP	$r^2_{acc}$	$q^2_{acc}$
2 LV (LOO)	57,51	0,26	0,43	0,90	0,72
2 LV (LTO)	57,87	0,26	0,46	0,90	0,70
2 LV (RG)	60,33	0,26	0,53	0,90	0,59

\* Standardna devijacija greške izračunavanja (Standard Deviation of Error of Calculation – SDEC)

Na **Slici 75** prikazani su grafici zavisnosti izračunate od eksperimentalne (**Slika 75a**), kao i predviđene od eksperimentalne antibakterijske aktivnosti (**Slika 75b**), za model koji se sastoji iz 2 LV uz LOO unakrsnu validaciju.

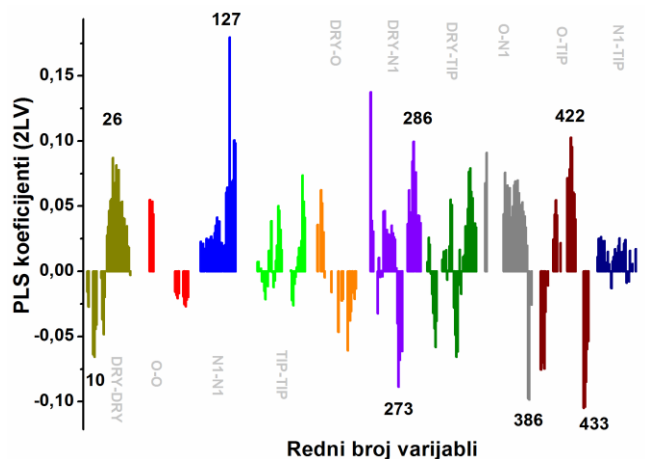


**Slika 75.** Grafici zavisnosti: a) izračunatih prema eksperimentalnim pMIK vrednostima i b) predviđenih prema eksperimentalnim  $-\log(\text{MIK})$  vrednostima (pMIK, date u  $\mu\text{mol/L}$ ), na osnovu 2 LV PLS modela sa LOO unakrsnom validacijom.

Predviđena aktivnost svih jedinjenja se nije razlikovala za više od  $\pm 2$  SDEP od eksperimentalnih vrednosti.



Grafik PLS koeficijenata varijabli (**Slika 76**) pokazuje koja od varijabli ima pozitivan uticaj (+ vrednosti) a koja negativan uticaj na biološku aktivnost (– vrednosti koeficijenata). Intenzivnije varijable znače da je veći uticaj strukturnih elemenata koje one opisuju na ukupnu aktivnost jedinjenja.



**Slika 76.** Grafik PLS koeficijenata (modela sa 2 LV). Najinformativnije varijable su označene brojevima i dalje diskutovane u tekstu.

U **Tabeli 25** opisane su najvažnije varijable i njihova povezanost sa strukturnim elementima jedinjenja.

**Tabela 25.** Pregled varijabli sa najvećim uticajem na antibakterijsku aktivnost jedinjenja.

Blok proba	Broj varijable	Rastojanje (Å)	Uticaj	Strukturni elementi, komentari
DRY-DRY	10	4,00-4,40	–	Aromatični prsten i drugi hidrofobni deo molekula na kratkom rastojanju. Izraženija kod manje aktivnih jedinjenja.
DRY-DRY	26	10,40-10,80	+	Optimalno rastojanje između dva hidrofobna dela molekula. Najveća vrednost varijable (VV) kod jedinjenja <b>12</b> i moksifloksacina.
N1-N1	127	11,60-12,00	+	Prisutna samo kod najaktivnijih jedinjenja. Predstavlja rastojanje između karboksilata i kiseonika keto ili metoksi grupe na datoj distanci.
DRY-N1	273	11,20-11,60	–	Izraženija kod manje aktivnih jedinjenja. Najmanja VV je za moksifloksacin i po tome se razlikuje od ostalih fluorohinolinskih antibiotika. Jedinjenja <b>9</b> i <b>12</b> takođe imaju male VV.
DRY-N1	286	16,40-16,80	+	Optimalno rastojanje između HBA i hidrofobne grupe. Izraženija kod aktivnijih jedinjenja, sa najvećom VV za moksifloksacin.
O-N1	386	17,20-17,60	–	Rastojanje između karboksilata (HBA) i protonovanog N atoma norfloksacina, ciprofloksacina i jedinjenja <b>19</b> . Nije izražena kod najaktivnijih jedinjenja.
O-TIP	422	12,00-12,40	+	Izraženija kod aktivnijih jedinjenja. Komplementarna je bloku varijabli O-N1 na manjim međučvorim rastojanjima (node-node distances)
O-TIP	433	16,40-16,80	–	HBD grupa relativno daleko od sternog centra (steric hot spot) Izražena samo u manje aktivnim jedinjenjima. Sadrži istu informaciju kao i varijabla 386.

DRY-DRY korelogrami daju informaciju o optimalnom rastojanju između dva hidrofobna dela molekula. Dok male distance imaju negativni uticaj na aktivnost, dva povoljna mesta za interakciju DRY probe na rastojanjima od 10 do 16 Å pozitivno doprinose antibakterijskoj aktivnosti.

Varijable iz N1-N1 bloka su direktno korelisane sa biološkom aktivnošću jedinjenja, uz optimalno rastojanje između dva čvora od 11,60 do 12,00 Å.

DRY-N1 korelogrami definišu optimalno rastojanje između HBA grupe i nepolarnog dela molekula (16,40-16,80 Å). Varijable iz ovog bloka sa manjom čvor-čvor distancom (11,20-11,60 Å) su inverzno korelisane sa antibakterijskom aktivnošću.

Blok varijabli O-N1 opisuje optimalno rastojanje između HBD i HBA grupe jedinjenja. Sve varijable rastojanja do 16,40 Å su direktno korelisane sa aktivnošću, dok su one većih rastojanja inverzno korelisane.

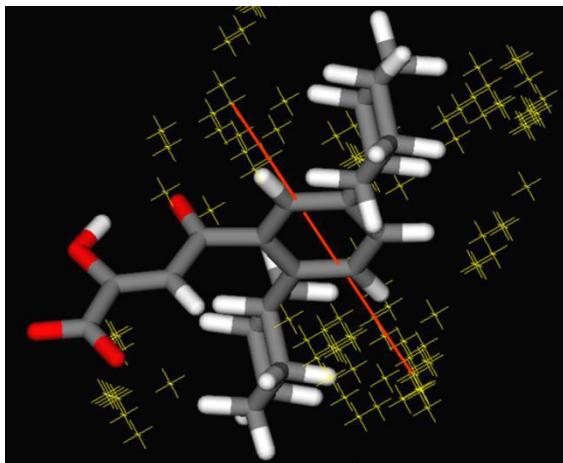
O-TIP korelogrami daju iste informacije o povezanosti strukturnih fragmenata sa aktivnošću kao i O-N1 varijable.

Na **Slici 77** prikazane su najuticajnije varijable, gde je norfloksacin uzet za prikazivanje svih varijabli sa negativnim uticajem, a jedinjenje **12** za varijable sa pozitivnim uticajem na antibakterijsku aktivnost.

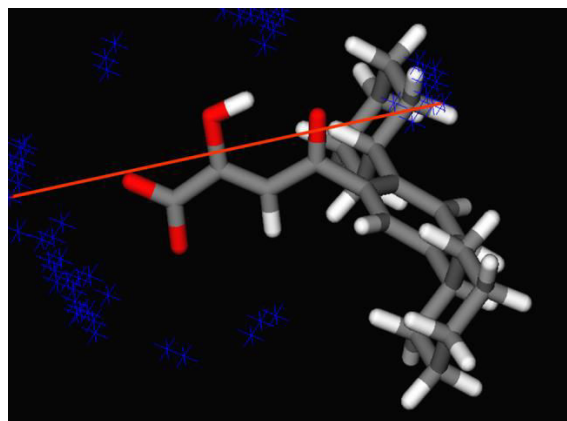
Kao zaključak možemo izvesti sledeća zapažanja:

- dva hidrofobna regiona molekula na rastojanjima od 10 do 16 Å pozitivno utiču na antibakterijsku aktivnost;
- prisustvo dve HBA grupe u molekulu povećava aktivnost, sa optimalnim rastojanjem između njih od 11,60 do 12,00 Å;
- optimalno rastojanje između hidrofobnog dela molekula i HBA grupe je 16,40-16,80 Å, a manja DRY-N1 rastojanja se mogu povezati sa smanjenom aktivnošću jedinjenja;
- postojanje HBA grupe na rastojanju do 16 Å od HBD pozitivno utiče na aktivnost, dok se obrnuto dešava za veća rastojanja;

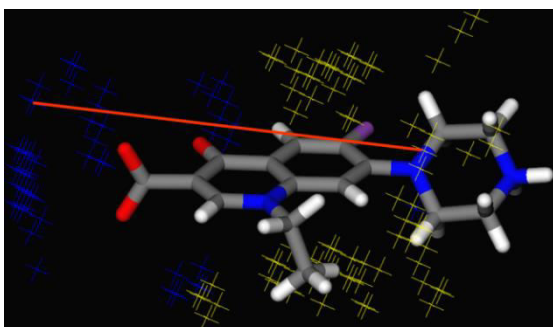
- važne sterne tačke molekula, predstavljene TIP probom, imaju optimalno rastojanje od HBD probe 11-14 Å, dok varijable sa rastojanjima preko 16 Å imaju negativan uticaj na biološku aktivnost.



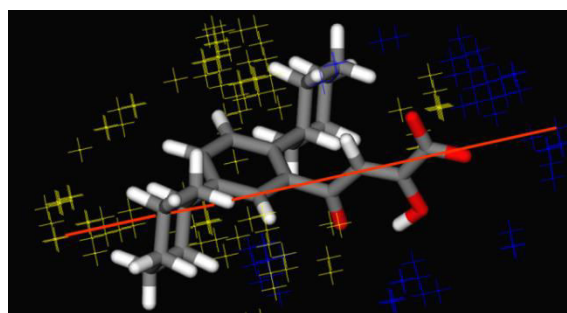
Varijabla 26 – jedinjenje 12



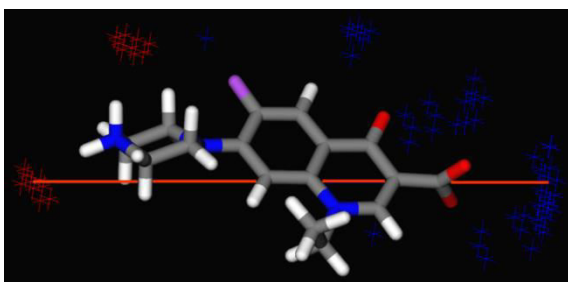
Varijabla 127 – jedinjenje 12



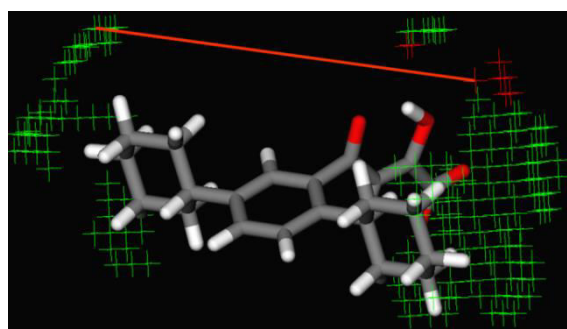
Varijabla 273 – norfloksacin



Varijabla 286 – jedinjenje 12



Varijabla 386 – norfloksacin



Var 422 – jedinjenje 12

**Slika 77.** Varijable sa najvećim uticajem na antibakterijsku aktivnost jedinjenja, predstavljene na jedinjenju 12 kao aktivnijem i norfloksacinu kao manje aktivnom jedinjenju.

Dobijeni model biće iskorišćen za virtuelni skrining velikog broja struktura, što može voditi do otkrića novih tipova struktura sa aktivnošću prema MDRSA bakterijama.

### 3.5.3. Analiza odnosa između strukture APK i inhibitorne aktivnosti prema KA

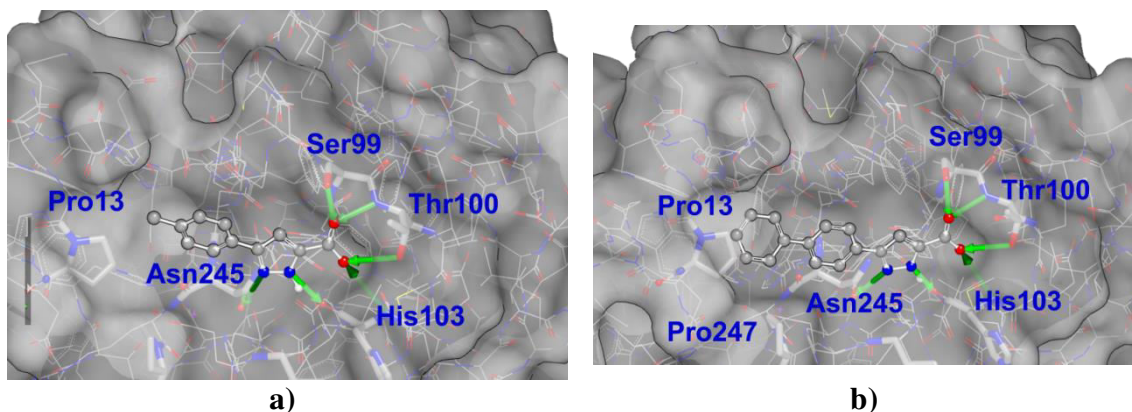
U slučaju kada je poznata struktura proteina čija je aktivnost modifikovana dejstvom malog molekula, moguće je objasniti trendove u aktivnosti modelovanjem interakcija između proteina i malog molekula. U tu svrhu najviše se koriste doking i molekulska dinamika. U okviru ove disertacije ispitana je inhibitorna aktivnost APK prema enzimima KA i primećena je značajna inhibitorna aktivnost i izoformska selektivnost.

Radi boljeg razumevanja molekulskih osobina važnih za aktivnost i selektivnost dejstva APK prema KA, urađen je doking dvadeset i tri APK (**Tabela 17**) u aktivno mesto četiri izoforme KA. Kristalne strukture ovih enzima preuzete su iz PDB-a. Sve izabrane strukture su bile visoke rezolucije i poticale su od nativnih, nemutiranih enzima (wild type). KA I je modelovana iz PDB strukture pod šifrom 1HCB,<sup>179</sup> rezolucije 1,60 Å; KA II iz 3B4F,<sup>180</sup> rezolucije 1,89 Å; KA IX iz 3IAI,<sup>181</sup> rezolucije 2,20 Å i KA XII iz 1JD0,<sup>182</sup> rezolucije 1,50 Å. Neki od ovih enzima bili su kokristalisani sa inhibitorima. Proteini su pripremljeni za doking uklanjajući sve male molekule i molekule vode; nakon toga su proteini neutralisani kontra jonima, uronjeni u klaster molekula vode i relaksirani minimizacijom energije molekulskom dinamikom (više detalja o pripremi proteina za doking se nalazi u Eksperimentalnom delu).

U kristalnim strukturama KA sa kokristalisanim inhibitorima koji kao GVC sadrže –COOH grupu, prisutan je jedan molekul vode koordinovan za katalitički  $Zn^{2+}$  jon, igrajući ulogu mosta između  $Zn^{2+}$  jona i –COOH grupe inhibitora. Zato je pre dokinga dodat molekul vode u blizini  $Zn^{2+}$  jona. Početni položaj vode grubo je određen iz PDB strukture 4E3G,<sup>183</sup> *para*-hidroksibenzoeve kiseline kokristalisane sa KA II i dalje je popraavljen koristeći WaterFLAP protokol. Sve strukture APK su pripremane za doking kao anjoni sa deprotonovanom karboksilnom grupom, što je u skladu sa stanjem protonovanosti ovih molekula na pH vrednosti krvi. Dva tautomera (**A i B, Slika 24**) su uzimana u obzir prilikom dokinga.

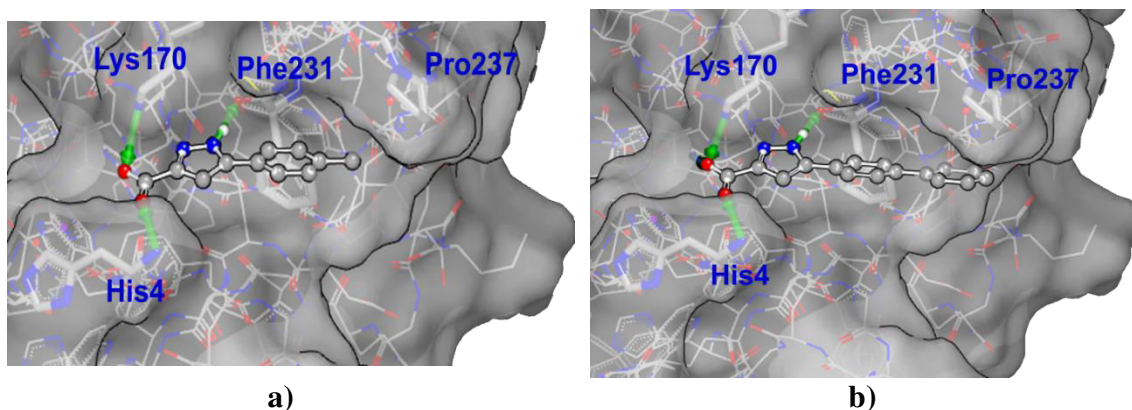
Pokušaji da se APK dokuju u aktivne centre svake izoforme nisu dale korisne informacije, tako da je sledeći korak bio doking na cele enzime kao mete. Sva jedinjenja bila su vezana van aktivnog mesta KA I (**Slika 78**), u šupljini ograničenoj ostacima prolina (Pro13), asparagina (Asn24), treonina (Thr100) i histidina (His103).

Karboksilatni anjon ovih jedinjenja gradi polarne interakcije sa –OH grupama serina (Ser99) i Thr100, dok pirazolski atomi azota grade polarne interakcije sa bočnim ostatkom Asn245 i karbonilnom grupom iz lanca His103. Veliki alkil supstituenti obično su bili umetnuti između bočnih ostataka Pro13 i Pro247.



**Slika 78.** Najbolje rangirana rešenja jedinjenja a) **25** i b) **39**, dokovanih u KA I.

U slučaju KA II, doking studije su takođe pokazale da se većina jedinjenja vezuje izvan aktivnog mesta (**Slika 79**). Jedinjenja su grupisana u oblasti ograničenoj ostacima: triptofana (Trp5), lizina (Lys170), Asn232 i Pro237. Karboksilatni jon ostvaruje polarne interakcije sa NH iz lanca His4 i –NH<sub>3</sub><sup>+</sup> bočnog niza Lys170, dok su pirazolski atomi azota vodonično vezani sa karbonilnom grupom iz lanca fenilalanina (Phe231). U slučaju KA I i KA II slična doking rešenja su dobijena nevezano za položaj His64 („in” ili „out”).

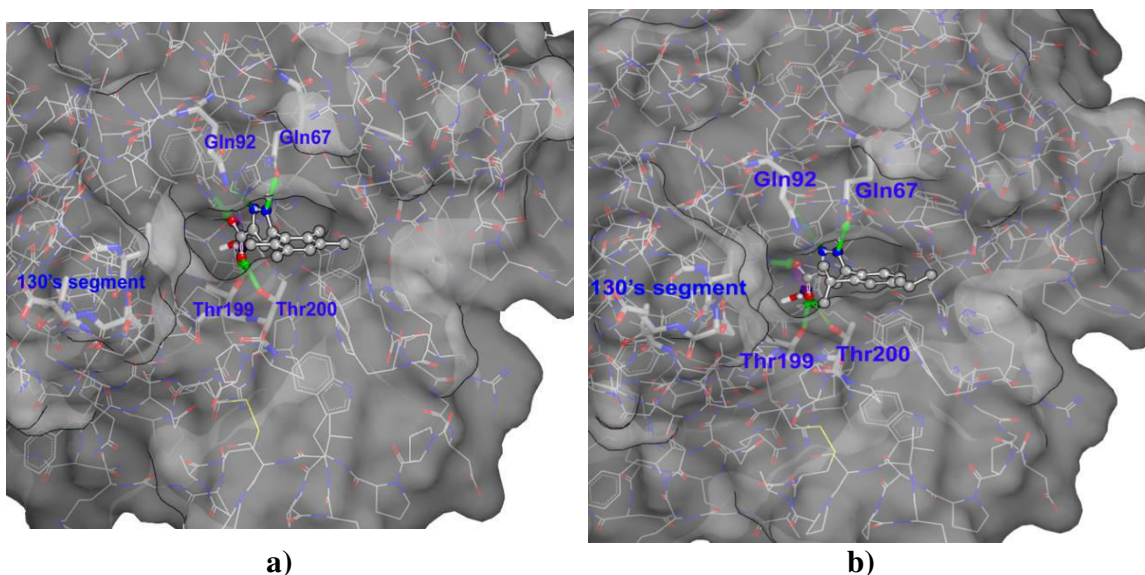


**Slika 79.** Najbolje rangirana rešenja jedinjenja a) **25** i b) **39**, dokovanih u KA II.

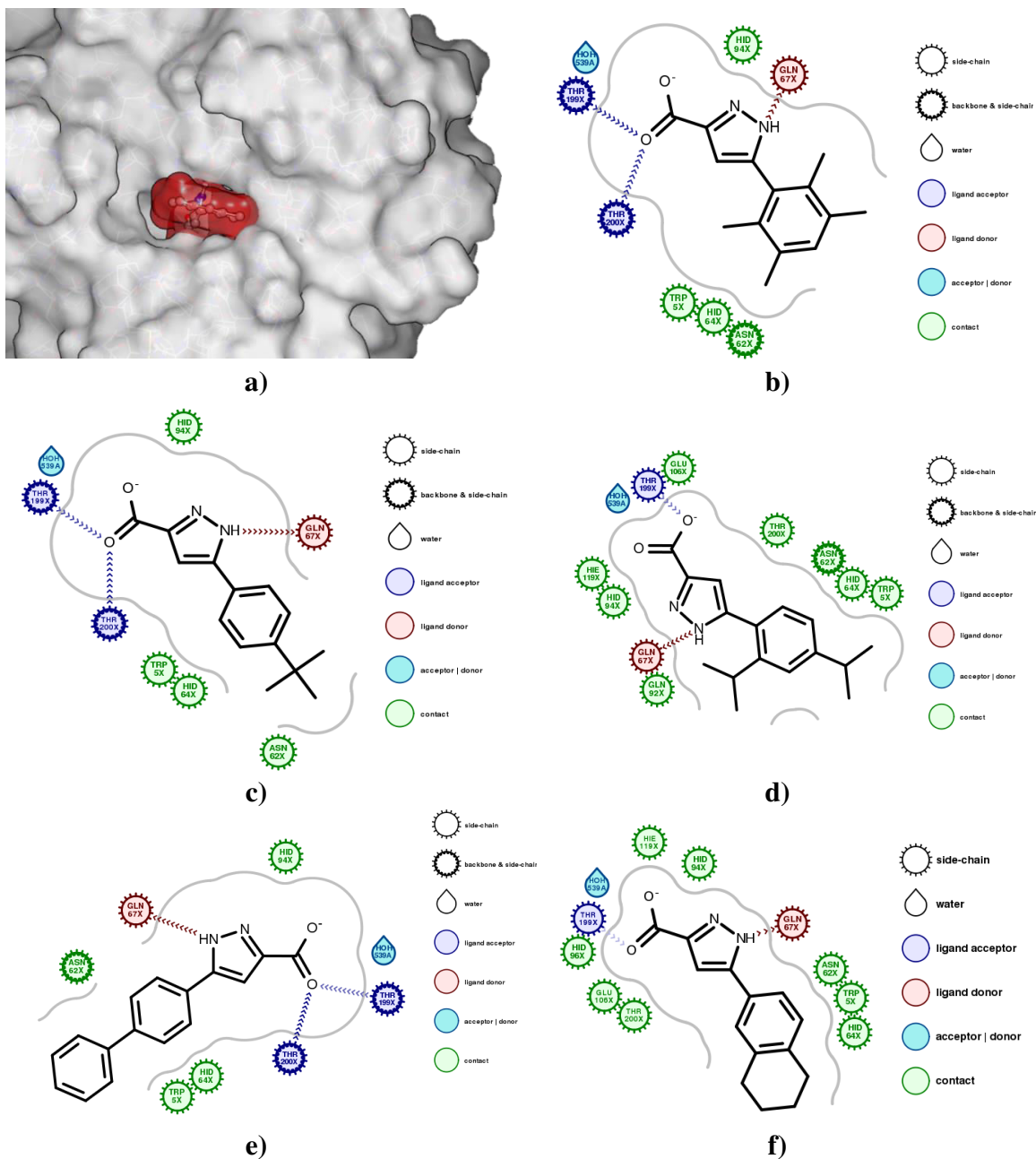
Veći afinitet APK ka regionima KA I i II van aktivnog mesta može objasniti neaktivnost APK prema citosolnim izoformama proučavanim u okviru ovog rada.

Za razliku od KA I i II, doking studije APK u celokupne strukture KA IX i XII su pokazale da se sva proučavana jedinjenja (uključujući i ona sa  $K_i > 50 \mu\text{M}$ ) vezuju blizu  $\text{Zn}^{2+}$  jona u aktivnom mestu enzima. U slučaju KA IX, karboksilatni jon gradi polarne interakcije sa hidroksilnom grupom Thr199 i Thr200 kao i sa molekulom vode koordinovanim za  $\text{Zn}^{2+}$ . Pirazolski  $-\text{NH}$  gradi polarne interakcije sa karbonilnom grupom bočnog ostatka glutamina (Gln67). Iz **Tabele 17** može se uočiti da jedinjenja aktivna prema KA IX imaju alkil supstitente u *orto*- ili *meta*-položaju fenilnog jezgra. Jedinjenja sa voluminoznijim supstituentima u *para*-položaju su bila manje aktivna. Posmatrajući rezultate dokinga vidljivo je bolje prostorno uklapanje jedinjenja sa *orto*- i *meta*-supstituentima, kao i onih sa manjim supstituentima u *para*-položaju u šupljinu aktivnog mesta u odnosu na ostale molekule iz serije APK, koji su bili neaktivni prema KA IX. Ova šupljina je ograničena ostacima Trp5, Asn62 i His64 i smeštena daleko od sekvence nepolarnih aminokiselinskih ostataka 131-134 (označen kao 130's segment, **Slika 80** i **Slika 81**). Ranije je pokazano da su ovi ostaci uključeni u vezivanje različitih klasa inhibitora ili aktivatora KA.<sup>61</sup>

Ovi rezultati mogu ukazati na strukturne karakteristike koje razlikuju aktivne od neaktivnih jedinjenja prema KA IX. Pored ovoga, primećeno je i da jedinjenja **29** i **33** sa  $K_i < 10 \mu\text{M}$  imaju veoma slične 3D-zavisne molekulske osobine, posebno nepolarnu površinu, zapreminu i  $V\log P$  (**Tabela P34**).



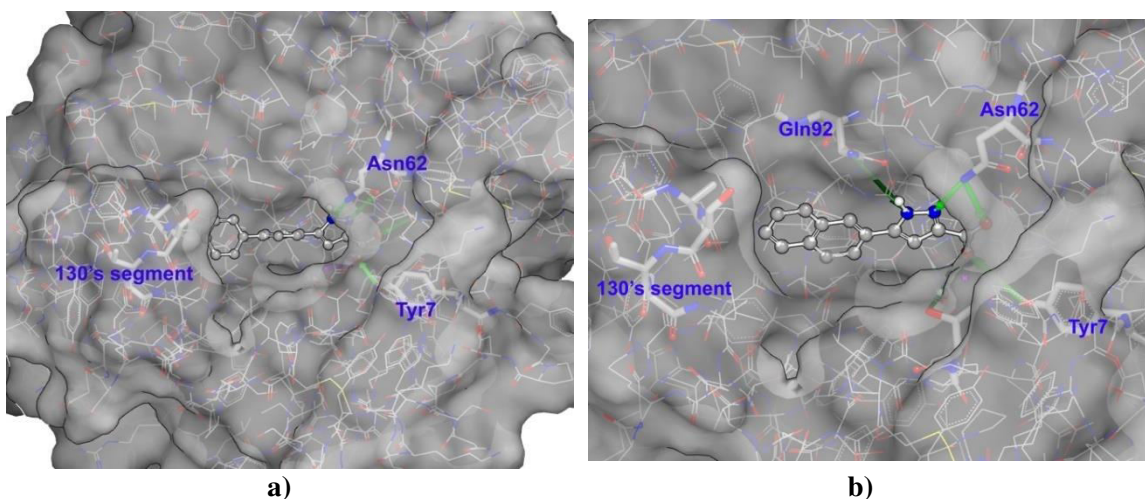
**Slika 80.** Najbolje rangirana rešenja jedinjenja a) **33** i b) **35**, dokovanih u KA IX.



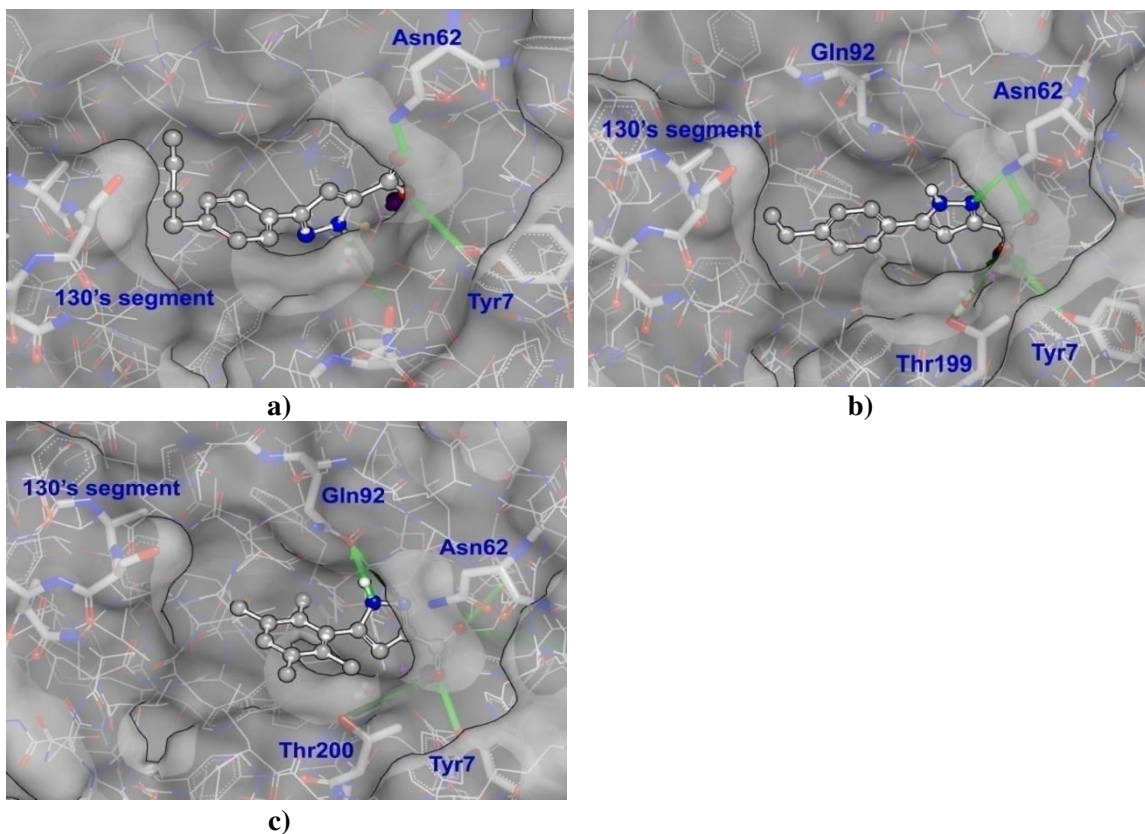
**Slika 81.** Komplementarnost oblika KA IX sa aktivnim i neaktivnim jedinjenjima.  
 a) Prikazane su površine jedinjenja 33 (crveno-transparentno) i šupljine KA IX (sivo polutransparentno). 2D prikaz komplementarnosti oblika: b) jedinjenja 33; c) jedinjenja 29; d) jedinjenja 35; e) jedinjenja 39; f) jedinjenja 37.

Doking rešenja svih APK sa KA XII nalazila su se blizu  $Zn^{2+}$  jona u aktivnom centru ali u različitoj orijentaciji u odnosu na KA IX. Karboksilatni jon gradi polarne interakcije sa hidroksilnim grupama ostataka Tyr7 i Thr199 ili  $-NH_2$  bočnog ostatka Asn62. Atomi azota pirazolskog prstena ostvaruju polarne interakcije sa bočnim ostatkom Asn62 ili interaguju sa Thr199 preko molekula vode kao medijatora.

Aromatični delovi molekula bili su usmereni prema 130's segmentu. Ovaj deo aktivnog mesta je specifičan za KA XII i smatra se pogodnim za dizajn izoformsko specifičnih inhibitora.<sup>182</sup> Posmatranjem doking rezultata uočeno je da aril- delovi svih molekula aktivnih prema KA XII ostvaruju van der Waals-ove interakcije sa 130's segmentom, dok aril delovi molekula kod neaktivnih jedinjenja ne mogu dosegnuti do ovih aminokiselnih ostataka (**Slika 82** i **Slika 83**).



**Slika 82.** Najbolje rangirana rešenja jedinjenja: a) **39** i b) **38**, dokovanih u KA XII.



**Slika 83.** Najbolje rangirana rešenja jedinjenja: a) **28**, b) **36**, c) **33**, dokovanih u KA XII.

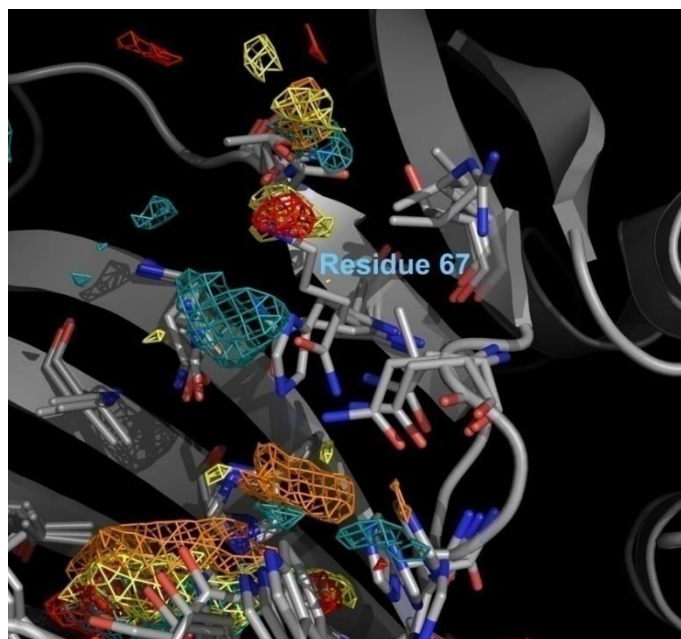


Ovi rezultati racionalizuju odnos između strukture APK i aktivnosti prema KA XII.

Statistički značajna korelacija između izračunatih afiniteta jedinjenja (doking afiniteti dobijeni funkcijama ocenjivanja) i eksperimentalnih  $K_i$  prema KA IX i XII nije pronađena. ChemGauss4 funkcija ocenjivanja uzima u obzir komplementarnost oblika i elektrostatike, kao i energetske doprinose potreban za desolvataciju liganda i vezivnog mesta. Niti ukupan skor, niti komplementarnost oblika nisu pokazali trend sa eksperimentalno dobijenim  $K_i$  vrednostima. Ovakvi rezultati nisu iznenađujući, s obzirom na mali opseg  $K_i$  vrednosti, širok i konusan oblik aktivnog mesta KA i činjenicu da su analizirani molekuli iz kongenerne serije sa razlikama jedino u nepolarnim delovima molekula.

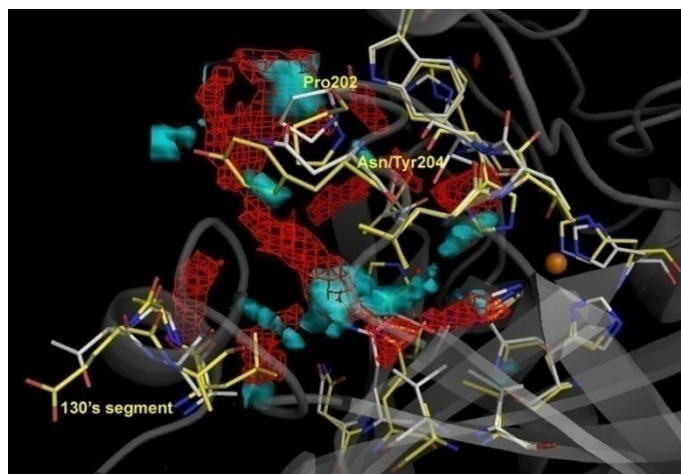
U literaturi je pronađeno samo jedno sistematsko poređenje aktivnih mesta KA I, II, IX i XII.<sup>184</sup> Navedeni su aminokiselinski ostaci koji učestvuju u vezivanju liganada i komentarisane su razlike. U potrazi za dodatnim strukturnim podacima koji mogu objasniti selektivnost APK prema KA IX i XII, u okviru ovog rada mapirana su aktivna mesta sve četiri izoforme koristeći GRID polje sila.<sup>143</sup> Polja molekulskih interakcija dela enzima koji obuhvata sve aminokiselinske ostatke koji interaguju sa ligandima u do tad prijavljenim kristalnim strukturama su izračunata koristeći DRY, N1 i O probu (više detalja se nalazi u Eksperimentalnom delu).

Koristeći HBD i HBA probe primećene su razlike u MIF-ovima u blizini ostatka 67 (**Slika 84**). U ovom položaju vrlo slični Asn iz KA II ili Gln iz KA IX zamenjeni su sa His u KA I ili Lys u KA XII.

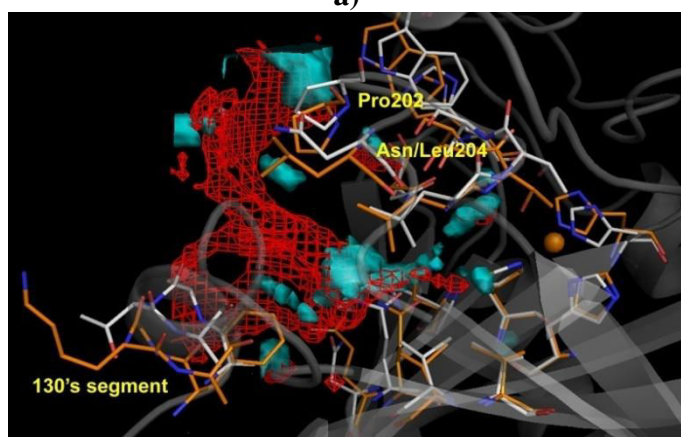


**Slika 84.** Polja molekularnih interakcija HBA probe (O GRID proba) oko ostatka broj 67 (Residue 67) KA, prikazana na izokonturnom nivou od  $-6,2$  kcal/mol. Boje polja: KA I – crvena, KA II – narandžasta, KA IX – žuta, KA XII – plava.

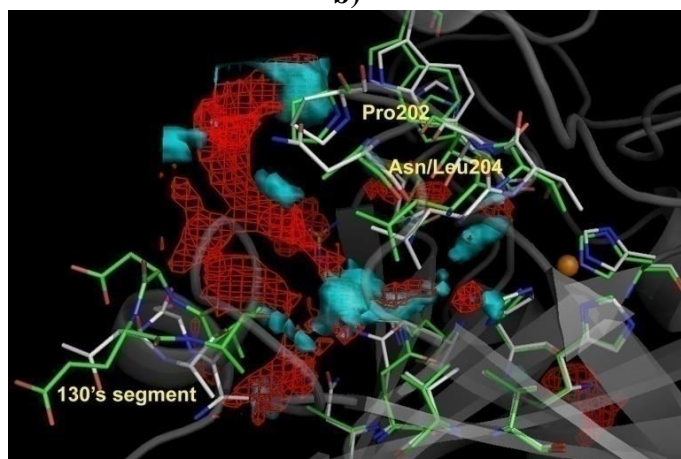
Manje očigledne razlike nađene su poređenjem MIF-ova dobijenih pomoću DRY probe. Kod sve četiri izoforme postoji globalni minimum DRY probe na  $-3,0$  kcal/mol u blizini Pro202, konzerviranom ostatku kod sve četiri izoforme. Na proizvoljno odabranom izokonturnom nivou od  $-0,7$  do  $-0,9$  kcal/mol, primećena je neprekidna površina DRY probe u prostoru od prolina (Pro202) do oblasti između leucina (Leu198) i Gln92, kod izoformi KA I, II i IX (**Slika 85**).



a)



b)



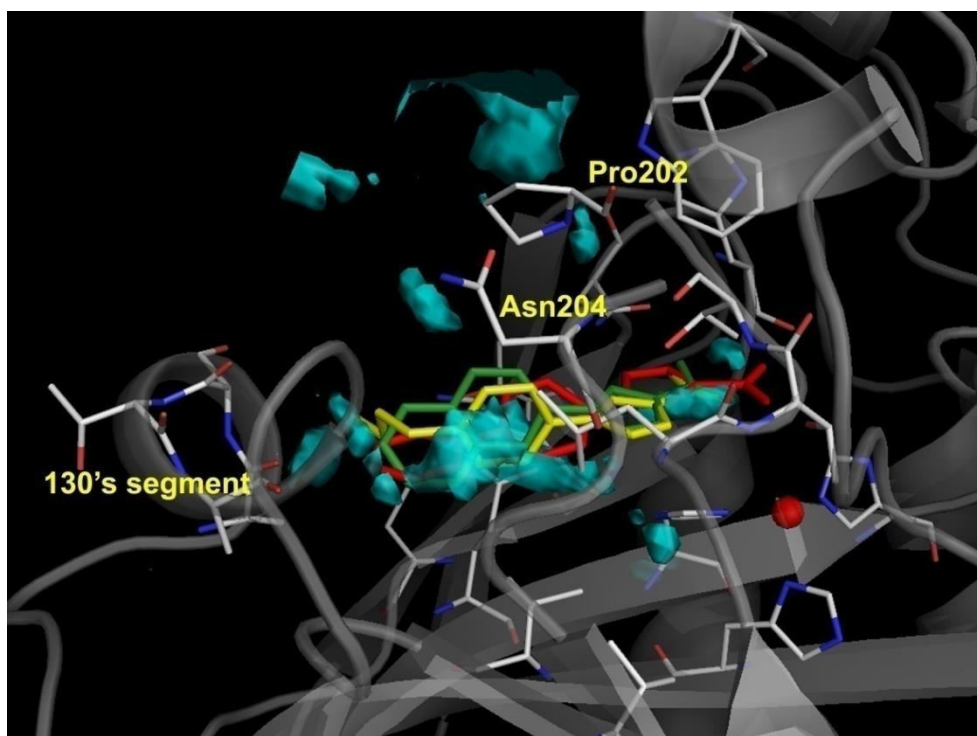
c)

**Slika 85.** Površina DRY MIF u aktivnom mestu KA I, II, IX i XII, prikazana na izokonturnom nivou  $-0,7$  kcal/mol. a) Poređenje između KA XII (plavo ispunjeno polje, sivi ugljenikovi atomi AK ostataka) i KA I (crveno mrežasto polje, žuti ugljenikovi atomi); b) Poređenje između KA XII (plavo ispunjeno polje, sivi ugljenikovi atomi AK ostataka) i KA II (crveno mrežasto polje, narandžasti ugljenikovi atomi); c) Poređenje između KA XII (plavo ispunjeno polje, sivi ugljenikovi atomi AK ostataka) i KA IX (crveno mrežasto polje, zeleni ugljenikovi atomi).

Kod KA XII, DRY površina pojavljuje se samo u oblasti oko Pro202 i oblasti između Leu198 i Gln92, ali ove dve površine nisu međusobno povezane. Ova razlika se pojavljuje ne samo zbog manje voluminoznog, nepolarnog bočnog ostatka Ala131 u KA XII u poređenju sa Leu (KA I), Phe (KA II) ili Val (KA IX) u istom položaju već i zbog razlika u položaju 204. Kod KA I tu se nalazi Ala, kod KA II Leu a kod KA IX Tyr - sva tri ostatka imaju sposobnost građenja hidrofobnih interakcija. U slučaju KA XII, ostatak broj 204 je Asn koji prvenstveno gradi polarne interakcije.

Ovako eksplicitno opisivanje razlika između različitih izoformi KA do sada nije opisano u literaturi, a moglo bi se iskoristiti za dizajn izoformsko selektivnih inhibitora uvođenjem hidrofobnog/hidrofilnog dela molekula relativno daleko od GVC. U literaturi je opisano korišćenje isključivo razlika u 130's segmentu radi dizajna inhibitora selektivnih prema KA XII.

Iz doking rešenja četiri najaktivnija derivata prema KA XII (jedinjenja **26**, **28**, **38**, **39**) vidljivo je da se fenilni delovi molekula dobro poklapaju sa DRY minimumom između Leu198 i Gln92 (**Slika 86**), dok se isti delovi molekula kod neaktivnih jedinjenja nalaze izvan ovog regiona.



**Slika 86.** Najbolje rangirana rešenja jedinjenja za jedinjenja **28** (žuti štapići), **38** (zeleni štapići) i **39** (crveni štapići) preklopljena sa površinom DRY MIF (izokonturni nivo – 0,7 kcal/mol) u aktivnom mestu KA XII.

Uzimajući u obzir aktivnosti APK prema KA IX i XII, rezultati dobijeni dokingom i poređenjem aktivnih mesta četiri izoforme KA ukazuju na to da bi povećanje fleksibilnosti novih jedinjenja iz serije APK bilo pogodno za povećanje aktivnosti, dok je voluminoznost fenil supstituenata potrebno zadržati radi dobijanja izoformske selektivnosti prema KA XII. Sa samo dve rotabilne veze u osnovnoj strukturi (Ph-pirazol-COOH) i supstituentima koji imaju mali stepen konformacione slobode (izuzev 4-*n*-Bu derivata **28**) ispitivana jedinjenja su relativno rigidna. Nakon vezivanja -COO<sup>-</sup> za Zn<sup>2+</sup> jon preko molekula vode kao mosta, hidrofobni delovi molekula ne mogu u isto vreme doseći do delova aktivnog mesta daleko od Zn<sup>2+</sup> jona gde bi napravili jače nekovalentne interakcije. Ovi zaključci mogu biti iskorišćeni za dizajn novih kongenera inhibitora KA koji kao GVC sadrže karboksilatni jon.

## 4. Materijali i metode

### 4.1. Sinteza i karakterizacija jedinjenja

#### 4.1.1. Opšte napomene

Sva jedinjenja korišćena u sintezi ADK (**1-21**), jedinjenja **1a-5a** i APK (**25-51**) bila su čistoće *p.a.* (Merck, Sigma-Aldrich, Fluka). Struktura i čistoća sintetisanih jedinjenja potvrđena je pomoću  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  NMR i IC spektroskopije, određivanjem tačke topljenja, masenom spektrometrijom visoke rezolucije (ESI-MS) i za pojedine derivate i HPLC analizom. Sva jedinjenja bila su čistoće preko 95%.

Za tankoslojnu hromatografiju je korišćen silika gel (63-100, 60 Å), sa fluorescentnim indikatorom (254 nm).

Tačke topljenja su određene na SMP-10 Stuart aparatu i nisu korigovane.

$^1\text{H}$  NMR,  $^{13}\text{C}$  NMR spektri jedinjenja su snimani u DMSO- $d_6$ ,  $\text{CDCl}_3$  ili  $\text{CD}_3\text{OD}$  na aparatima Varian Gemini 200 ili Bruker AVANCE na 200/50 ili 500/125 MHz. NOESY spektri pojedinih derivata snimljeni su takođe na Bruker-ovom NMR spektrometru od 500 MHz, u odgovarajućem deuterisanom rastvaraču. Vrednosti hemijskih pomeranja,  $\delta$ , su izražene u *ppm* jedinicama u odnosu na tetrametilsilan (TMS) kao unutrašnji standard ili u odnosu na rezidualni signal rastvarača. Pri pripisivanju multipliciteta signala korišćene su sledeće skraćenice: *s* - singlet; *d* - dublet; *t* - triplet, *q* - kvartet, *qn* - kvintet; *sx* - sekstet; *hp* - heptet, *m* - multiplet; *br* - širok signal.

ESI-MS spektri snimani su u metanolu na Agilent Technologies 6210-1210 TOF-LC-ESI-MS instrument, u pozitivnom ili negativnom modu.

IC spektri snimani su na Thermo Nicolet 6700 FT-IC spektrometru opremljenim sa ATR dodatkom.

HPLC čistoća jedinjenja određena je na Agilent Technologies 1260 Infinity Series aparatu sa Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6×50 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ) kolonom. Kao eluenti korišćeni su metanol (Merck, LiChrosolv), mravlja kiselina (Fisher Scientific, F/1750/PB15) i acetonitril (Sigma Aldrich, Chromasolv).

#### 4.1.2. Sinteza i karakterizacija arildiketo kiselina (jedinjenja 1-21)

Jedinjenja **1-21** su sintetisana Claisen-ovom kondenzacijom supstituisanih acetofenona i dietil oksalata. U slučaju kada supstituisani acetofenon nije komercijalno dostupan, sintetiše se iz odgovarajuće supstituisanog benzena Friedel-Crafts-ovim acilovanjem. Tipična procedura za acilovanje je sledeća:

U dvogrli balon od 100 ml kapalicom i magnetnom mešalicom doda se 0,048 mola anhidrovanog  $\text{AlCl}_3$  i 25 ml suvog  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i ohladi se na  $0^\circ\text{C}$  ledenim kupatilom. Zatim se u hladnu reakcionu smešu doda 0,04 mola susptituisanog benzena nakon čega se brzo ukapa 0,04 mola acetil hlorida. Nakon 15 minuta mešanja na  $0^\circ\text{C}$  ledeno kupatilo se skloni i reakciona smeša se meša još 6 sati na sobnoj temperaturi. Reakciona smeša vremenom postaje crveno-narandžaste boje. Izlivanjem u hladnu 10% HCl reakciona smeša postaje bele boje nakon čega se ekstrahuje sa  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Kombinovani organski ekstrakti se suše preko  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , koncentruju na vakuum uparivaču i prečišćavaju vakuum destilacijom ili kristalizacijom.

Acetofenoni sa cikličnim aminima u *para*-položaju sintetišu se na sledeći način:

U reaktor za reakcije pod visokim pritiskom od prohroma, zapremine 8 ml doda se 0,005 mola 4-fluor acetofenona, 0,02 mola odgovarajućeg cikličnog amina i 3 ml suvog acetona radi povećavanja autogenog pritiska u sudu. Zatvoreni sud se zagreva 3 sata na  $180^\circ\text{C}$ . Zatim se reakciona smeša izlije u vodu i ekstrahuje sa etil acetatom ili hloroformom. Kombinovani organski ekstrakti se suše preko  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , koncentruju na vakuum uparivaču i prečišćavaju hromatografijom na koloni ili kristalizacijom.

Tipična procedura za sintezu arildiketo kiselina je sledeća:

U 10 ml suvog metanola u balonu od 50 ml lagano se dodaje 0,03 mola metalnog Na. Zatim se dodaje 0,2 mola dietil oksalata pri čemu reakciona smeša postaje blago zamućena. Nakon toga se uz mešanje dodaje 0,01 mol susptituisanog acetofenona (čvrstog ili rastvorenog u minimalnoj zapremini metanola) i reakciona smeša se meša preko noći na sobnoj temperaturi. U roku od 30 min reakciona smeša se zgušnjava usled nastanka kondenzacionog proizvoda (estra ADK). Reakcija se završava dodatkom 20 ml vode. Usled prisutnog viška baze, nastali estar podleže bazno katalizovanoj hidrolizi i

rastvara se u vodi. Nakon 2 sata mešanja na sobnoj temperaturi reakciona smeša se izliva u 1 M HCl i ostavi da se meša još 1 sat. Dobijeni talog se procedi na Büchnerovom levku, ispere sa petroletrom i suši. Proizvodi se prečišćavaju kristalizacijom ili hromatografijom na koloni.

#### 4.1.2.1. Karakterizacija arildiketo kiselina (**1-21**), polaznih acetofenona i aroilpropanskih kiselina (**1a-3a**)

**4-fenil-2,4-dioksobutanska kiselina (1):**  $C_{10}H_8O_4$ ,  $M_r = 192,17$ , čvrsta supstanca svetlo žute boje, t.t. = 142-143°C, razlaganje (kristalisanost iz AcOEt/PhMe), prinos 72%; IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 2997 *br* (COO–H), 1720 (C=O), 1626 (C=O), 1275 (C–O);  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 4,57 (*s, br*, 1 H,  $\underline{CH_2}$  diketo oblika), 7,08 (*s*, 1 H,  $\underline{CH}$  enolnog oblika), 7,32 (*s*, signal od  $\underline{CH}$  manje zastupljenog enolnog oblika), 7,51 (*t*,  $J = 7,30$  Hz, 2 H), 7,64 (*t*,  $J = 7,30$  Hz, 1 H), 8,00 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2 H), 13,55 (*s, br*, 1 H, COOH);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 49,27, 98,02, 128,02, 129,24, 134,15, 134,79, 163,38, 170,42, 190,69. Dva tautomerna oblika su vidljiva u rastvoru, a signal na 49,27 ppm odgovara  $\underline{CH_2}$  delu diketo oblika.

**4-(2-metilfenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (2):**  $C_{11}H_{10}O_4$ ,  $M_r = 206,19$ , čvrsta supstanca bele boje (1,25 g, 76%), t.t. = 106-108°C, raspadanje (iz EtOH); ESI-MS: Izračunato za  $C_{11}H_9O_4 [M-H]^-$  205,0501, izmereno 205,0509; IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 2991 *br* (COO–H), 1710 (C=O), 1635 (C=O), 1279 (C–O);  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2,46 (*s*, 3 H), 4,48 (*s, br*,  $\underline{CH_2}$  diketo oblika), 6,71 (*s*, 1 H,  $\underline{CH}$  enolnog oblika), 7,35 (*t*, 1 H, preklopljen sa signalom na 7,31), 7,31 (*d*, 1 H), 7,48 (*t*,  $J = 7,30$  Hz, 1 H), 7,68 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 1 H);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 20,62, 51,78, 101,69, 126,32, 129,04, 131,83, 132,13, 135,86, 137,50, 163,35, 168,48, 194,81.

**4-(3-metilfenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (3):**  $C_{11}H_{10}O_4$ ,  $M_r = 206,19$ , čvrsta supstanca bele boje (0,82 g, 73%), t.t. = 98-99°C (iz EtOH), ESI-MS: Izračunato za  $C_{11}H_9O_4 [M-H]^-$  205,0501, izmereno 205,0508; IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3501 *br* (COO–H), 1683 (C=O), 1628 (C=O), 1257 (C–O);  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2,36 (*s*, 3 H), 4,53 (*s, br*,  $\underline{CH_2}$  diketo oblika), 7,06 (*s*, 1 H,  $\underline{CH}$  enolnog oblika), 7,41 (*t*,  $J = 7,99$  Hz, 1 H), 7,45 (*d*,  $J = 7,99$  Hz, 1 H), 7,79 (*d*,  $J = 7,99$  Hz, 1 H), 7,83 (*s*, 1 H);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 20,84, 53,13, 97,95, 125,15, 128,30, 129,08, 134,70, 134,78, 138,72, 163,30, 170,30, 190,70.

**4-(*n*-butilfenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (4):**  $C_{14}H_{16}O_4$ ,  $M_r = 248,27$ , čvrsta supstanca bele boje (4,82 g, 82 %), t.t. = 145-147°C; ESI-MS: Izračunato za  $C_{14}H_{17}O_4 [M+H]^+$  249,11214, izmereno 249,11134; IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3007 *br*, 1714, 1628, 1272;  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 0,93 (*t*,  $J = 7,30$  Hz, 3 H), 1,36 (*sx*,  $J = 7,30$ , 15,16 Hz, 2 H), 1,63 (*qn*,  $J = 7,86$  Hz, 2 H), 2,69 (*t*,  $J = 7,86$ , 15,16 Hz, 2 H), 3,94 (*s, br*,  $\underline{CH_2}$  diketo oblika), 7,15 (*s*, 1 H,  $\underline{CH}$  enolnog oblika), 7,31 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2 H), 7,92 (*d*,  $J = 7,86$  Hz, 2 H);  $^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 13,98, 22,42, 33,24, 35,93, 96,49, 128,29, 129,28, 131,36, 150,63, 163,65, 171,89, 188,82



**4-(2,4-di-metilfenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (5):**  $C_{12}H_{12}O_4$ ,  $M_r = 220,22$ , čvrsta supstanca svetlo žute boje (5,21 g, 78%), t.t. = 123-124°C (iz AcOEt/PhMe), ESI-MS: Izračunato za  $C_{12}H_{11}O_4 [M-H]^-$  219,0657, izmereno 219,0663; IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 2969 *br* (COO-H), 1710 (C=O), 1633 (C=O), 1271 (C-O);  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 2,38 (*s*, 3 H), 2,55 (*s*, 3 H), 6,96 (*s*,  $\underline{CH}$  enolnog oblika, 1 H), 7,11-7,15 (*m*, 2 H, preklopljeni *d* i *s* dva *m*-H atoma), 7,60 (*d*,  $J = 8,40$  Hz, 1 H);  $^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 21,44, 100,77, 126,86, 129,66, 131,75, 133,08, 139,16, 143,63, 164,70, 168,50, 194,17.

**4-(2,4,5-tri-metilfenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (6):**  $C_{13}H_{14}O_4$ ,  $M_r = 234,25$ , čvrsta supstanca svetlo žute boje (4,58 g, 68%), t.t. = 139-141°C (iz AcOEt/PhMe), ESI-MS: Izračunato za  $C_{13}H_{13}O_4 [M-H]^-$  233,0819, izmereno 233,0821; IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 2925 *br* (COO-H), 1709 (C=O), 1619 (C=O), 1275 (C-O);  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2,24 (*s*, 6 H), 2,43 (*s*, 3 H), 4,47 (*s*, *br*,  $\underline{CH_2}$  diketo oblika), 6,80 (*s*, 1 H,  $\underline{CH}$  enolnog oblika), 7,10 (*s*, 1 H), 7,52 (*s*, 1 H);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 18,65, 19,35, 20,52, 51,46, 101,23, 130,31, 132,81, 133,27, 134,29, 135,50, 141,66, 163,43, 167,80, 195,23. Dva tautomerna oblika su vidljiva u rastvoru, a signal na 51,46 ppm odgovara  $\underline{CH_2}$  delu diketo oblika.

**4-(2,3,5,6-tetra-metilfenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (7):**  $C_{14}H_{16}O_4$ ,  $M_r = 248,27$ , čvrsta supstanca bele boje (5,20 g, 78%), t.t. = 156-158°C, raspadanje, (iz AcOEt/PhMe), ESI-MS: Izračunato za  $C_{14}H_{15}O_4 [M-H]^-$  247,0976, izmereno 247,0976; IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 2962 *br* (COO-H), 1743 (C=O), 1599 (C=O), 1261 (C-O);  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2,04 (*s*, 6 H), 2,17 (*s*, 6 H), 6,21 (*s*, 1 H,  $\underline{CH}$  enolnog oblika), 7,02 (*s*, 1 H);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 15,98, 19,29, 103,77, 129,19, 132,00, 133,87, 138,70, 163,77, 169,17, 196,89.

**1-(5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-il)etanon:**  $C_{12}H_{14}O$ ,  $M_r = 174,24$ , bezbojna tečnost (3,2 g, 64%), t.k.=137-138°C/5 mmHg;  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1,80 (*qn*, *br*, 4 H), 2,55 (*s*, 3 H), 2,80 (*t*, *br*, 4 H), 7,12 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 1 H), 7,65 (*m*, 2 H, preklopljeni signali dva *orto*-H atoma);  $^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 22,86, 22,99, 26,56, 29,40, 29,65, 125,48, 129,28, 129,38, 134,76, 137,46, 143,24, 198,25.

**4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-il)-2,4-dioksobutanska kiselina (8):**  $C_{14}H_{14}O_4$ ,  $M_r = 246,26$ , čvrsta supstanca bele boje (0,84 g, 63%), t.t. = 173-175°C (iz AcOEt/PhMe), ESI-MS: Izračunato za  $C_{14}H_{15}O_4 [M+H]^+$  247,09649, izmereno 247,09632; IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3382 *br*, 1642, 1591, 1421;  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1,81 (*m*, 4 H), 2,82 (*m*, 4 H), 7,12 (*s*, 1 H), 7,17 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 1 H), 7,69 (*m*, 2 H, preklopljeni signali dva *orto*-H atoma);  $^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 22,74, 22,88, 29,40, 29,86, 96,83, 125,15, 129,01, 129,92, 131,25, 138,17, 145,05, 164,18, 171,04, 189,54.

**1-(2,4,6-tri-izo-propilfenil)etanon (5a):**  $C_{17}H_{26}O$ ,  $M_r = 246,39$ , čvrsta supstanca bele boje (3,12 g, 69 %), t.t. = 79-80°C (iz AcOEt/PhMe); ESI-MS: Izračunato za  $C_{17}H_{27}O [M+H]^+$  247,20564, izmereno 247,20631;  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 1,23-1,26 (*m*, preklopljeni dubleti, 18 H), 2,50 (*s*, 3 H), 2,73 (*hp*,  $J = 6,74$  Hz, 2 H), 2,89 (*hp*,  $J = 6,74$  Hz, 1 H), 7,01 (*s*, 2 H);  $^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 24,07, 24,47, 31,09, 34,06, 34,42, 121,17, 138,50, 143,25, 149,54, 209,59.

**4-(2,4,6-tri-izo-propilfenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (9):** C<sub>19</sub>H<sub>26</sub>O<sub>4</sub>, M<sub>r</sub> = 318,41, čvrsta supstanca bele boje (0,75 g, 56%), t.t. = 152-153°C (iz AcOEt/PhMe), ESI-MS: Izračunato za C<sub>19</sub>H<sub>27</sub>O<sub>4</sub> [M+H]<sup>+</sup> 319,19039, izmereno 319,19026; IC (ν, cm<sup>-1</sup>): 3024 *br*, 1712, 1626, 1277; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1,25 (preklopljeni *d*, 18 H), 2,88 (*hp*, 3 H), 3,91 (*s*, *br*, CH<sub>2</sub> diketo oblika), 6,56 (*s*), 6,65 (*s*, 1 H), 7,05 (dva preklopljena *s*, 2 H); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 24,01, 24,49, 31,10, 31,19, 34,56, 53,36, 103,17, 104,69, 121,27, 121,36, 132,12, 133,61, 145,03, 145,36, 150,91, 151,28, 162,74, 163,30, 168,58, 171,82, 196,64, 199,45. U rastvoru je prisutno više oblika.

**4-(2,4,6-tri-izo-propilfenil)-4-oksobutanska kiselina (2a):** C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>O<sub>3</sub>, M<sub>r</sub> = 304,42, čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 126-128°C (iz PhMe), ESI-MS: Izračunato za C<sub>19</sub>H<sub>29</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 305,21112, izmereno 305,21018; IC (ν, cm<sup>-1</sup>): 2989 *br*, 1688, 1224; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 1,23 (*d*, *J* = 4,6 Hz, 12 H), 1,27 (*d*, *J* = 4,7 Hz 6 H), 2,71 (*hp*, preklopljen, 2 H), 2,79 (*t*, *J* = 6,18, 12,92 Hz, 2 H), 2,90 (*hp*, preklopljen, 1 H), 3,05 (*t*, *J* = 6,74, 12,92 Hz, 2 H), 7,02 (*s*, 2 H); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 24,13, 24,48, 27,78, 30,98, 34,47, 40,89, 121,24, 137,20, 143,91, 149,89, 179,07, 208,79.

**4-((1,1'-bifenil)-4-il)-4-oksobutanska kiselina (3a):** C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>3</sub>, M<sub>r</sub> = 254,28, čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 157-159°C (iz PhMe); ESI-MS: nije snimljen usled male rastvorljivosti uzorka; IC (ν, cm<sup>-1</sup>): 3034 *br*, 1706, 1263; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2,60 (*t*, *J* = 6,18 Hz, 2 H), 3,28 (*t*, *J* = 6,18 Hz, 2 H), 7,46 (*m*, 1 H), 7,52 (*d*, *J* = 7,86 Hz, 2 H), 7,74 (*d*, *J* = 7,86 Hz, 2 H), 7,82 (*d*, *J* = 8,42 Hz, 2 H), 8,02 (*d*, *J* = 8,42 Hz, 2 H). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 27,91, 33,16, 125,21, 126,98, 127,06, 128,66, 129,18, 135,31, 138,97, 144,61, 173,95, 198,13.

**1-(4-metoksi-2,5-dimetilfenil)etanon:** C<sub>11</sub>H<sub>14</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 178,23, čvrsta supstanca bele boje (3,31 g, 93 %), t.t. = 77-78°C; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ (ppm): 2,20 (*s*, 3 H), 2,53 (*s*, 3 H), 2,56 (*s*, 3 H), 3,85 (*s*, 3 H), 6,64 (*s*, 1 H), 7,55 (*s*, 1 H).

**4-(4-metoksi-2,5-di-metilfenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (10):** C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>5</sub>, M<sub>r</sub> = 250,25, čvrsta supstanca svetlo žute boje (2,39 g, 85%), t.t. = 167-169°C, raspadanje (iz AcOEt/PhMe), ESI-MS: Izračunato za C<sub>13</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub> [M-H]<sup>-</sup> 249,07685, izmereno 249,07661; IC (ν, cm<sup>-1</sup>): 2948 *br*, 1713, 1621, 1277; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2,17 (*s*, 3 H), 2,53 (*s*, 3 H), 3,87 (*s*, 3 H), 4,46 (*s*, *br*, CH<sub>2</sub> diketo oblika), 6,86 (*s*, 1 H, CH enolnog oblika), 6,91 (*s*, 1 H), 7,63 (*s*, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 15,39, 21,79, 51,19, 55,68, 100,99, 113,91, 123,57, 126,88, 132,13, 139,58, 160,71, 163,55, 166,51, 194,83. Dva tautomerna oblika su vidljiva u rastvoru, a signal na 51,19 ppm odgovara CH<sub>2</sub> delu diketo oblika.

**1-(4-hidroksi-3,5-di-metilfenil)etanon:** C<sub>10</sub>H<sub>12</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 164,20, čvrsta supstanca bele boje (2,42 g, 81%), t.t. = 124-126°C, <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 2,24 (*s*, 6 H), 2,49 (*s*, 3 H), 7,60 (*s*, 2 H). Singlet na 4,88 ppm potiče od rastvarača; <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 16,55, 26,25, 125,24, 129,90, 130,72, 160,02, 200,06.

**4-(4-hidroksi-3,5-di-metilfenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (11):** C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>O<sub>5</sub>, M<sub>r</sub> = 236,22, čvrsta supstanca bele boje (0,89 g, 70%), t.t. = 191-193°C (iz EtOH), ESI-MS: Izračunato za C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>O<sub>5</sub> [M+H]<sup>+</sup> 237,07575, izmereno 237,07557; IC (ν, cm<sup>-1</sup>): 3315 *br*, 1692, 1634, 1261; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CD<sub>3</sub>OD) δ (ppm): 2,25 (*s*, 6 H), 7,02

(s, 1 H, CH enolnog oblika), 7,65 (s, 2 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm): 16,67, 98,53, 125,87, 127,46, 130,20, 160,87, 165,41, 169,08, 191,99

**1-(2,5-di-cikloheksilfenil)etanon (4a)**  $\text{C}_{20}\text{H}_{28}\text{O}$ ,  $M_r = 284,44$ , čvrsta supstanca bele boje (2,12 g, 75%), t.t. = 88-90°C, ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{O}$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  285,22129, izmereno 285,22061;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm): 1,43 (m, 12 H), 1,88 (m, 8 H), 2,54 (m, 1 H), 2,60 (s, 3 H), 3,02 (m, 1 H), 7,16 (d, br, 1 H), 7,30 (d, br, 1 H), 7,32 (s, 1 H).

**4-(2,5-di-cikloheksilfenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (12)**:  $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_4$ ,  $M_r = 356,46$ , čvrsta supstanca bele boje (1,30 g, 64%), t.t. = 146-148°C, raspadanje (iz AcOEt/PhMe), ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{22}\text{H}_{29}\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  357,20604, izmereno 357,20615, IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2976 br, 1722, 1630, 1264;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 1,29-1,34 (m, 2 H), 1,36-1,45 (m, 8 H), 1,75 (d br, 2 H), 1,78 (m, 8 H), 2,51 (m, 1 H), 3,00 (m, 1 H), 3,94 (s, diketo oblik), 6,83 (s, 1 H, enolni oblik), 7,31 (s, 1 H), 7,33 (s, 2 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 26,00, 26,13, 26,76, 26,83, 34,28, 34,68, 40,10, 43,92, 101,38, 127,09, 127,35, 130,75, 134,50, 144,99, 145,62, 163,57, 170,60, 195,05.

**4-(2,5-di-cikloheksilfenil)-4-oksobutanska kiselina (1a)**:  $\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_3$ ,  $M_r = 342,47$ , čvrsta supstanca bele boje (0,92g, 71%), t.t. = 122-124°C, raspadanje (iz PhMe); ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  343,22677, izmereno 343,22595; U rastvoru su vidljiva dva oblika u odnosu 8 prema 5.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,32 (m), 1,75 (m), 2,57 (m, 3 H), 2,93 (m, 1 H), 3,06 (t,  $J = 5,62, 12, 36$  Hz), 3,21 (t,  $J = 5,62, 12, 36$  Hz), 7,10 (d,  $J = 7,86$  Hz), 7,23 (s), 7,28 (s), 7,36 (d,  $J = 8,42$  Hz), 7,51 (d,  $J = 7,86$  Hz), 7,90 (d,  $J = 8,42$  Hz), 12,16 (s, br). U rastvoru su vidljiva dva oblika u odnosu 8 prema 5, što je zaključeno na osnovu odnosa signala protona aromatičnog jezgra. Pretpostavka je da su u pitanju dva konformera.

**4-(2-metoksifenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (13)**:  $\text{C}_{11}\text{H}_{12}\text{O}_4$ ,  $M_r = 208,21$ , čvrsta supstanca bele boje (2,54 g, 70%), t.t. = 129-131°C (iz EtOH), ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  223,06010, izmereno 223,06004; IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 2998 br, 1711, 1634, 1259  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 3,90 (s, 3 H), 4,35 (s, br,  $\text{CH}_2$  diketo oblika), 7,08 (t,  $J = 7,30, 15,16$  Hz, 1 H), 7,13 (s, 1 H, CH enolnog oblika), 7,20 (d,  $J = 7,86$  Hz, 1 H), 7,59 (dt,  $J = 7,30, 15,72$  Hz, 1,68 Hz, 1 H), 7,78 (dd,  $J = 7,86, 1,68$  Hz, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 53,87, 56,06, 102,76, 112,79, 120,88, 124,12, 130,13, 135,18, 158,91, 163,53, 170,14, 189,72. Dva tautomerna oblika su vidljiva u rastvoru, a signal na 53,87 ppm odgovara CH<sub>2</sub> delu diketo oblika.

**4-(3-metoksifenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (14)**:  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_5$ ,  $M_r = 222,19$ , čvrsta supstanca bele boje (2,64 g, 67%), t.t. = 139-140°C (iz EtOH), ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{O}_5$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  223,06010, izmereno 223,06025; IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3256 br, 1687, 1626, 1258;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 3,83 (s, 3 H), 4,54 (s, br,  $\text{CH}_2$  diketo oblika), 7,03 (s, 1 H, CH enolnog oblika), 7,24 (dd,  $J_{1,3} = 7,86$  Hz,  $J_{1,2} = 2,25$  Hz, 1 H), 7,46 (t,  $J = 7,86$  Hz, 1 H), 7,48 (s, 1 H, preklopljen sa t na 7,46 ppm), 7,62 (d,  $J = 7,86$  Hz, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 53,14, 55,47, 98,15, 112,15, 120,14, 120,42, 130,35, 136,29, 159,74, 163,34, 170,78, 189,88. Dva tautomerna oblika su vidljiva u rastvoru, a signal na 53,14 ppm odgovara CH<sub>2</sub> delu diketo oblika.

**1-(3-bromfenil)etanon:**  $C_8H_7BrO$ ,  $M_r = 199,04$ , bezbojna tečnost (2,91 g, 82%), t.k. = 108-109°C/5 mmHg;  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 2,58 (*s*, 3 H), 7,33 (*t*,  $J = 7,86$  Hz, 1 H), 7,67 (*ddd*,  $J = 7,86, 2,25, 1,12$  Hz, 1 H), 7,86 (*dt*,  $J = 7,86, 1,68$  Hz, 1 H), 8,06 (*t*,  $J = 1,68$  Hz, 1 H);  $^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 26,72, 123,03, 126,96, 130,31, 131,44, 136,06, 138,82, 196,80.

**4-(3-bromfenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (15):**  $C_{10}H_7BrO_4$ ,  $M_r = 271,06$ , čvrsta supstanca bele boje (3,35 g, 68%), t.t. = 143-144°C (iz EtOH/PhMe), ESI-MS: Izračunato za  $C_{10}H_6BrO_4 [M-H]^-$  268,94549, izmereno 268,94531; IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3524, 1628, 1301, 1237;  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 4,57 (*s, br*,  $\underline{CH_2}$  diketo oblika), 7,08 (*s*, 1 H,  $\underline{CH}$  enolnog oblika), 7,49 (*t*,  $J = 7,86$  Hz, 1 H), 7,85 (*dd*,  $J_{1,2} = 7,86$  Hz,  $J_{1,3} = 2,25$  Hz, 1 H), 8,03 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 1 H), 8,14 (*s*, 1 H);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 49,24, 97,64, 122,56, 127,02, 130,31, 131,33, 136,54, 136,97, 163,18, 170,43, 188,79. Dva tautomerna oblika su vidljiva u rastvoru, a signal na 49,24 ppm odgovara  $\underline{CH_2}$  delu diketo oblika.

**4-(3-trifluormetifenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (16):**  $C_{11}H_7F_3O_4$ ,  $M_r = 260,17$ , čvrsta supstanca bele boje (0,62 g, 61%), t.t. = 135-137°C (iz AcOEt/PhMe), ESI-MS: Izračunato za  $C_{11}H_8F_3O_4 [M+H]^+$  261,03692, izmereno 261,03730; IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3439 *br*, 1673, 1622, 1228;  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,10 (*s*, 1 H,  $\underline{CH}$  enolnog oblika), 7,20 (*s*, 1 H, signal  $\underline{CH}$  drugog enolnog oblika), 7,67 (*dt*,  $J = 7,86$  Hz, 1 H), 7,87 (*dd*,  $J = 7,86$  Hz, 1 H), 8,24 (*s br*, 1 H), 8,18 (*d*,  $J = 7,86$  Hz, 1 H);  $^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 96,07, 98,13, 124,83, 124,91, 129,79, 129,91, 130,25, 130,32, 130,54, 130,61, 131,10, 134,30, 135,72, 161,91, 162,53, 170,39, 174,75, 185,76, 189,11. Dva oblika (najverovatnije dva enola) su prisutna u rastvoru.

**1-(4-(pirolidin-1-il)fenil)etanon:**  $C_{12}H_{15}NO$ ,  $M_r = 189,25$ , čvrsta supstanca žute boje (1,37 g, 88%), t.t. = 85-87°C, raspadanje (iz EtOH);  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 2,02 (*qn*,  $J = 6,16, 12,92$  Hz, 4 H), 2,49 (*s*, 3 H), 3,34 (*t*,  $J = 6,16, 12,92$  Hz, 4 H), 6,49 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2 H), 7,84 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2 H);  $^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 25,49, 26,01, 47,59, 110,70, 124,91, 130,78, 151,06, 196,47.

**4-(4-(pirolidin-1-il)fenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (17):**  $C_{14}H_{15}NO_4$ ,  $M_r = 261,27$ , čvrsta supstanca crvene boje, t.t. = 160-162°C (iz EtOH/PhMe), ESI-MS: Izračunato za  $C_{14}H_{16}NO_4 [M+H]^+$  262,10738, izmereno 262,10630; IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3155 *br*, 1716, 1599, 1272;  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ /DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2,06 (*qn*,  $J = 6,18$  Hz, 4 H), 3,40 (*t*,  $J = 6,18$  Hz, 4 H), 6,56 (*d*,  $J = 8,99$  Hz, 2 H), 7,02 (*s*, 1 H), 7,89 (*d*,  $J = 8,99$  Hz, 2 H);  $^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ /DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 25,22, 47,54, 97,54, 111,25, 121,39, 130,52, 151,84, 164,61, 165,96, 189,61.

**1-(4-morfolin-1-il)fenil)etanon,**  $C_{12}H_{15}NO_2$ ,  $M_r = 205,25$ , t.t. = 89-90°C (iz EtOH),  $^1H$  NMR (200 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 2,51 (*s*, 3 H), 3,29 (*t*,  $J = 5,05, 9,55$  Hz, 4 H), 3,84 (*t*,  $J = 5,05, 9,55$  Hz, 4 H), 6,85 (*d*,  $J = 8,99$  Hz, 2 H), 7,88 (*d*,  $J = 8,99$  Hz, 2 H);  $^{13}C$  NMR (50 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  (ppm): 26,25, 47,55, 66,63, 113,34, 128,18, 130,44, 154,33, 196,70.

**4-(4-morfolin-1-il)fenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (18):**  $C_{14}H_{15}NO_5$ ,  $M_r = 277,27$ , čvrsta supstanca svetlo narandžaste boje, t.t. = 164-165°C (iz EtOH/PhMe), ESI-MS: Izračunato za  $C_{14}H_{16}NO_5 [M+H]^+$  278,10230, izmereno 278,10188. IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ):

3320 *br*, 1713, 1604, 1268;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{D}_2\text{O}$ )  $\delta$  (ppm): 3,35 (*t*,  $J = 5,05$  Hz, 4 H), 3,85 (*t*,  $J = 5,05$  Hz, 4 H), 6,88 (*d*,  $J = 8,99$  Hz, 2 H), 7,01 (*s*, 1 H), 7,93 (*d*,  $J = 8,99$  Hz, 2 H), 15,64 (*sb*, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 47,21, 66,57, 97,90, 113,39, 124,96, 130,37, 154,96, 162,75, 163,35, 167,19, 190,04.

**4-(4-(1*H*-imidazol-1-il)fenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (19):**  $\text{C}_{13}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$ ,  $M_r = 258,23$ , čvrsta supstanca svetlo žute boje, t.t. = 184-186°C (iz AcOEt/PhMe), ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{13}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  259,07133, izmereno 259,07215; IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3452 *br*, 1710, 1608, 1277;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 7,10 (*s*, 1 H), 7,27 (*m*, 1 H), 7,38 (*m*, 1 H), 7,56 (*d*,  $J = 8,99$  Hz, 2 H), 7,99 (*s*, 1 H), 8,14 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 98,07, 117,76, 121,06, 130,09, 131,43, 133,68, 135,49, 141,40, 162,66, 169,81, 189,18.

**1-(4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)etanon:**  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}$ ,  $M_r = 218,29$ , čvrsta supstanca svetlo žute boje, t.t. = 84-86°C (iz EtOH);  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 2,34 (*s*, 3 H), 2,52 (*s*, 3 H), 2,55 (*t*, 3 H, preklopljen), 3,37 (*t*,  $J =$ , 2 H), 6,86 (*d*,  $J =$ , 2 H), 7,88 (*d*,  $J =$ , 2 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  (ppm): 26,00, 45,98, 47,10, 54,57, 113,29, 127,45, 130,29, 154,04, 196,49.

**4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (20):**  $\text{C}_{15}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_4$ ,  $M_r = 290,31$ , čvrsta supstanca svetlo žute boje, t.t. = 162-163°C (iz EtOH/PhMe); ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{15}\text{H}_{19}\text{N}_2\text{O}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  291,13393, izmereno 291,13474. IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3420 (*br*), 1645, 1599, 1247;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2,78 (*s*, 3 H), 3,33 (*m*, širok, preklopljen sa signalom vode iz rastvarača), 4,44 (*s*, diketo oblik), 7,03 (*s*, 1 H, enolni oblik), 7,10 (*d*,  $J = 9,0$  Hz, 2 H), 7,98 (*d*,  $J = 9,0$  Hz, 2 H), 11,42 (*s* širok, 1 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{DMSO}-d_6$ )  $\delta$  (ppm): 40,77, 41,86, 43,66, 51,62, 97,43, 114,03, 124,35, 130,27, 153,44, 163,53, 168,20, 189,64.

**4-(4-(dimetilamino)fenil)-2,4-dioksobutanska kiselina (21):**  $\text{C}_{12}\text{H}_{13}\text{NO}_4$ ,  $M_r = 235,24$ , čvrsta supstanca svetlo crvene boje, t.t. = 155-157°C (iz EtOH/PhMe); ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{NO}_4$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  236,09173, izmereno 236,09185. IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3382 *br*, 1719, 1602, 1274,  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm): 3,10 (*s*, 6 H), 6,78 (*d*,  $J = 8,99$  Hz, 2 H), 7,01 (*s*, 1 H), 7,91 (*d*,  $J = 8,99$  Hz, 2 H);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ )  $\delta$  (ppm): 40,10, 98,19, 112,26, 123,02, 131,44, 155,98, 165,72, 168,36, 191,03.

#### 4.1.3. Tipična eksperimentalna procedura za sintezu aril-pirazol karboksilnih kiselina

U balon od 50 ml sa okruglim dnom stavi se 0,002 mola odgovarajuće arildiketo kiseline i rastvori na sobnoj temperaturi u 20 ml glacijalne sirćetne kiseline. U rastvor se uz mešanje polako ukapava 3 molska ekvivalenta hidrazin monohidrata ( $\text{N}_2\text{H}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ ). Boja rastvora se ubrzo nakon dodatka prve količine hidrazina promenila iz bezbojne u svetlo žutu. Završetak reakcije prati se pomoću tankoslojne hromatografije. Nakon 4 časa, reakciona smeša se izlije u 50 ml vode i ostavi da se meša preko noći. Beli talog

se filtracijom odvoji od rastvora, ispere vodom, osuši na vazduhu i prekrystalise iz smeše heksan/etanol.

#### 4.1.3.1. Karakterizacija aril-pirazol karboksilnih kiselina

**5-(4-metilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (25):** Polazeći od 0,40 g 4-(4-metilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,34 g proizvoda (87% teorijskog prinosa);  $C_{11}H_{10}N_2O_2$ ,  $M_r = 202,21$ . Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 253-254°C; ESI-MS: Izračunato za  $C_{11}H_{11}N_2O_2$   $[M+H]^+$  203,08150, izmereno 203,08063; IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3264 (N-H), 1696 (C=O), 1500, 1198;  $^1H$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 2,31 (*s*, 3 H), 7,14 (*s*, 1 H), 7,23 (*d*,  $J = 7,83$  Hz, 2 H), 7,72 (*d*,  $J = 8,31$  Hz, 2 H), 13,43 (*s*, *br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal);  $^{13}C$  NMR (125 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 20,91, 104,99, 125,32, 128,17, 129,58, 137,68, 140,31, 147,56, 162,16.

**5-(4-etilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (26):** Polazeći od 0,62 g 4-(4-etilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,55 g proizvoda (89% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 229-230°C;  $C_{12}H_{12}N_2O_2$ ,  $M_r = 216,24$ ; ESI-MS: Izračunato za  $C_{12}H_{13}N_2O_2$   $[M+H]^+$  217,09715, izmereno 217,09634; IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3265 (N-H), 1692 (C=O), 1498, 1237;  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,17 (*t*,  $J = 7,30$  Hz, 3 H), 2,60 (*q*,  $J = 7,30$  Hz, 2 H), 7,14 (*s*, 1 H) 7,26 (*d*,  $J = 7,86$  Hz, 2 H), 7,74 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2 H), 13,24 (*s*, *br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 15,55, 28,00, 104,98, 125,40, 128,37, 140,23, 143,98, 147,48, 162,13.

**5-(4-izo-propilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (27):** Polazeći od 0,095 g 4-(4-izo-propilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,078 proizvoda (83% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 241-243°C;  $C_{13}H_{14}N_2O_2$ ,  $M_r = 230,26$ ; ESI-MS: Izračunato za  $C_{13}H_{15}N_2O_2$   $[M+H]^+$  231,11280, izmereno 231,11197; IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3229 (N-H), 1691 (C=O), 1499, 1194;  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,20 (*d*,  $J = 6,74$  Hz, 6 H) 2,90 (*h*,  $J = 6,74$  Hz, 1 H) 7,12 (*s*, 1 H) 7,30 (*d*,  $J = 7,86$  Hz, 2 H) 7,74 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2 H) 13,27 (*s*, *br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 23,79, 33,24, 104,91, 122,94, 125,38, 126,85, 128,57, 148,50, 162,09

**5-(4-*n*-butilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (28):** Polazeći od 0,52 g 4-(4-*n*-butilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,44 g proizvoda (85% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 203-205°C, raspadanje;  $C_{14}H_{16}N_2O_2$ ,  $M_r = 244,29$ ; ESI-MS: Izračunato za  $C_{14}H_{17}N_2O_2$   $[M+H]^+$  245,12845, izmereno 245,12744; IC ( $\nu$ ,  $cm^{-1}$ ): 3320 (N-H), 1665 (C=O), 1455, 1265;  $^1H$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 0,85 (*t*,  $J = 7,30$  Hz, 3 H), 1,28 (*sx*,  $J_{1,2} = 7,30$  Hz, 2 H), 1,52 (*qn*,  $J = 7,30$  Hz, 2 H), 2,55 (*t*,  $J = 7,30$  Hz, 2 H), 7,14 (*s*, 1 H), 7,22 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2 H), 7,73 (*d*,  $J = 7,86$  Hz, 2 H), 13,07 (*s*, *br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal);  $^{13}C$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 13,83, 21,82, 33,10, 34,67, 104,98, 125,35, 128,59, 128,89, 140,21, 142,56, 147,57, 162,16.

**5-(4-*tert*-butilfenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilna kiselina (29):** Polazeći od 0,62 g 4-(4-*tert*-butilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,48 g proizvoda (79% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 257-259°C, raspadanje; C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 244,29; IC (ν, cm<sup>-1</sup>): 3315 (N–H), 3145, 1723 (C=O), 1584, 1210; ESI-MS: Izračunato za C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 245,12845, izmereno 245,12888; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 1,27 (*s*, 9 H), 7,08 (*s*, 1 H), 7,42 (*d*, *J* = 7,86 Hz, 2 H), 7,75 (*d*, *J* = 7,86 Hz, 2 H), 8,55 (*s, br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 31,10, 34,37, 104,49, 125,09, 125,63, 128,99, 141,09, 148,03, 150,45, 162,59.

**5-(2,4-di-metilfenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilna kiselina (30):** Polazeći od 0,58 g 4-(2,4-di-metilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,49 g proizvoda (86% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 248-249°C; C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 216,24; ESI-MS: Izračunato za C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 217,09715, izmereno 217,09704; IC (ν, cm<sup>-1</sup>): 3099 (N–H, preklopljeno sa C–H), 2975, 2917, 1695 (C=O), 1494, 1423, 1279; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2,28 (*s*, 3 H), 2,35 (*s*, 3 H), 6,88 (*s*, 1 H), 7,05 – 7,10 (*m*, 3 H; preklopljen *orto*-H dublet sa *meta*-H signalima (dublet i podeljeni singlet)), 7,39 (*d*, *J* = 7,86 Hz, 4 H), 13,20 (*s, br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 20,74, 107,82, 126,75, 127,59, 128,89, 131,60, 135,55, 137,69, 140,43, 146,72, 162,69.

**5-(3,4-di-metilfenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilna kiselina (31):** Polazeći od 0,38 g 4-(3,4-di-metilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,33 g proizvoda (88% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 276-277°C; C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 216,24; ESI-MS: Izračunato za C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 217,09715, izmereno 217,09685; IC (ν, cm<sup>-1</sup>): 3107 (N–H, C–H), 2917, 1697 (C=O), 1508, 1469, 1270; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2,21 (*s*, 3 H), 2,25 (*s*, 3 H), 7,12 (*s*, 1 H), 7,17 (*d*, *J* = 7,86 Hz, 1 H), 7,54 (*d*, *J* = 7,86 Hz, 1 H), 7,62 (*s*, 1 H), 13,34 (*s, br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 19,25, 19,52, 104,89, 122,79, 126,49, 128,39, 130,04, 136,45, 136,82, 140,29, 147,41, 162,25.

**5-(2,4,5-tri-metilfenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilna kiselina (32):** Polazeći od 0,35 g 4-(2,4,5-tri-metilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,28 g proizvoda (81% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 227-228°C; C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 230,26; ESI-MS: Izračunato za C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 231,11280, izmereno 231,11234; IC (ν, cm<sup>-1</sup>): 3163, 3109 (N–H, preklopljene sa C–H), 1696 (C=O), 1514, 1277; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2,20 (*s*, 6 H), 2,31 (*s*, 3 H), 6,85 (*s*, 1 H), 7,05 (*s*, 1 H), 7,28 (*s*, 1 H), 13,31 (*s, br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 18,85, 19,01, 20,20, 107,68, 127,61, 129,93, 132,13, 132,54, 133,70, 136,37, 140,50, 146,36, 162,54.

**5-(2,3,5,6-tetra-metilfenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilna kiselina (33):** Polazeći od 0,37 g 4-(2,3,5,6-tetra-metilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,33 g proizvoda (91% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 246-248°C, raspadanje; C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 244,29; ESI-MS: Izračunato za C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup> 245,12845, izmereno 245,12844; IC (ν, cm<sup>-1</sup>): 3244 (N–H), 3123, 2927, 1718 (C=O),

1471, 1410, 1242;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,87 (*s*, 6 H), 2,16 (*s*, 6 H), 6,50 (*s*, 1 H), 6,94 (*s*, 1 H), 8,71 (*s*, *br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 16,53, 19,66, 107,95, 130,18, 131,61, 133,08, 133,27, 142,25, 144,38, 163,51.

**5-(2,4,6-tri-etilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (34):** Polazeći od 0,41 g 4-(2,4,6-tri-etilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,33 g proizvoda (82% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 221-224°C, raspadanje;  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ ,  $M_r = 272,34$ ; ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  273,15975, izmereno 273,15938; IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3145 (N-H), 2967, 1712 (C=O), 1460, 1263;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 0,98 (*t*,  $J = 7,30$  Hz, 6 H), 1,19 (*t*,  $J = 7,30$  Hz, 4 H), 2,30 (*q*,  $J_{1,2} = 7,30$  Hz, 4 H), 2,60 (*q*,  $J = 7,30$  Hz, 2 H), 6,64 (*s*, 1 H), 7,00 (*s*, 2 H), 13,11 (*s*, *br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 15,70, 15,81, 26,43, 28,18, 108,58, 125,36, 126,65, 141,71, 143,20, 144,76, 163,03.

**5-(2,4-di-izo-propilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (35):** Polazeći od 0,35 g 4-(2,4-di-izo-propilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,28 g proizvoda (79% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 213-216°C, raspadanje;  $\text{C}_{16}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2$ ,  $M_r = 272,34$ ; ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  273,15975, izmereno 273,15940; IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3232 (N-H), 2962, 1704 (C=O), 1465, 1273;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,16 (*d*,  $J = 6,74$  Hz, 6 H), 1,22 (*d*,  $J = 6,74$  Hz, 6 H), 2,91 (*hp*,  $J = 6,74$  Hz, 1 H), 3,20 (*hp*,  $J = 6,74$  Hz, 1 H), 6,75 (*s*, 1 H), 7,13 (*d*,  $J = 7,86$  Hz, 1 H), 7,25 (*d*,  $J = 7,86$  Hz, 1 H), preklapljen sa 7,28 (*s*, 1 H), 13,26 (*s*, *br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 23,94, 23,97, 29,08, 33,55, 108,01, 123,53, 123,75, 127,28, 129,96, 146,78, 149,23, 162,49. Dva signala sa pirazolskog prstena ( $\text{C}_\alpha$  i  $\text{C}_\gamma$  u odnosu na COOH grupu) se ne vide, usled manje osetljivosti.

**5-(2,4,6-tri-izo-propilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (36):** Polazeći od 0,32 g 4-(2,4,6-tri-izo-propilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,21 g proizvoda (66% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca žute boje, t.t. = 217-219°C, raspadanje;  $\text{C}_{19}\text{H}_{26}\text{N}_2\text{O}_2$ ,  $M_r = 314,42$ ; ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  315,20670, izmereno 315,20693; IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3154 (N-H, C-H), 2961, 1700 (C=O), 1567, 1461;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,05 (*d*,  $J = 6,74$  Hz, 12 H), 1,20 (*d*,  $J = 6,74$  Hz, 6 H), 2,46 (*hp*,  $J = 6,74$  Hz, 1 H, preklapljen sa signalom DMSO- $d_6$ ), 2,89 (*hp*,  $J = 6,74$  Hz, 1 H), 6,61 (*s*, 1 H), 7,06 (*s*, 2 H), 13,09 (*s*, *br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 23,98, 30,20, 33,83, 108,83, 120,40, 125,49, 148,16, 149,63, 163,13. Dva signala sa pirazolskog prstena ( $\text{C}_\alpha$  i  $\text{C}_\gamma$  u odnosu na COOH grupu) se ne vide, usled manje osetljivosti.

**5-(5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-il)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (37):** Polazeći od 0,51 g 4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-il)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,41 g proizvoda (82 % teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 234-236°C, raspadanje;  $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2$ ,  $M_r = 242,27$ ; ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  243,11280, izmereno 243,11257; IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3104 (N-H, *br*), 2925, 1697 (C=O),



1430, 1270;  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,72 (*q, br*, 4 H), 2,70 (*m*, 2 H), 2,74 (*m*, 2 H), 7,09 (*s*, 1 H,  $\text{C}_\beta$  pirazolskog prstena, preklopljen sa signalom na 7,08 (*d*, 1 H koji potiče od *m*-H atoma), 7,52 (*s*, 1 H, preklopljen sa signalom na 7,51 (*d*, 1 H; oba signala potiču od *o*-H atoma)), 13,32 (*s, br*, 2 H,  $\text{COOH}$  i  $\text{NH}$  su stopljeni u jedan signal);  $^{13}\text{C}$  NMR (126 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 22,71, 28,63, 28,87, 104,77, 122,54, 125,75, 127,97, 129,42, 136,82, 137,11, 140,43, 147,35, 162,12.

**5-(naftalen-2-il)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (38):** Polazeći od 0,58 g 4-(naftalen-2-il)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,49 g proizvoda (82% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 274-276°C, raspadanje;  $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_2$ ,  $M_r = 238,24$ ; ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{14}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  239,08150, izmereno 239,08065; IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3206 (N-H), 1683 (C=O), 1501, 1274;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 7,23 (*s*, 1 H), 7,50 (*t*,  $J_{1,2} = 3,93$  Hz, 2 H), 7,90 (*d*, 1 H, preklopljen sa dubletom na 7,95), 7,95 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2 H), 8,04 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 1 H), 8,39 (*s*, 1 H), Signali od  $\text{COOH}$  i pirazolskog  $\text{NH}$  nisu uočljivi;  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 104,57, 123,61, 123,79, 126,03, 126,51, 127,72, 128,11, 128,33, 130,20, 132,57, 133,30, 141,68, 149,00, 162,85.

**5-((1,1'-bifenil)-4-il)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (39):** Polazeći od 0,50 g 4-((1,1'-bifenil)-2-il)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,42 g proizvoda (85% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 286-287°C, raspadanje;  $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_2$ ,  $M_r = 264,28$ ; ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{16}\text{H}_{13}\text{N}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  265,09715, izmereno 265,09653; IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3220 (N-H), 1657 (C=O), 1451, 1275;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 7,27 (*s*, 1 H), 7,35 (*t*,  $J = 7,30$  Hz, 1 H), 7,46 (*t*,  $J = 7,86$  Hz, 2 H), 7,69 (*d*, 2 H, preklopljen sa *d* na 7,74), 7,74 (*d*,  $J = 7,86$  Hz, 2 H), 7,95 (*d*,  $J = 7,86$  Hz, 2 H), 13,42 (*s, br*, 2 H,  $\text{COOH}$  i  $\text{NH}$  su stopljeni u jedan signal);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 105,46, 125,92, 126,64, 127,19, 127,70, 129,08, 130,20, 139,61, 139,79, 147,46, 161,93.

**5-(4-(pirolidin-1-il)fenil)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (40):** Polazeći od 0,20 g 4-(4-(pirolidin-1-il)fenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,16 g proizvoda (81% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca svetlo crvene boje, t.t. = 276-279°C, raspadanje;  $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ ,  $M_r = 257,29$ ; ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  258,12370, izmereno 258,12359; IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3207 (N-H), 2963, 1711 (C=O), 1616, 1515, 1189.  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 1,93 (*t, br*, 2 H), 3,23 (*t, br*, 2 H), 6,55 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2 H), 6,89 (*s*, 1 H), 7,61 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2 H), 8,98 (*br*);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 24,99, 47,28, 102,86, 111,71, 118,10, 126,26, 141,90, 147,47, 147,75, 163,04.

**5-(4-fluorfenil)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (41):** Polazeći od 0,58 g 4-(4-fluorfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,37 g proizvoda (65% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 227-228°C;  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{FN}_2\text{O}_2$ ,  $M_r = 206,17$ ; ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{FN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  207,05643, izmereno 207,05643; IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3334 (N-H), 3091, 1659 (C=O), 1453, 1240;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 7,20 (*s*, 1 H), 7,26 (*t*,  $^3J_{\text{HH}} = 8,42$  Hz,  $^3J_{\text{HF}} = 8,99$  Hz, 2 H), 7,88 (*dd*,  $^3J_{\text{HH}} = 8,42$  Hz,  $^4J_{\text{HF}} = 5,05$  Hz, 2 H) 13,33 (*s, br*, 2 H,

COOH i NH su stopljeni u jedan signal);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 105,37, 115,65, 116,08, 127,37, 127,53, 128,01, 139,46, 147,54, 159,64, 161,72, 164,51.

**5-(4-hlorfenil)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (42):** Polazeći od 0,27 g 4-(4-hlorfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,23 g proizvoda (87% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 256-257°C;  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{ClN}_2\text{O}_2$ ,  $M_r = 222,63$ ; ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{ClN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  223,02688, izmereno 223,02694; IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3188 (N–H), 1679 (C=O), 1488, 1271;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 7,24 (*s*, 1 H), 7,48 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2 H) 7,86 (*d*,  $J = 8,99$  Hz, 2 H), Signali od COOH i pirazolskog NH nisu uočljivi;  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 105,67, 127,10, 128,98, 130,43, 132,69, 139,08, 147,45, 161,72.

**5-(3-bromfenil)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (43):** Polazeći od 0,57 g 4-(3-bromfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,45 g proizvoda (80% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 249-251°C;  $\text{C}_{10}\text{H}_7\text{BrN}_2\text{O}_2$ ,  $M_r = 267,08$ ; ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{BrN}_2\text{O}_2$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  266,97637, izmereno 266,97587; IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3246 (N–H), 1694 (C=O), 1462, 1304;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 7,31 (*s*, 1 H), 7,38 (*t*,  $J = 7,30$  Hz, 1 H), 7,52 (*d*,  $J = 7,30$  Hz, 1 H), 7,86 (*d*,  $J = 7,86$  Hz, 1 H), 8,06 (*s*, 1 H), 13,43 (*s, br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 106,03, 122,42, 124,38, 125,37, 127,80, 129,00, 130,83, 131,14, 161,50.

**5-(4-hidroksifenil)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (44):** Polazeći od 0,46 g 4-(4-hidroksifenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,39 g proizvoda (87% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 282-283°C, raspadanje;  $\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $M_r = 204,18$ ; ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{10}\text{H}_9\text{N}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  205,06077, izmereno 205,05983; IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3290 (N–H), 1679 (C=O), 1616, 1514, 1265;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 6,82 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2 H), 7,01 (*s*, 1 H), 7,64 (*d*,  $J = 8,42$  Hz, 2 H), 9,89 (*s, br*, 1 H), 12,84 (*s, br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 104,12, 115,75, 121,80, 126,88, 140,83, 147,31, 157,71, 162,43.

**5-(2-metoksifenil)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (45):** Polazeći od 0,40 g 4-(2-metoksifenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,29 g proizvoda (74% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 234-235°C;  $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$ ,  $M_r = 218,21$ ; ESI-MS: Izračunato za  $\text{C}_{11}\text{H}_{11}\text{N}_2\text{O}_3$   $[\text{M}+\text{H}]^+$  219,07642, izmereno 219,07644; IC ( $\nu$ ,  $\text{cm}^{-1}$ ): 3270, (N–H), 1708 (C=O), 1470, 1179;  $^1\text{H}$  NMR (200 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 3,89 (*s*, 3 H), 7,02 (*t*,  $J = 7,30$  Hz, 1 H) 7,11 (*d*, 1 H, preklapljen sa *s* na 7,15), 7,15 (*s*, 1 H), 7,35 (*t*,  $J = 8,42$ , 1 H), 7,81 (*dd*,  $J_{1,2} = 7,86$  Hz,  $J_{1,3} = 1,68$  Hz, 1 H), 13,25 (*s, br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal);  $^{13}\text{C}$  NMR (50 MHz, DMSO- $d_6$ )  $\delta$  (ppm): 55,56, 108,00, 111,98, 118,58, 120,97, 127,78, 129,71, 141,00, 142,69, 155,98, 162,77.

**5-(3-metoksifenil)-1H-pirazol-3-karboksilna kiselina (46):** Polazeći od 0,44 g 4-(3-metoksifenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,24 g proizvoda (62%

teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 231-232°C, C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, M<sub>r</sub> = 218,21; ESI-MS: Izračunato za C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 219,07642, izmereno 219,07626; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3,81 (*s*, 3 H), 6,91 (pocepani *d*, 1 H), 7,22 (*s*, 1 H), 7,34 (*t*, *J* = 8,0 Hz, 1 H), 7,41 (*m*, 2 H, preklapljeni *s* i *d* od *orto* H atoma), 13,44 (*s*, *br*, 2 H, COOH i NH su stopljeni u jedan signal).

**5-(4-metoksifenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilna kiselina (47):** Polazeći od 0,50 g 4-(4-metoksifenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,45 g proizvoda (92% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 226-228°C, raspadanje; C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, M<sub>r</sub> = 218,21; ESI-MS: Izračunato za C<sub>11</sub>H<sub>11</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 219,07642, izmereno 219,07540; IC (ν, cm<sup>-1</sup>): 3309, 3249 (N–H), 1679 (C=O), 1456, 1206; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3,77 (*s*, 3 H), 6,99 (*d*, *J* = 8,99 Hz, 2 H), 7,09 (*s*, 1 H), 7,76 (*d*, *J* = 8,42 Hz, 2 H), 13,02 (*br*); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 55,45, 104,75, 114,60, 123,70, 127,00, 140,62, 147,45, 159,57, 162,43.

**5-(4-metoksi-2,5-di-metilfenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilna kiselina (48):** Polazeći od 0,62 g 4-(4-metoksi-2,5-di-metilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline, dobijeno je 0,54 g proizvoda (89% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca svetlo-žute boje, t.t. = 232-234°C, raspadanje; C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, M<sub>r</sub> = 246,26; ESI-MS: Izračunato za C<sub>13</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup> 247,10772, izmereno 247,10769; IC (ν, cm<sup>-1</sup>): 3304, 3164 (N–H), 1695 (C=O), 1510, 1430, 1238; <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 2,14 (*s*, 3 H), 2,36 (*s*, 3 H), 3,81 (*s*, 3 H), 6,81 (*s*, 1 H), 6,87 (*s*, 1 H), 7,27 (*s*, 1 H), 13,08 (*br*); <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 15,59, 20,77, 55,35, 107,48, 112,70, 122,01, 123,07, 130,97, 134,45, 140,62, 145,97, 157,22, 162,64.

**5-(4-fluorfenil)-1-metil-1*H*-pirazol-3-karboksilna kiselina (49):** Polazeći od 0,40 g 4-(4-fluorfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,12 g proizvoda (30% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 142-143°C, C<sub>11</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 220,20 g/mol; ESI-MS: Izračunato za C<sub>11</sub>H<sub>10</sub>FN<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 221,07208, izmereno: 221,07209; IC (ν, cm<sup>-1</sup>): 3368 *br*, 3106, 1665 (C=O), 1447, 1251; Smesa 2 tautomera; (tautomer **I** (5-(4-fluorfenil)-1-metil-1*H*-pirazol-3-karboksilna kiselina): tautomer **II** (3-(4-fluorfenil)-1-metil-1*H*-pirazol-5-karboksilna kiselina) = 7 : 2). Tautomer **I**: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 3,89 (*s*, 3 H), 6,83 (*s*, 1 H), 7,35 (*t*, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub>=8,93 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>HF</sub>=2,06 Hz, 2 H), 7,63 (*dd*, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub>=8,93 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>HF</sub>=2,29 Hz, 2 H), 12,5-13,3 (*sb*, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 38,21, 108,49, 115,75, 115,93, 125,75, 130,96, 131,03, 142,30, 143,30, 161,36, 163,05; Tautomer **II**: <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 4,12 (*s*, 3 H), 7,23 (*t*, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub>=8,93 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>HF</sub>=2,06 Hz, 2H), 7,28 (*s*, 1 H), 7,87 (*dd*, <sup>3</sup>*J*<sub>HH</sub>= 8,93 Hz, <sup>4</sup>*J*<sub>HF</sub>=2,29 Hz, 2H), 12,5-13,3 (*sb*, 1H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>) δ (ppm): 107,68, 115,52, 115,69, 127,10, 127,16, 128,90, 134,64, 147,65, 160,61, 163,32, CH<sub>3</sub> signal je podvučen pod signal rastvarača.

**5-(3-metoksifenil)-1-metil-1*H*-pirazol-3-karboksilna kiselina (50):** Polazeći od 0,33 g 4-(3-metoksifenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,12 g proizvoda (36% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje, t.t. = 146-147°C; C<sub>12</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, M<sub>r</sub> = 232,24; ESI-MS: Izračunato za C<sub>12</sub>H<sub>13</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 233,09207, izmereno: 233,09246; IC (ν, cm<sup>-1</sup>): 3234 *br*, 1664 (C=O), 1466, 1214; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz,

DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm):, 3,81 (*s*, 3 H), 3,91 (*s*, 3 H), 6,84 (*s*, 1 H), 7,04 (*ddd*, *J* = 8,4, 2,6, 0,8 Hz, 1 H), 7,09 –7,14 (*m*, 2 H), 7,42 (*t*, *J*=7,96 Hz 1 H), 12,69 (*sb*, 1 H).

**5-(2,3,5,6-tetrametilfenil)-1-metil-1*H*-pirazol-3-karboksilna kiselina (51)**: Polazeći od 0,20 g 4-(2,3,5,6-tetrametilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline dobijeno je 0,11 g proizvoda (51% teorijskog prinosa). Čvrsta supstanca bele boje; t.t. = 160-162°C C<sub>15</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, M<sub>r</sub> = 258,32; ESI-MS: Izračunato za C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [M+H]<sup>+</sup>: 259,14410, izmereno: 259,14444; IC ( $\nu$ , cm<sup>-1</sup>): 3095 *br*, 1707 (C=O), 1469, 1223; <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 1,82 (*s*, 6 H), 2,20 (*s*, 6 H), 3,48 (*s*, 3 H), 6,54 (*s*, 1 H), 7,09 (*s*, 1 H), 12,67 (*sb*, 1 H); <sup>13</sup>C NMR (126 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>)  $\delta$  (ppm): 16,34, 19,59, 36,65, 108,65, 128,90, 132,30, 133,23, 133,61, 142,59, 143,29, 163,29.

## 4.2. Određivanje biološke aktivnosti jedinjenja

### 4.2.1. Antibakterijska aktivnost ADK i derivata

Svi testovi antibakterijske aktivnosti jedinjenja iz ove disertacije urađeni su u Londonu, UK, u saradnji sa kolegama Miretom Zlohom i Simon-om Gibbons-om (UCL, School of Pharmacy).

**Sojevi bakterija**: Kontrolni organizmi za testiranje antimikrobne susceptibilnosti *Escherichia coli* NCTC 12241, *Staphylococcus aureus* (NCTC 12981 i NCTC 13373), *Enterococcus faecalis* NCTC 12697 i *Bacillus subtilis* NCTC 10400 dobijeni su od strane National Collection of Type Cultures (Public Health England, Ujedinjeno Kraljevstvo). Tetraciklin-rezistentni soj MRSA XU212 (koji eksprimuje TetK efluks pumpu) dobijen je od strane Dr. E. Udo-a.<sup>152</sup> Eritromicin-rezistentne *S. aureus* RN4220 pribavljene su od Dr. Jonathan Cove-a.<sup>153</sup> EMRSA-15 soj<sup>154</sup> potiče iz kolekcije ćelijskih kultura Dr. Paul Stapleton-a. Norfloksacin-rezistentne *S. aureus* 1199B, koje prekomerno eksprimuju NorA efluks pumpu, donirane su od strane profesora Glenn W. Kaatz-a.<sup>155</sup>

**Određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIK)**: MIK vrednosti određene su metodom mikrorazblaživanja (microdilution method)<sup>185</sup> u posudama sa 96 mesta ukupne zapremine 200  $\mu$ L po mestu. Medijum za rast bakterija je bio Mueller-Hinton-ov agar (Oxoid, UK) podešen katjonima (20 mg/L Ca<sup>2+</sup> i 10 mg/L Mg<sup>2+</sup>) sa bakterijskim inokulumom od 5 $\times$ 10<sup>5</sup> kolonija po milimetru. Posude su inkubirane na 37°C i vizuelno očitane nakon 16 časova. MIK vrednosti su određene kao najniža koncentracija koja

inhibira rast bakterija u navedenom vremenskom periodu. Sve supstance su dodavane u obliku rastvora u DMSO-u, razblaženje je bilo takvo da ukupni udeo DMSO-a u svim mikrotitarskim bunarima nije prelazio 1%. Prethodno je pokazano da koncentracije DMSO-a od 5% i manje ne utiču na rast bakterijskih sojeva upotrebljenih u ovom istraživanju (neobjavljeni rezultati). Svako jedinjenje je ispitivano u opsegu od 0,12 do 128 µg/ml i MIK-ovi su određivani najmanje dva puta.

#### 4.2.2. Inhibicija dejstva karboanhidraza

Inhibitorna aktivnost jedinjenja određivana je prateći reakciju hidratacije CO<sub>2</sub> katalizovanu pomoću enzima KA, koristeći metod Khalifah-a.<sup>163</sup> Brzina reakcije hidratacije CO<sub>2</sub> određivana je na SX.18MV-R Applied Photophysics stopped-flow instrumentu. Pre merenja, inhibitor i enzim su inkubirani 15 minuta. IC<sub>50</sub> Vrednosti određene su iz krivih doza-odgovor dobijenih pri sedam različitih koncentracija inhibitora (od 0,1 nM do 100 µM), fitovanjem ovih krivih koristeći nelinearni metod najmanjih kvadrata u programu PRISM ([www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)). Dobijene vrednosti predstavljaju srednju vrednost iz tri određivanja. Konstante inhibicije ( $K_i$ ) zatim su izvedene koristeći Cheng-Prustoff jednačinu:

$$K_i = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{S}{K_m}} \quad (26)$$

gde  $S$  predstavlja koncentraciju CO<sub>2</sub> pri kojoj je izvođen eksperiment a  $K_m$  predstavlja koncentraciju supstrata pri kojoj aktivnost enzima odgovara polovini maksimalne aktivnosti. Svi korišćeni enzimi su rekombinantni, proizvedeni u *Escherichia coli* bakterijama. Koncentracije enzima korišćene u testovima su: KA I, 12,3 nM; KA II, 7,7 nM; KA IX, 9,9 nM i KA XII, 12,3 nM.

### 4.3. Određivanje fizičko-hemijskih karakteristika jedinjenja

#### 4.3.1. Spektrofotometrijsko određivanje konstanti kiselosti arildiketo kiselina

Osnovni rastvori ADK za spektrofotometrijsko određivanje pripremani su u etanolu u koncentraciji  $1 \cdot 10^{-3}$  M. Radni rastvori su pripremani razblaživanjem osnovnog

rastvora dejonizovanom vodom, tako da koncentracija etanola nije prelazila 1% (tačne vrednosti koncentracija ispitivanih rastvora su date u potpisima **Slika 43, 44, P4-P17**). Za određivanje  $pK_{a_1}$  vrednosti napravljena je serija rastvora u pH intervalu 1,3–3,5, a za određivanje  $pK_{a_2}$  vrednosti serija rastvora u pH intervalu 6,1–8,0. Korišćeni su rastvori fosfatnih i rastvori acetatnih pufera ( $c_{tot} = 0,01 \text{ M}$ ,  $I = 0,1 \text{ M}$  (NaCl)). Neposredno pred snimanje dodavano je po 0,250 ml osnovnog rastvora u 25,00 ml rastvora pufera različitih pH vrednosti. Spektri supstanci u čistom monoanjonskom obliku ( $HA^-$ ) snimljeni su u acetatnom puferu. Snimanje spektara vršeno je odmah nakon pripreme rastvora u intervalu 220–500 nm brzinom snimanja od 500 nm/min i uz odgovarajuću slepu probu. Apsorbancije su merene na talasnoj dužini apsorpcionog maksimuma ( $\lambda_{max}$ ). Sva merenja su izvedena na temperaturi 25°C uz konstantnu jonsku silu (0,1 M NaCl).

Spektrofotometrijska određivanja izvedena su na spektrofotometru GBC Cintra 6 (GBC Scientific Equipment Pty Ltd., Dandenong, Australia) sa kvarcnim kivetama kod kojih je dužina optičkog puta 1 cm. Sva pH merenja izvedena su na WTW pH-metru sa kombinovanom elektrodom SenTix 81, WTW, GmbH, Weilheim, Germany. Za kalibraciju su korišćeni puferi pH vrednosti 4,01 (bifaladni) i 7,00 (fosfatni).

#### *4.3.2. Potenciometrijsko određivanje konstanti kiselosti arildiketo kiselina*

Potenciometrijske titracije su izvedene na automatskom titratoru CRISON PH - Burette 24 2S, Version 3.0, sa kombinovanom mikro-elektrodom CRISON 50 29. Sistem je kalibrisan bifaladnim (pH = 4,01) i fosfatnim (pH = 7,00) puferima. Osnovni rastvori ADK ( $c = 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) za potenciometrijsko određivanje konstanti kiselosti pripremani su u vodi rastvaranjem tačno odmerene mase suve supstance. Rastvori HCl i NaOH (0,1 M) su standardizovani potenciometrijskim titracijama. Za izračunavanje konstanti kiselosti korišćeni su podaci dobijeni kalibracijom sistema Grann-ovom metodom korišćenjem softverskog paketa GLEE.<sup>95</sup> Program je napravljen za kalibraciju elektrode titracijom standardnog rastvora jake kiseline jakim bazom. Na osnovu eksperimentalnih podataka ( $E$  (mV) i  $V_{NaOH}$  (ml)) dobijamo  $k$ , nagib i 'slope factor' (korekciju Nernstovskog nagiba, jednačina (2)), koji se potom koriste u softverskom

paketu HYPERQUAD2008 za obradu eksperimentalnih podataka dobijenih titracijama za održavanje  $pK_a$  vrednosti ispitivanih ADK. Program takođe može proceniti udeo rastvorenog  $CO_2$  u rastvoru NaOH.

Korišćeni su i standardni rastvori NaOH ( $c = 0,1311$  M) i HCl ( $c = 0,1194$  M). Standardizacija NaOH izvedena je preko natrijum-hidrogenftalata, a standardizacija HCl preko prethodno standardizovanog NaOH.

Potenciometrijske titracije su izvedene u vodenoj sredini. Obzirom da su ADK slabo rastvorne u vodi rastvaranje je bilo potpomognuto ultrazvukom, mešanjem i blagim zagrevanjem ( $t < 60^\circ C$ ) preko noći na magnetnoj mešalici.

Pri potenciometrijskom određivanju  $pK_{a_2}$ , alikvotima ADK od 6,00 ml tačno poznate koncentracije dodato je 0,20 ml standardnog rastvora HCl i titrovano standardnim rastvorom NaOH. Zapremina inkremenata titracionog sredstva iznosila je 5  $\mu$ l. Iz dobijenih eksperimentalnih podataka,  $pK_{a_2}$  vrednost je određena korišćenjem softverskog paketa HQ2008.

#### 4.3.3. *Određivanje konstanti kiselosti aril-pirazol karboksilnih kiselina*

Konstanta kiselosti jedinjenja **47** određena je spektrofotometrijski prema već opisanoj proceduri za ADK. Zbog malih promena u apsorpcionim spektrima sa promenom pH vrednosti (**Slika 69**), kao i nedovoljne rastvorljivosti APK u vodi u pH opsegu od interesa, pribeglo se određivanju  $pK_a$  vrednosti potenciometrijski u smeši rastvarača metanol/voda 1/1 (v/v). Osnovni rastvori APK ( $c = 1,0-1,2 \cdot 10^{-3}$  M) pripremani su rastvaranjem tačno odmerene mase suve supstance u 1/1 (v/v) MeOH/0,1 M KCl. Standardni rastvori NaOH ( $c = 0,1132$  M) i HCl ( $c = 0,1070$  M) pripremljeni su u 50%-nom metanolu koristeći natrijum-hidrogenftalat kao primarni standard. Dalja eksperimentalna procedura je identična kao kod potenciometrijskog određivanja  $pK_{a_2}$  vrednosti ADK, s tim što su korišćeni alikvoti manje zapremine (4 ml) i titrovani su inkrementima od 2  $\mu$ l.

#### 4.3.4. Spektrofotometrijsko određivanje sastava i konstante stabilnosti kompleksa ADK sa $Zn^{2+}$ jonom

Osnovni rastvori ADK ( $c = 4\text{--}6 \cdot 10^{-3}$  M) za spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti kompleksa pripremani su u etanolu rastvaranjem tačno određene mase suve supstance. Osnovni rastvori  $Zn^{2+}$  jona ( $c = (0,24\text{--}2,4) \cdot 10^{-3}$  M) za spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti kompleksa pripremani su u TBS-u rastvaranjem tačno određene mase suvog cink-nitrata heksahidrata. Rastvor TBS-a (pH=7,34,  $c_{\text{tot}} = 30$  mM) pripreman je odmeravanjem tačno određenih masa čvrstih supstanci (Tris-a i natrijum-hlorida) i njihovim rastvaranjem u vodi, pH vrednost je podešena na 7,34 dodatkom hlorovodonične kiseline.

Spektri ispitivanih ADK snimani su u TBS-u ( $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ , pH=7,34,  $c_{\text{tot}} = 30$  mM). U 2,500 ml TBS-a u kvarcnoj kivetici dodat je alikvot koncentrovanog rastvora odgovarajuće ADK u etanolu ( $5 \cdot 10^{-3}$  M). Rastvor u kivetici je mešan 1 min na magnetnoj mešalici neposredno pre snimanja UV/VIS spektra. Rastvor ADK titrovao je dodatkom različitih alikvota rastvora  $Zn^{2+}$  u molskom odnosu od 0,1 do  $n$  ekvivalenata (eksperimentalni podaci dati su u **Tabelama P17-P29** u Prilogu). Spektri su snimljeni u intervalu 220–500 nm brzinom snimanja od 500 nm/min i uz odgovarajuću slepu probu (TBS). Za određivanje vrednosti konstanti stabilnosti kompleksa, apsorbancije su merene na optimalnoj talasnoj dužini (maksimum apsorpcije kompleksa, a minimum apsorpcije liganda). Sva određivanja izvedena su na  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ .

#### 4.3.5. Potenciometrijsko određivanje sastava i konstante stabilnosti kompleksa ADK sa $Zn^{2+}$ jonom

Rastvori ADK su odmeravani biretom od 10,00 ml u odgovarajuće sudove za titraciju. U sud je zatim automatskom pipetom dodavana odgovarajuća zapremina vodenog rastvora  $Zn^{2+}$  tako da odnos molova ADK i  $Zn^{2+}$  bude 1:1, odnosno 2:1. Sve je ostavljeno da se meša 5 min u cilju stvaranja kompleksa  $Zn^{2+}$  i ADK. Nakon toga je u rastvor za titraciju dodato 200,0  $\mu\text{l}$  standardnog vodenog rastvora HCl (0,1038 M) u cilju podešavanja pH vrednosti rastvora na 3,0–3,5. Sve je ostavljeno da se meša još 5 min, a zatim je titracija izvedena standardnim rastvorom NaOH ( $c = 0,1287$  M).



Zapremina inkrementa tokom titracije je bila 5,0  $\mu\text{l}$ , vreme između dva inkrementa 7 s, a završni potencijal  $-250$  mV. Nakon završetka titracija mogao se primetiti beli pahuljičast talog u probama u kojima je odnos metala i liganda bio 1 prema 1 (M:L=1:1). Pretpostavlja se da je u pitanju  $\text{Zn}(\text{OH})_2$ , obzirom na to da su pH vrednosti istitrovanih rastvora iznosile 10–11.

Konstante hidrolize  $\text{Zn}^{2+}$  jona korišćene u HYPERQUAD modelu za nalaženje konstante stabilnosti ADK sa  $\text{Zn}^{2+}$  jonom su eksperimentalno određene kiselinsko-baznim potenciometrijskim titracijama u pH oblasti 3,5-11. Dobijene su vrednosti  $\text{p}K_{h1}=7,55\pm 0,05$  (odgovara procesu disocijacije  $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$  do  $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_3\text{OH}]^+$  i  $\text{H}_3\text{O}^+$  jona) i  $\text{p}K_{h2}=7,83\pm 0,07$  (odgovara procesu disocijacije  $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_3\text{OH}]^+$  do  $[\text{Zn}(\text{H}_2\text{O})_2\text{OH}]$  i  $\text{H}_3\text{O}^+$  jona).

#### 4.3.6. Elektrohemijsko proučavanje arildiketo kiselina

Pripremljeno je 25,00 ml rastvora ADK ( $c = 4\cdot 7\cdot 10^{-5}$  M) u Britton-Robinsonovim puferima pH vrednosti 1, 5 i 10. Svakom od rastvora snimljeni su ciklični voltamogrami pri brzinama skeniranja od 100 do 500 mV/s. Ciklični voltamogrami ADK snimljeni su na CHI760B instrumentu (CH Instruments, USA). Elektrohemijska ćelija sastoji se iz elektrode od staklastog ugljenika i pomoćne Pt elektrode (Model CHI221) i referentne Ag/AgCl elektrode (Model CHI111).

Diferencijalno pulsni polarogrami snimljeni su pri fiksnoj brzini skeniranja od 13 mV/s (amplitude pulsa 50 mV, vreme trajanja pulsa 0,4 s). Pre svakog merenja, kroz elektrohemijsku ćeliju je propušan  $\text{N}_2$  tokom 200 sekundi. Diferencijalno pulsni polarogrami snimljeni su na instrumentu Metrohm 797 VA COMPUTRACE (Holandija). Elektrohemijska ćelija ovog uređaja sačinjena je od radne, kapljuće živine electrode, referentne Ag/AgCl (3M KCl) elektrode i platinske žice kao pomoćne elektrode.

## 4.4. Molekulsko modelovanje

### 4.4.1. Kvantno-hemijsko proučavanje stabilnosti tautomera jedinjenja **1**

Potpuna geometrijska optimizacija različitih tautomernih oblika jedinjenja **1** u njegovom neutralnom ( $H_2A$ ) i anjonskim obliku ( $HA^-$ ), izvedena je na MP2 nivou teorije. Korišćen je 6-31G(d,p) bazis set, konstante sila su računane u svakoj tački (ključna reč Opt = Calcall) i pooštravajući kriterijume za dostizanje konvergencije, dodajući ključne reči Opt = Tight, Int = Ultrafine. Uticaj rastvarača je simuliran primenom implicitnog modela vode (IEF-PCM).

Za optimizaciju para svakog tautomera sa jednim molekulom vode, korišćene su optimizovane geometrije tautomera i ručno je dodavan jedan molekul vode u blizini -OH dela karboksilne grupe. Zatim je takav sistem optimizovan na semiempirijskom PM6 nivou, držeći koordinate atoma jedinjenja **1** fiksiranim, dok je molekulu vode bilo dozvoljeno da se kreće. Konačna optimizacija ovog sistema je urađena na MP2 nivou teorije i 6-31G(d,p) bazis setom u Gaussian03 programu.<sup>186</sup>

### 4.4.2. Kvantno-hemijsko proučavanje stabilnosti metil-supstituisanih arildiketo kiselina

Optimizacija geometrije jedinjenja **2,3**, **5-7** i **22-24** izvedena je na način prethodno opisan za jedinjenje **1**. Energije radikal katjona i radikal anjona  $H_2A$  oblika, kao i radikal anjona  $HA^-$  oblika dobijene su računima u jednom koraku iz optimizovanih struktura jedinjenja, definisanjem odgovarajućeg naelektrisanja i multipliciteta u ulaznom fajlu.

### 4.4.3. 3D QSAR modelovanje zasnovano na deskriptorima izvedenim iz MIF-ova primenjeno na antiproliferativnu aktivnost jedinjenja tetraoksanskog tipa

Trodimenzionalne strukture osnovnih steroidnih jezgara jedinjenja **1b-33b** generisane su u programu CORINA.<sup>187</sup> Supstituenti su zatim dodati u programu Vega ZZ 2.3.1.<sup>174</sup> 3D strukture su optimizovane na semiempirijskom PM6 nivou u programu MOPAC 2009,<sup>188</sup> primenjujući molekulsko-mehaničku korekciju za -C(O)NH barijeru, strožiji kriterijum za konvergenciju (RMS gradijenta manji od

0,001) i implicitni model hidratacije (COSMO model, dielektrična konstanta 78,4). Lipofilni potencijal molekula,<sup>189</sup> izražen kao VLogP izračunat je takođe pomoću VEGA ZZ programa, koristeći predefinisana podešavanja. Optimizovane strukture jedinjenja **1b-33b** korišćene su kao ulazne strukture za program Pentacle, v 1.05.<sup>150</sup>

Polja molekulskih interakcija izračunata su pomoću GRID 22b programa<sup>143</sup> i vizualizovana u GVIEW-u. Procena energija interakcije u čvorovima MIF-ova urađena je takođe u GRID-u. Zapremine MIF-ova na izabranom izokonturnom nivou ekstrahovane su pomoću programa BIOCUBE.<sup>141</sup> MLR modeli dobijeni su u programu BILIN,<sup>190</sup> koristeći unakrsnu validaciju sa izostavljanjem jedne po jedne vrednosti.

MIF-ovi su izračunati pomoću DRY, O, N1 i TIP probe. Svi parametri za izračunavanje deskriptora su zadržani na predefinisanim vrednostima osim razmaka između čvorova mreže koji je smanjen sa 0,5 na 0,4 Å. Za selekciju važnih varijabli korišćen je frakcioni faktorski dizajn (FFD) sa 20% ubačenih lažnih varijabli (dummy variables) i odnosom kombinacija/varijacija 2.

#### 4.4.4. 3D QSAR modelovanje zasnovano na deskriptorima izvedenim iz MIF-ova primenjeno na antibakterijsku aktivnost arildiketo kiselina

Farmakoforna sličnost između ADK i norfloksacina ispitana je pomoću programa ROCS.<sup>191</sup> Molekuli su rangirani po kriterijumu sličnosti oblika i farmakofore koristeći Tanimoto indeks. 3D QSAR model antibakterijske aktivnosti ADK napravljen je u programu Pentacle, v 1.06. Kao zavisna varijabla korišćene su aktivnosti jedinjenja prema norfloksacin-rezistentnom soju bakterija *S. aureus* 1199B, izražene kao pMIK = -log(MIK). Sve ADK su modelovane u najstabilnijem, enolnom obliku (tautomer **I**, **Slika 21**). 3D strukture jedinjenja **1-21**, **1a-5a** i **22d-26d** generisane su iz SMILES (Simplified Molecular-Input Line System) zapisa u programu OMEGA 2.4.3,<sup>175</sup> koristeći MMFF94s polje sila i predefinisana podešavanja,<sup>192</sup> birajući samo najstabilniju konformaciju. Strukture su dodatno optimizovane koristeći semiempirijski PM6 metod<sup>193</sup> u programu MOPAC 2012<sup>188</sup> i koristeći VEGA ZZ 3.0.5 program kao interfejs.<sup>174</sup> Polja molekulskih interakcija izračunata su za četiri probe: DRY, O, N1 i TIP. Važne pozicije oko molekula (hot spots) ekstrahovane su iz MIF-ova koristeći AMANDA diskretizacioni algoritam.<sup>150</sup> Kodiranje profiltriranih MIF-ova u GRIND varijable urađeno je pomoću MACC2 algoritma. Svi parametri korišćeni za računanje

MIF-ova bili su identični predefinisanim, osim težine DRY probe koja je povećana sa -2,8 na -2 da bi se dao veći značaj hidrofobnim interakcijama. PCA je korišćena kao metoda za grupisanje jedinjenja i proučavanje njihove sličnosti, dok je PLS regresija upotrebljena za dobijanje kvantitativne veze između biološke aktivnosti i GRIND varijabli.

#### 4.4.5. Doking aril pirazol karboksilnih kiselina u strukture karboanhidraza

Strukture anjonskih oblika tautomera **A** i **B** jedinjenja **25-48** (Slika 24) pripremljene su u anjonskom obliku iz SMILES inputa u programu OMEGA 2.4.3., koristeći MMFF94s polje sila i predefinisana podešavanja. Sa izuzetkom jedinjenja **28**, ukupan broj konformacija po molekulu nije prelazio 50. Strukture kaboanhidraza su modelovane koristeći strukture iz PDB-a: 1HCB za KA I; 3BF4 za KA II; 3IAI za KA IX i 1JD0 za KA XII. Kod pripreme KA IX i XII, koje se u PDB-u nalaze kristalisane kao dimeri, za doking uzeta je samo jedna podjedinica. Molekuli vode i ostali eventualno kokristalisani mali molekuli su uklonjeni iz stukture sve četiri izoforme KA. Stanje protonovanosti histidinskih ostataka preuzeto je iz strukture KA II kokristalisane sa acetazolamidom, koja je određena difrakcijom neutrona (PDB šifra 4G0C).<sup>194</sup> His64 tretiran je kao neutralan. U .pdb input fajlu stanje protonovanosti ostataka His specifikovano je dajući im imena prema CHARMM konvenciji (HSD ili HSE). Atomi vodonika pripisani su strukturi automatski tokom pripreme proteina koristeći CHARMM-GUI.<sup>195</sup> Stanje protonovanosti ostalih AK ostataka vizuelno je provereno i korigovano u skladu sa stanjima iz 4G0C strukture. Zatim je svaki protein neutralizovan dodatkom kontra jona i uronjen u klaster molekula vode koji se prostirao na 10 Å od dodirne površine protein-voda. Struktura svakog proteina je zatim podvrgnuta minimizaciji bez ikakvih ograničenja u trajanju od 20 ps (tri ciklusa), koristeći program NAMD 2.9.<sup>196</sup> Minimizacija je izvedena koristeći metodu konjugovanih gradijenata. Strukture proteina dobijene na ovaj način dalje su korišćene za doking studije i poređenje aktivnih mesta.

Za doking, proteinima je dodat jedan molekul vode vezan za Zn<sup>2+</sup> jon u aktivnom mestu. Doking jedinjenja **25-48** u sve četiri izoforme KA urađen je u programu FRED 3.0.1<sup>197,198</sup> sa podešavanjem doking rezolucije na visoku i bez primene ikakvih ograničenja (constraints). Ceo protein, koji je uzet u obzir kao receptor,

pripremljen je za doking u OpenEye eReceptor' GUI-ju. Obe konformacije ostatka His64 ('in' i 'out') su razmotrene kroz odvojene doking simulacije. Deset najbolje rangiranih doking rešenja po kriterijumu energije vezivanja su dalje anazirana.

Strukture četiri izoforme KA poravnate su prema koordinatama Ca atoma proteinskih lanaca (C-alpha traces) u programu DaliLite.<sup>199,200</sup> Poređenje aktivnih mesta urađeno je na ovako poravnatim strukturama KA. GRID MIF-ovi aktivnih mesta KA izračunati su za DRY, N1 i O probu u programu FLAP 2.1.<sup>201,202</sup>

Grid rezolucija podešena je na 0,5 Å. MIF-ovi su računati na kutiji koja je obuhvatala sledeće ostatke (brojevi ostataka su iz 1JD0): Trp5, Thr60, Asn62, His64, Lys67, Asn69, Gln92, His94, His96, His119, Val121, Ala131, Ser132, Thr133, Ala134, Val143, Leu198, Thr199, Thr200, Pro202 i Zn<sup>2+</sup> jon.

3D-zavisni molekularni deskriptori (ukupna površina, polarna površina, nepolarna površina, zapremina i VlogP<sup>189</sup>) anjonskih oblika jedinjenja **25-48** izračunati su u programu Vega ZZ 3.0.5.<sup>174</sup> sa probom radijusa 0 Å. Ulazne geometrije molekula dobijene su optimizacijom na semiempirijskom PM6 nivou<sup>193</sup> u programu MOPAC 2012.<sup>188</sup> VegaZZ program je takođe korišćen za pripremu proteina i pripremu i analizu MD simulacija. Slike u tezi su napravljene iz izlaznih fajlova programa FLAP ili FRED pomoću programa PyMol 1.7<sup>203</sup> ili VIDA 4.2.1. 2D prikazi intrakcija liganda sa aktivnim mestom KA napravljene su pomoću OpenEye OEDepictTK.

## 5. Zaključak

Rastuća otpornost bakterija prema dejstvu gotovo svih poznatih antibiotika zahteva pronalaženje novih hemijskih struktura koje efikasno deluju na multirezistentne (Multi-drug resistant, MDR) bakterije. Kao nastavak istraživanja antibakterijske aktivnosti 4-aril-2,4-dioksobutanskih kiselina (arildiketokiselina, ADK) započelih ranije u okviru naše istraživačke grupe, u okviru ove doktorske disertacije sintetisana je nova serija od dvadeset i jedne ADK (jedinjenja **1-21**, **Tabela 3**) i ispitana im je antibakterijska aktivnost prema MDR sojevima bakterija. Jedinjenja sa voluminoznim alkil supstituentima u *orto*- položaju fenilnog jezgra pokazala su se najaktivnijim prema norfloksacin-rezistentnom soju bakterije *Staphylococcus aureus*, a jedinjenje **12** (4-(2,5-di-cikloheksilfenil)-2,4-dioksobutanska kiselina) je pokazalo 10-11 puta veću aktivnost prema istom soju bakterija od najaktivnijeg jedinjenja iz prethodno objavljene serije ADK, kao i 10 puta veću aktivnost od norfloksacina.

Narušavanjem strukture diketo dela molekula značajno se smanjuje antibakterijska aktivnost ADK. Pošto diketo fragment ADK ima sposobnost snažnog kompleksiranja dvovalentnih metalnih jona, kao moguće mete dejstva ADK na bakterijsku ćeliju nameću se enzimi uključeni u biosintezu ćelijskog zida bakterije koji u aktivnom mestu imaju  $Mg^{2+}$  jon: farnezil difosfat sintetaza (FPPS) i undekaprenil difosfat sintetaza (UPPS), kao i enzim dehidroskvalen sintetaza (CrtM) koji učestvuje u biosintezi stafiloksantina – virulentnog faktora *S. aureus* bakterija (**Slika 7**). Dalji enzimski testovi neophodni su radi potvrde ove hipoteze.

U okviru ove disertacije eksperimentalno su određeni neki važni fizičko-hemijski parametri ADK. Rastvorljivost jedinjenja raste sa porastom pH vrednosti, od 0,02 mg/ml na pH = 1 do 1,43 mg/ml na pH 7,4. Određivanjem  $pK_a$  vrednosti ADK nađeno je da su većina ispitivanih jedinjenja diprotične kiseline čija se  $pK_{a1}$  vrednost nalazi u opsegu 1,96-2,34, a  $pK_{a2}$  u opsegu 6,50-7,61. Na osnovu određenih  $pK_a$  vrednosti moguće je predvideti stanje protonovanosti jedinjenja u čitavom spektru pH vrednosti na koje molekul inače nailazi na putu kroz organizam ka meti dejstva. U jako kiseloj sredini dominantan je molekulski oblik ( $H_2A$ ) ADK (na pH 1 više od 90%), dok su na pH vrednosti krvi (7,4) zastupljeni monoanjonski i dianjonski oblik ( $HA^-$  ~30% i  $A^{2-}$  ~70%).

ADK su poznati helatori dvovalentnih metalnih jona. U literaturi opisana inhibitorna aktivnost ADK prema enzimima karboanhidraze, koji katalizuju reakciju pretvaranja  $\text{CO}_2$  u  $\text{HCO}_3^-$  i u aktivnom mestu sadrže  $\text{Zn}^{2+}$  jon, dala je ideju da se detaljnije ispita reakcija kompleksiranja ADK sa  $\text{Zn}^{2+}$  jonom. Potenciometrijskim titracijama uz obradu podataka u programu HYPERQUAD, nađeno je da u rastvoru na  $\text{pH} = 7,4$  dominira kompleksna čestica tipa 1:1 (ML), sa konstantom stabilnosti  $\log \beta \sim 5$ . Pored kompleksa tipa ML, na  $\text{pH} 7,4$  moguće je postojanje i kompleksa tipa  $\text{ML}_2$ ,  $\text{M(OH)L}$  i  $\text{M(OH)L}_2$ .

ADK u vodenom rastvoru mogu postojati u tri tautomerna oblika (dva enolna i jedan diketo oblik, **Slika 21**). 2D NMR spektroskopijom pokazano je da je u vodenom rastvoru, na  $\text{pH} < 0$ , enol **I** dominantni tautomer molekulskog oblika ADK. Kvantno-hemijskim izračunavanjima predviđena je stabilnost različitih tautomernih oblika ADK u vodenoj sredini. Pokazano je da korišćenjem PCM (Polarizable Continuum Model) modela vode nije moguće dobiti redosled stabilnosti tautomera koji odgovara eksperimentalnim rezultatima, usled zanemarivanja eksplicitnog vodoničnog vezivanja u ovakvom modelu. Dodatkom jednog molekula vode vodonično vezanog u energetski najpovoljniji položaj oko molekula ADK dobijen je redosled stabilnosti tautomera koji je odgovarao eksperimentalnim rezultatima. Dalji proračuni, koji uzimaju u obzir više eksplicitnih molekula vode, su neophodni u svrhu dobijanja pouzdanijeg modela za predviđanje tautomernih osobina novih jedinjenja.

U okviru ove disertacije ispitane su i redoks osobine metil-supstituisanih ADK (jedinjenja **1-3**, **5-7**, **22-24**, **Tabela 14**). ADK pokazuju ireverzibilne ciklovoltamograme pri svim ispitivanim brzinama skeniranja, što ukazuje na nedovoljnu stabilnost radikal-katjona nastalog jednoelektronskom oksidacijom ADK. Redukcioni potencijali ADK, određeni diferencijalno pulsnom polarografijom, bili su zavisni od stanja protonovanosti ADK. Energija LUMO orbitala, kao i indikatorska varijabla koja kvantifikuje sterne uticaje supstituenata, pokazale su statistički značajnu korelaciju sa redukcionim potencijalima ADK i mogu se iskoristiti za predviđanje redukcionih osobina strukturno sličnih jedinjenja.

Uprkos dobroj sposobnosti kompleksiranja  $\text{Zn}^{2+}$  jona, ADK sintetisane u okviru ove disertacije nisu se pokazale kao efikasni inhibitori karboanhidraza. Pretpostavljeno je da su ADK u uslovima eksperimenta metabolički nestabilne i da dolazi do njihove

dekarboksilacije. Iz tog razloga sintetisana je i serija aril-pirazol karboksilnih kiselina (APK, jedinjenja **25-48**, **Tabela 15**), metabolički stabilnijih derivata ADK, i ispitana je i njihova inhibitorna aktivnost prema nekoliko izoformi KA. APK su se pokazale kao selektivni inhibitori KA IX i XII, izoformi koje su značajne za medicinsku hemiju jer predstavljaju jedne od najnovije otkrivenih meta za razvoj lekova protiv čvrstih, invazivnih tumora. Jedinjenja sa voluminoznijim supstituentima u *para*-položaju fenilnog prstena inhibirala su dejstvo KA XII u niskim mikromolarnim koncentracijama, dok su jedinjenja sa alkil supstituentima u *orto*- i *meta*-položajima inhibirala KA IX u opsegu IC<sub>50</sub> vrednosti od 5 do 25 μM.

Kao i u slučaju ADK, ispitane su neke fizičko-hemijske osobine APK. NOESY NMR spektroskopijom određen je dominantan tautomerni oblik APK (**25-48**), kao i *N*-metil supstituisanih APK (**49-51**) u DMSO-u. Pokazano je da se dominantni oblik nekoliko APK u rastvoru podudara sa oblikom nađenim u kristalnoj strukturi 5-fenil-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline. Eksperimentalno određene p*K*<sub>a1</sub> vrednosti nekoliko APK (4,03-4,67 za jedinjenja **25-48**, odnosno 4,54-4,75 za jedinjenja **49-51**) su za preko jedne p*K*<sub>a</sub> jedinice više od identično supstituisanih ADK, što se može objasniti manjom stabilnošću anjona nastalog deprotonovanjem karboksilne grupe. Predviđena p*K*<sub>a2</sub> vrednost APK iznosi oko 11, a eksperimentalno izvedenim titracijama u oblasti pH ≤ 11,5 nije primećena druga disocijacija APK. Ovako visoka p*K*<sub>a</sub> vrednost nije relevantna za farmakokinetička proučavanja jer u organizmu ne postoje regioni sa ovako visokom pH vrednošću, pa nije određivana drugim metodama. Iz svega navedenog se vidi da će na pH vrednosti krvi APK, kao diprotične kiseline opšte formule H<sub>2</sub>A, postojati isključivo u obliku HA<sup>-</sup>.

Racionalizacija dobijenih bioloških podataka i dizajn novih, aktivnijih struktura, mogući su primenom različitih tehnika molekuskog modelovanja. Deo ove doktorske disertacije posvećen je uz MIF-ovima i 3D QSAR-u zasnovanom na GRIND deskriptorima. Radi ispitivanja primenljivosti GRIND metodologije u LBDD, kao test set upotrebljene su strukture i antiproliferativne aktivnosti već poznatih jedinjenja tetroksanskog tipa (**Tabela 19**). S obzirom da je kritični korak u 3D QSAR analizi odabir odgovarajuće, *aktivne* konformacije molekula, konformaciono kruti molekuli kao što su tetroksani predstavljali su odličan model sistem za proučavanje 3D QSAR



metode. GRIND metodologija se pokazala kao veoma korisna u slučajevima kada tačna meta biološkog dejstva nije poznata već su jedino poznati podaci o biološkoj aktivnosti prema celim ćelijama. Kao najznačajniji rezultat dobijenih modela može se izdvojiti prepoznavanje negativnog uticaja alkil-supstituenata na amidnom azotu na antiproliferativnu aktivnost jer se time smanjuje sposobnost doniranja vodonične veze jedinjenja, što je izraženo kroz niže energije interakcije sa probom akceptora vodonične veze (O probom). Pronađena je inverzna korelacija između lipofilnosti i antiproliferativne aktivnosti, što daje ideju o aktivnom transportu jedinjenja tetroksanskog tipa unutar ćelije.

U cilju racionalizacije antibakterijske aktivnosti ADK prema MDR sojevima bakterija primenjene su različite tehnike molekuskog modelovanja. Preklapanjem struktura ADK sa strukturom norfloksacina po kriterijumima oblika i farmakoforne sličnosti, pokazano je da je preklapanje po kriterijumu oblika najbolje kod najaktivnijih ADK, dok je istovremeno preklapanje farmakofornih tačaka najaktivnijih ADK i norfloksacina bilo najmanje. Ovo ukazuje na drugačiji mehanizam antibakterijskog delovanja ADK od mehanizma dejstva norfloksacina (inhibicija topoizomeraza II i IV i sprečavanje deobe bakterijske ćelije).

3D QSAR zasnovan na GRIND metodologiji pokazao se veoma korisnim u pronalaženju farmakofornih tačaka neophodnih za antibakterijsku aktivnost ADK. Objedinjavanjem aktivnosti prema SA1199B svih ADK (jedinjenja **1-21**, **22d-26d**) sa aktivnostima nekoliko poznatih hinolonskih antibiotika (norfloksacin, ciprofloksacin, moksifloksacin, levofloksacin), kao i jedinjenja bez diketo dela (**1a-5a**, **Tabela 3**), napravljena je početna baza podataka za QSAR analizu. Dobijeni model ukazao je na nekoliko strukturnih fragmenata važnih za antibakterijsku aktivnost. Nađeno je da dva hidrofobna regiona molekula na rastojanju od 10 do 16 Å pozitivno utiču na antibakterijsku aktivnost; da prisustvo dve grupe sa sposobnošću prihvatanja vodonične veze (HBA) u molekulu povećava aktivnost, sa optimalnim rastojanjem između njih od 11,60 do 12,00 Å; da optimalno rastojanje između hidrofobnog dela molekula i HBA grupe iznosi od 16,40 do 16,80 Å, a ove grupe na manjim rastojanjima smanjuju aktivnost jedinjenja; da postojanje HBA grupe na rastojanju do 16 Å od grupe sa sposobnošću doniranja vodonične veze (HBD) povećava aktivnost jedinjenja, dok se obrnuto dešava za veća rastojanja; da važne sterne tačke molekula, predstavljene TIP

probom, imaju optimalno rastojanje od HBD probe od 11 do 14 Å, dok varijable sa rastojanjima preko 16 Å imaju negativan uticaj na biološku aktivnost. Ovi podaci mogu biti iskorišćeni u dizajniranju novih, još aktivnijih jedinjenja na bazi ADK, kao i za virtuelni skrining većih baza podataka radi nalaženja novih tipova struktura sa sličnim biološkim dejstvom.

Doking studije APK u aktivna mesta izoformi KA I, II, IX i XII i sistematsko poređenje MIF-ova doveli su do prepoznavanja dela aktivnog mesta KA sa nepolarnim AK oko ostatka 130 (130's segment) kao bitnog za ostvarivanje izoformske selektivnosti inhibitora. Naime, iako je ovaj segment daleko od  $Zn^{2+}$  jona, jedinjenja aktivna prema KA IX i XII uspostavljaju nepolarne interakcije sa 130's segmentom, za razliku od neaktivnih jedinjenja. Rezultati ove studije mogu se iskoristiti u svrhu dizajna novih, selektivnijih inhibitora KA IX i XII, povećavanjem broja i energije interakcija sa 130's segmentom, a istovremeno zadržavajući polarnu „glavu“ molekula radi kompleksiranja sa  $Zn^{2+}$  jonom.

Arildiketo kiseline i aril-pirazol karboksilne kiseline proučavane u okviru ove disertacije pokazale su pogodne biološke i fizičko-hemijske karakteristike koje ih čine dobrim polaznim jedinjenjima (lead compounds) za dalji razvoj antibakterijskih agenasa aktivnih prema MDR sojevima bakterija i selektivnih inhibitora izoformi IX i XII enzima KA. Tehnike molekuskog modelovanja zasnovane na MIF-ovima pokazale su se kao izuzetno korisne za racionalizaciju odnosa strukture i biološke aktivnosti različitih klasa jedinjenja u LBDD, kada tačna biološka meta dejstva nije sa sigurnošću utvrđena.

## 6. Literatura

- (1) Drakulić, B. J.; Stavri, M.; Gibbons, S.; Žižak, Ž. S.; Verbić, T. Ž.; Juranić, I. O.; Zloh, M. Aryldiketo Acids Have Antibacterial Activity against MDR Staphylococcus Aureus Strains: Structural Insights Based on Similarity and Molecular Interaction Fields. *ChemMedChem* **2009**, *4* (12), 1971–1975.
- (2) Sechi, M.; Bacchi, A.; Carcelli, M.; Compari, C.; Duce, E.; Fisicaro, E.; Rogolino, D.; Gates, P.; Derudas, M.; Al-Mawsawi, L. Q.; Neamati, N. From Ligand to Complexes: Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase by  $\beta$ -Diketo Acid Metal Complexes. *J. Med. Chem.* **2006**, *49* (14), 4248–4260.
- (3) Bacchi, A.; Biemmi, M.; Carcelli, M.; Carta, F.; Compari, C.; Fisicaro, E.; Rogolino, D.; Sechi, M.; Sippel, M.; Sotriffer, C. A.; Sanchez, T. W.; Neamati, N. From Ligand to Complexes. Part 2. Remarks on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase Inhibition by  $\beta$ -Diketo Acid Metal Complexes. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (22), 7253–7264.
- (4) Hazuda, D. J.; Felock, P.; Witmer, M.; Wolfe, A.; Stillmock, K.; Grobler, J. A.; Espeseth, A.; Gabryelski, L.; Schleif, W.; Blau, C.; Miller, M. D. Inhibitors of Strand Transfer That Prevent Integration and Inhibit HIV-1 Replication in Cells. *Science* **2000**, *287* (5453), 646–650.
- (5) Reinke, R.; Lee, D. J.; Robinson, W. E. Inhibition of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Isolates by the Integrase Inhibitor L-731,988, a Diketo Acid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2002**, *46* (10), 3301–3303.
- (6) Evering, T. H.; Markowitz, M. Raltegravir (MK-0518): An Integrase Inhibitor for the Treatment of HIV-1. *Drugs Today (Barc)*. **2007**, *43* (12), 865–877.
- (7) Wills, T.; Vega, V. Elvitegravir: A Once-Daily Inhibitor of HIV-1 Integrase. *Expert Opin. Investig. Drugs* **2012**, *21* (3), 395–401.
- (8) Shah, B. M.; Schafer, J. J.; DeSimone, J. A. Dolutegravir: A New Integrase Strand Transfer Inhibitor for the Treatment of HIV. *Pharmacother. J. Hum. Pharmacol. Drug Ther.* **2014**, *34* (5), 506–520.
- (9) Li, Y.; Xuan, S.; Feng, Y.; Yan, A. Targeting HIV-1 Integrase with Strand Transfer Inhibitors. *Drug Discov. Today* **2015**, *20* (4), 435–449.
- (10) Cuzzucoli Crucitti, G.; Métifiot, M.; Pescatori, L.; Messori, A.; Madia, V. N.; Pupo, G.; Saccoliti, F.; Scipione, L.; Tortorella, S.; Esposito, F.; Corona, A.; Cadeddu, M.; Marchand, C.; Pommier, Y.; Tramontano, E.; Costi, R.; Di Santo, R. Structure–activity Relationship of Pyrrolyl Diketo Acid Derivatives as Dual Inhibitors of HIV-1 Integrase and Reverse Transcriptase Ribonuclease H Domain. *J. Med. Chem.* **2015**, *58* (4), 1915–1928.
- (11) Krieger, I. V.; Freundlich, J. S.; Gawandi, V. B.; Roberts, J. P.; Gawandi, V. B.; Sun, Q.; Owen, J. L.; Fraile, M. T.; Huss, S. I.; Lavandera, J.-L.; Ioerger, T. R.; Sacchettini, J. C. Structure-Guided Discovery of Phenyl-Diketo Acids as Potent Inhibitors of M. Tuberculosis Malate Synthase. *Chem. Biol.* **2012**, *19* (12), 1556–1567.

- (12) Smith, C. V.; Huang, C.; Miczak, A.; Russell, D. G.; Sacchettini, J. C.; Höner zu Bentrup, K. Biochemical and Structural Studies of Malate Synthase from Mycobacterium Tuberculosis. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (3), 1735–1743.
- (13) Reguera, J.; Weber, F.; Cusack, S. Bunyaviridae RNA Polymerases (L-Protein) Have an N-Terminal, Influenza-like Endonuclease Domain, Essential for Viral Cap-Dependent Transcription. *PLoS Pathog.* **2010**, *6* (9), e1001101.
- (14) DuBois, R. M.; Slavish, P. J.; Baughman, B. M.; Yun, M.-K.; Bao, J.; Webby, R. J.; Webb, T. R.; White, S. W. Structural and Biochemical Basis for Development of Influenza Virus Inhibitors Targeting the PA Endonuclease. *PLoS Pathog* **2012**, *8* (8), e1002830.
- (15) Tomassini, J.; Selnick, H.; Davies, M. E.; Armstrong, M. E.; Baldwin, J.; Bourgeois, M.; Hastings, J.; Hazuda, D.; Lewis, J.; McClements, W. Inhibition of Cap (m7GpppXm)-Dependent Endonuclease of Influenza Virus by 4-Substituted 2,4-Dioxobutanoic Acid Compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38* (12), 2827–2837.
- (16) Summa, V.; Petrocchi, A.; Pace, P.; Matassa, V. G.; De Francesco, R.; Altamura, S.; Tomei, L.; Koch, U.; Neuner, P. Discovery of  $\alpha,\gamma$ -Diketo Acids as Potent Selective and Reversible Inhibitors of Hepatitis C Virus NS5b RNA-Dependent RNA Polymerase. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (1), 14–17.
- (17) Lee, C.; Lee, J. M.; Lee, N.-R.; Jin, B.-S.; Jang, K. J.; Kim, D.-E.; Jeong, Y.-J.; Chong, Y. Aryl Diketoacids (ADK) Selectively Inhibit Duplex DNA-Unwinding Activity of SARS Coronavirus NTPase/helicase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *19* (6), 1636–1638.
- (18) Bougie, I.; Charpentier, S.; Bisailon, M. Characterization of the Metal Ion Binding Properties of the Hepatitis C Virus RNA Polymerase. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (6), 3868–3875.
- (19) Shokova, E. A.; Kim, J. K.; Kovalev, V. V. 1,3-Diketones. Synthesis and Properties. *Russ. J. Org. Chem.* **2015**, *51* (6), 755–830.
- (20) Heath, R. J.; Rock, C. O. The Claisen Condensation in Biology. *Nat. Prod. Rep.* **2002**, *19* (5), 581–596.
- (21) Jiang, X.-H.; Song, L.-D.; Long, Y.-Q. Highly Efficient Preparation of Aryl  $\beta$ -Diketo Acids with Tert-Butyl Methyl Oxalate. *J. Org. Chem.* **2003**, *68* (19), 7555–7558.
- (22) Maurin, C.; Bailly, F.; Cotellet, P. Improved Preparation and Structural Investigation of 4-Aryl-4-Oxo-2-Hydroxy-2-Butenoic Acids and Methyl Esters. *Tetrahedron* **2004**, *60* (31), 6479–6486.
- (23) Banville, J.; Bouthillier, G.; Plamondon, S.; Remillard, R.; Meanwell, N. A.; Martel, A.; Walker, M. A. (Z)-2,2-Dimethyl-5-Carboxymethylene-1,3-Dioxolan-4-One: A New Synthone for the Synthesis of  $\alpha,\gamma$ -Diketoacid Derivatives. *Tetrahedron Lett.* **2010**, *51* (24), 3170–3173.
- (24) Oldfield, E.; Feng, X. Resistance-Resistant Antibiotics. *Trends Pharmacol. Sci.* **2014**, *35* (12), 664–674.

- (25) Van Boeckel, T. P.; Gandra, S.; Ashok, A.; Caudron, Q.; Grenfell, B. T.; Levin, S. A.; Laxminarayan, R. Global Antibiotic Consumption 2000 to 2010: An Analysis of National Pharmaceutical Sales Data. *Lancet Infect. Dis.* **2015**, *14* (8), 742–750.
- (26) Laxminarayan, R. Antibiotic Effectiveness: Balancing Conservation against Innovation. *Science* **2014**, *345* (6202), 1299–1301.
- (27) Drlica, K.; Malik, M.; Kerns, R. J.; Zhao, X. Quinolone-Mediated Bacterial Death. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52* (2), 385–392.
- (28) Floss, H. G.; Yu, T.-W. Rifamycin Mode of Action, Resistance, and Biosynthesis. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (2), 621–632.
- (29) Kahne, D.; Leimkuhler, C.; Lu, W.; Walsh, C. Glycopeptide and Lipoglycopeptide Antibiotics. *Chem. Rev.* **2005**, *105* (2), 425–448.
- (30) Nissen, P.; Hansen, J.; Ban, N.; Moore, P. B.; Steitz, T. A. The Structural Basis of Ribosome Activity in Peptide Bond Synthesis. *Science* **2000**, *289* (5481), 920–930.
- (31) Keith, C. T.; Borisy, A. A.; Stockwell, B. R. Multicomponent Therapeutics for Networked Systems. *Nat Rev Drug Discov* **2005**, *4* (1), 71–78.
- (32) Kohanski, M. a; Dwyer, D. J.; Collins, J. J. How Antibiotics Kill Bacteria: From Targets to Networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8* (6), 423–435.
- (33) Kohanski, M. A.; Dwyer, D. J.; Hayete, B.; Lawrence, C. A.; Collins, J. J. A Common Mechanism of Cellular Death Induced by Bactericidal Antibiotics. *Cell* **2007**, *130* (5), 797–810.
- (34) Köhler, T.; Pechère, J.-C.; Plésiat, P. Bacterial Antibiotic Efflux Systems of Medical Importance. *Cell. Mol. Life Sci. C.* **1999**, *56* (9-10), 771–778.
- (35) Neyfakh, A. A. Mystery of Multidrug Transporters: The Answer Can Be Simple. *Mol. Microbiol.* **2002**, *44* (5), 1123–1130.
- (36) Patel, D.; Kosmidis, C.; Seo, S. M.; Kaatz, G. W. Ethidium Bromide MIC Screening for Enhanced Efflux Pump Gene Expression or Efflux Activity in *Staphylococcus Aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54* (12), 5070–5073.
- (37) FDA. Guidance for Industry Codevelopment of Two or More New Investigational Drugs for Use in Combination Guidance for Industry Codevelopment of Two or More New Investigational Drugs for Use in Combination. June **2013**.
- (38) Oldfield, E.; Lin, F.-Y. Terpene Biosynthesis: Modularity Rules. *Angew. Chemie Int. Ed.* **2012**, *51* (5), 1124–1137.
- (39) Liu, C.-I.; Liu, G. Y.; Song, Y.; Yin, F.; Hensler, M. E.; Jeng, W.-Y.; Nizet, V.; Wang, A. H.-J.; Oldfield, E. A Cholesterol Biosynthesis Inhibitor Blocks *Staphylococcus Aureus* Virulence. *Science* **2008**, *319* (5868), 1391–1394.

- (40) Zhang, Y.; Fu-Yang Lin; Li, K.; Zhu, W.; Liu, Y.; Cao, R.; Pang, R.; Lee, E.; Axelson, J.; Hensler, M.; Wang, K.; Molohon, K. J.; Wang, Y.; Mitchell, D. A.; Nizet, V.; Oldfield, E. HIV-1 Integrase Inhibitor-Inspired Antibacterials Targeting Isoprenoid Biosynthesis. *ACS Med. Chem. Lett.* **2012**, 3 (5), 402–406.
- (41) Zhu, W.; Zhang, Y.; Sinko, W.; Hensler, M. E.; Olson, J.; Molohon, K. J.; Lindert, S.; Cao, R.; Li, K.; Wang, K.; Wang, Y.; Liu, Y.-L.; Sankovsky, A.; de Oliveira, C. A. F.; Mitchell, D. a; Nizet, V.; McCammon, J. A.; Oldfield, E. Antibacterial Drug Leads Targeting Isoprenoid Biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2013**, 110 (1), 123–128.
- (42) Apfel, C. M.; Takács, B.; Fountoulakis, M.; Stieger, M.; Keck, W. Use of Genomics To Identify Bacterial Undecaprenyl Pyrophosphate Synthetase: Cloning, Expression, and Characterization of the Essential *uppS* Gene. *J. Bacteriol.* **1999**, 181 (2), 483–492.
- (43) Guo, R.-T.; Cao, R.; Liang, P.-H.; Ko, T.-P.; Chang, T.-H.; Hudock, M. P.; Jeng, W.-Y.; Chen, C. K.-M.; Zhang, Y.; Song, Y.; Kuo, C.-J.; Yin, F.; Oldfield, E.; Wang, A. H.-J. Bisphosphonates Target Multiple Sites in Both Cis- and Trans-Prenyltransferases. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2007**, 104 (24), 10022–10027.
- (44) Song, Y.; Lin, F.-Y.; Yin, F.; Hensler, M.; Rodríguez Poveda, C. A.; Mukkamala, D.; Cao, R.; Wang, H.; Morita, C. T.; González Pacanowska, D.; Nizet, V.; Oldfield, E. Phosphonosulfonates Are Potent, Selective Inhibitors of Dehydrosqualene Synthase and Staphyloxanthin Biosynthesis in *Staphylococcus Aureus*. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (4), 976–988.
- (45) Sato, M.; Kawakami, H.; Motomura, T.; Aramaki, H.; Matsuda, T.; Yamashita, M. Quinolone Carboxylic Acids as a Novel Monoketo Acid Class of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase Inhibitors. **2009**, 4869–4882.
- (46) Grobler, J. A.; Stillmock, K.; Hu, B.; Witmer, M.; Felock, P.; Espeseth, A. S.; Wolfe, A.; Egbertson, M.; Bourgeois, M.; Melamed, J.; Wai, J. S.; Young, S.; Vacca, J.; Hazuda, D. J. Diketo Acid Inhibitor Mechanism and HIV-1 Integrase: Implications for Metal Binding in the Active Site of Phosphotransferase Enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2002**, 99 (10), 6661–6666.
- (47) Hare, S.; Smith, S. J.; Métifiot, M.; Jaxa-Chamiec, A.; Pommier, Y.; Hughes, S. H.; Cherepanov, P. Structural and Functional Analyses of the Second-Generation Integrase Strand Transfer Inhibitor Dolutegravir (S/GSK1349572). *Mol. Pharmacol.* **2011**, 80 (4), 565–572.
- (48) Wang, J.-H.; Ling, H.; Yang, W.; Craigie, R. Structure of a Two-Domain Fragment of HIV-1 Integrase: Implications for Domain Organization in the Intact Protein. *EMBO J.* **2001**, 20 (24), 7333–7343.
- (49) Song, Y.; Liu, C.-I.; Lin, F.-Y.; No, J. H.; Hensler, M.; Liu, Y.-L.; Jeng, W.-Y.; Low, J.; Liu, G. Y.; Nizet, V.; Wang, A. H.-J.; Oldfield, E. Inhibition of Staphyloxanthin Virulence Factor Biosynthesis in *Staphylococcus Aureus*: In Vitro, in Vivo, and Crystallographic Results. *J. Med. Chem.* **2009**, 52 (13), 3869–3880.

- (50) Masood, M. M.; Pillalamarri, V. K.; Irfan, M.; Aneja, B. RSC Advances Diketo Acids and Their Amino Acid / Dipeptidic Analogues as Promising Scaffoldolds for the Development of Bacterial Methionine Aminopeptidase Inhibitors. *RSC Adv.* **2015**, *5* (2), 34173–34183.
- (51) Rose, J. A.; Lahiri, S. D.; McKinney, D. C.; Albert, R.; Morningstar, M. L.; Shapiro, A. B.; Fisher, S. L.; Fleming, P. R. Novel Broad-Spectrum Inhibitors of Bacterial Methionine Aminopeptidase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2015**, *25* (16), 3301–3306.
- (52) van Herk, T.; Brussee, J.; van den Nieuwendijk, A. M. C. H.; van der Klein, P. A. M.; IJzerman, A. P.; Stannek, C.; Burmeister, A.; Lorenzen, A. Pyrazole Derivatives as Partial Agonists for the Nicotinic Acid Receptor. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (18), 3945–3951.
- (53) Frank, A. O.; Feldkamp, M. D.; Kennedy, J. P.; Waterson, A. G.; Pelz, N. F.; Patrone, J. D.; Vangamudi, B.; Camper, D. V.; Rossanese, O. W.; Chazin, W. J.; Fesik, S. W. Discovery of a Potent Inhibitor of Replication Protein A Protein–Protein Interactions Using a Fragment-Linking Approach. *J. Med. Chem.* **2013**, *56* (22), 9242–9250.
- (54) Liu, G.; Xin, Z.; Pei, Z.; Hajduk, P. J.; Abad-Zapatero, C.; Hutchins, C. W.; Zhao, H.; Lubben, T. H.; Ballaron, S. J.; Haasch, D. L.; Kaszubska, W.; Rondinone, C. M.; Trevillyan, J. M.; Jirousek, M. R. Fragment Screening and Assembly: A Highly Efficient Approach to a Selective and Cell Active Protein Tyrosine Phosphatase 1B Inhibitor. *J. Med. Chem.* **2003**, *46* (20), 4232–4235.
- (55) Sechi, M.; Innocenti, A.; Pala, N.; Rogolino, D.; Carcelli, M.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Inhibition of  $\alpha$ -Class Cytosolic Human Carbonic Anhydrases I, II, IX and XII, and  $\beta$ -Class Fungal Enzymes by Carboxylic Acids and Their Derivatives: New Isoform-I Selective Nanomolar Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2012**, *22* (18), 5801–5806.
- (56) Knorr, L. Einwirkung von Acetessigester Auf Phenylhydrazin. *Berichte der Dtsch. Chem. Gesellschaft* **1883**, *16* (2), 2597–2599.
- (57) Gharbaoui, T.; Skinner, P. J.; Shin, Y.-J.; Averbuj, C.; Jung, J.-K.; Johnson, B. R.; Duong, T.; Decaire, M.; Uy, J.; Cherrier, M. C.; Webb, P. J.; Tamura, S. Y.; Zou, N.; Rodriguez, N.; Boatman, P. D.; Sage, C. R.; Lindstrom, A.; Xu, J.; Schrader, T. O.; Smith, B. M.; Chen, R.; Richman, J. G.; Connolly, D. T.; Colletti, S. L.; Tata, J. R.; Semple, G. Agonist Lead Identification for the High Affinity Niacin Receptor GPR109a. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2007**, *17* (17), 4914–4919.
- (58) Gong, Y.; Liu, C.; Wen, H.; Yan, L.; Xiong, Z.; Ding, L. Structural Diversity and Properties of M(II) Phenyl Substituted Pyrazole Carboxylate Complexes with 0D-, 1D-, 2D- and 3D Frameworks. *New J. Chem.* **2011**, *35* (4), 865–875.
- (59) Doma, A.; Kulkarni, R.; Palakodety, R.; Sastry, G. N.; Sridhara, J.; Garlapati, A. Pyrazole Derivatives as Potent Inhibitors of c-Jun N-Terminal Kinase: Synthesis and SAR Studies. *Bioorg. Med. Chem.* **2014**, *22* (21), 6209–6219.

- (60) Ermolenko, M. S.; Guillou, S.; Janin, Y. L. Pyrazole-3/5-Carboxylic Acids from 3/5-Trifluoromethyl NH-Pyrazoles. *Tetrahedron* **2013**, *69* (1), 257–263.
- (61) Supuran, C. T. Carbonic Anhydrases: Novel Therapeutic Applications for Inhibitors and Activators. *Nat Rev Drug Discov* **2008**, *7* (2), 168–181.
- (62) Innocenti, A.; Vullo, D.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Inhibitors: Interactions of Phenols with the 12 Catalytically Active Mammalian Isoforms (CA I–XIV). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (5), 1583–1587.
- (63) Ekinçi, D.; Beydemir, Ş.; Küfrevioğlu, O. I. In Vitro Inhibitory Effects of Some Heavy Metals on Human Erythrocyte Carbonic Anhydrases. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **2007**, *22* (6), 745–750.
- (64) Alterio, V.; Di Fiore, A.; D’Ambrosio, K.; Supuran, C. T.; De Simone, G.; D’Ambrosio, K.; Supuran, C. T.; De Simone, G. Multiple Binding Modes of Inhibitors to Carbonic Anhydrases: How to Design Specific Drugs Targeting 15 Different Isoforms? *Chem. Rev.* **2012**, *112* (8), 4421–4468.
- (65) Domsic, J. F.; Avvaru, B. S.; Kim, C. U.; Gruner, S. M.; Agbandje-McKenna, M.; Silverman, D. N.; McKenna, R. Entrapment of Carbon Dioxide in the Active Site of Carbonic Anhydrase II. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (45), 30766–30771.
- (66) Silverman, D. N.; McKenna, R. Solvent-Mediated Proton Transfer in Catalysis by Carbonic Anhydrase. *Acc. Chem. Res.* **2007**, *40* (8), 669–675.
- (67) Aggarwal, M.; Kondeti, B.; Tu, C.; Maupin, C. M.; Silverman, D. N.; McKenna, R. Structural Insight into Activity Enhancement and Inhibition of H64A Carbonic Anhydrase II by Imidazoles. *IUCrJ* **2014**, *1* (2), 129–135.
- (68) Jewell, D. A.; Tu, C.; Paranawithana, S. R.; Tanhauser, S. M.; LoGrasso, P. V.; Laipis, P. J.; Silverman, D. N. Enhancement of the Catalytic Properties of Human Carbonic Anhydrase III by Site-Directed Mutagenesis. *Biochemistry* **1991**, *30* (6), 1484–1490.
- (69) McDonald, P. C.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T.; Dedhar, S. Recent Developments in Targeting Carbonic Anhydrase IX for Cancer Therapeutics. *Oncotarget* **2012**, *3* (1), 84–97.
- (70) Thiry, A.; Dogné, J.-M.; Masereel, B.; Supuran, C. T. Targeting Tumor-Associated Carbonic Anhydrase IX in Cancer Therapy. *Trends Pharmacol. Sci.* **2006**, *27* (11), 566–573.
- (71) Gieling, R. G.; Williams, K. J. Carbonic Anhydrase IX as a Target for Metastatic Disease. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (6), 1470–1476.
- (72) Alterio, V.; Vitale, R. M.; Monti, S. M.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Cecchi, A.; De Simone, G.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Inhibitors: X-Ray and Molecular Modeling Study for the Interaction of a Fluorescent Antitumor Sulfonamide with Isozyme II and IX. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, *128* (25), 8329–8335.



- (73) Lou, Y.; McDonald, P. C.; Oloumi, A.; Chia, S.; Ostlund, C.; Ahmadi, A.; Kyle, A.; Auf dem Keller, U.; Leung, S.; Huntsman, D.; Clarke, B.; Sutherland, B. W.; Waterhouse, D.; Bally, M.; Roskelley, C.; Overall, C. M.; Minchinton, A.; Pacchiano, F.; Carta, F.; Scozzafava, A.; Touisni, N.; Winum, J.-Y.; Supuran, C. T.; Dedhar, S. Targeting Tumor Hypoxia: Suppression of Breast Tumor Growth and Metastasis by Novel Carbonic Anhydrase IX Inhibitors. *Cancer Res.* **2011**, *71* (9), 3364–3376.
- (74) Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. N-Hydroxyurea-a Versatile Zinc Binding Function in the Design of Metalloenzyme Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2006**, *16* (16), 4316–4320.
- (75) Barrese Albert A.; Genis, C.; Fisher, S. Z.; Orwenyo, J. N.; Kumara, M. T.; Dutta, S. K.; Phillips, E.; Kiddle, J. J.; Tu, C.; Silverman, D. N.; Govindasamy, L.; Agbandje-McKenna, M.; McKenna, R.; Tripp, B. C. Inhibition of Carbonic Anhydrase II by Thioxolone: A Mechanistic and Structural Study. *Biochemistry* **2008**, *47* (10), 3174–3184.
- (76) Mangani, S.; Hakansson, K. Crystallographic Studies of the Binding of Protonated and Unprotonated Inhibitors to Carbonic Anhydrase Using Hydrogen Sulphide and Nitrate Anions. *Eur. J. Biochem.* **1992**, *210* (3), 867–871.
- (77) Di Fiore, A.; Truppo, E.; Supuran, C. T.; Alterio, V.; Dathan, N.; Bootorabi, F.; Parkkila, S.; Monti, S. M.; Simone, G. De. Crystal Structure of the C183S/C217S Mutant of Human CA VII in Complex with Acetazolamide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (17), 5023–5026.
- (78) Abbate, F.; Supuran, C. T.; Scozzafava, A.; Orioli, P.; Stubbs, M. T.; Klebe, G. Nonaromatic Sulfonamide Group as an Ideal Anchor for Potent Human Carbonic Anhydrase Inhibitors: Role of Hydrogen-Bonding Networks in Ligand Binding and Drug Design. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (17), 3583–3587.
- (79) Lo, Y. S.; Nolan, J. C.; Maren, T. H.; Welstead, W. J.; Gripshover, D. F.; Shamblee, D. A. Synthesis and Physicochemical Properties of Sulfamate Derivatives as Topical Antiglaucoma Agents. *J. Med. Chem.* **1992**, *35* (26), 4790–4794.
- (80) Davis, R. A.; Hofmann, A.; Osman, A.; Hall, R. A.; Mühlischlegel, F. A.; Vullo, D.; Innocenti, A.; Supuran, C. T.; Poulsen, S.-A. Natural Product-Based Phenols as Novel Probes for Mycobacterial and Fungal Carbonic Anhydrases. *J. Med. Chem.* **2011**, *54* (6), 1682–1692.
- (81) Carta, F.; Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Kaila, K.; Supuran, C. T. Polyamines Inhibit Carbonic Anhydrases by Anchoring to the Zinc-Coordinated Water Molecule. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (15), 5511–5522.
- (82) Maresca, A.; Temperini, C.; Vu, H.; Pham, N. B.; Poulsen, S.-A.; Scozzafava, A.; Quinn, R. J.; Supuran, C. T. Non-Zinc Mediated Inhibition of Carbonic Anhydrases: Coumarins Are a New Class of Suicide Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (8), 3057–3062.

- (83) Maresca, A.; Temperini, C.; Pochet, L.; Masereel, B.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. Deciphering the Mechanism of Carbonic Anhydrase Inhibition with Coumarins and Thiocoumarins. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (1), 335–344.
- (84) Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Parkkila, S.; Supuran, C. T. The Coumarin-Binding Site in Carbonic Anhydrase Accommodates Structurally Diverse Inhibitors: The Antiepileptic Lacosamide As an Example and Lead Molecule for Novel Classes of Carbonic Anhydrase Inhibitors. *J. Med. Chem.* **2010**, *53* (2), 850–854.
- (85) Maresca, A.; Scozzafava, A.; Supuran, C. T. 7,8-Disubstituted- but Not 6,7-Disubstituted Coumarins Selectively Inhibit the Transmembrane, Tumor-Associated Carbonic Anhydrase Isoforms IX and XII over the Cytosolic Ones I and II in the Low Nanomolar/subnanomolar Range. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (24), 7255–7258.
- (86) Maresca, A.; Supuran, C. T. Coumarins Incorporating Hydroxy- and Chloro-Moieties Selectively Inhibit the Transmembrane, Tumor-Associated Carbonic Anhydrase Isoforms IX and XII over the Cytosolic Ones I and II. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2010**, *20* (15), 4511–4514.
- (87) D'Ambrosio, K.; Carradori, S.; Monti, S. M.; Buonanno, M.; Secci, D.; Vullo, D.; Supuran, C. T.; De Simone, G. Out of the Active Site Binding Pocket for Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Chem. Commun.* **2015**, *51* (2), 302–305.
- (88) Langella, E.; D'Ambrosio, K.; D'Ascenzio, M.; Carradori, S.; Monti, S.; Supuran, C. T.; De Simone, G. A Combined Crystallographic and Theoretical Study Explains the Capability of Carboxylic Acids To Adopt Multiple Binding Modes Within Carbonic Anhydrase Active Site. *Chem. - A Eur. J.* **2016**, *22*, 97–100.
- (89) Kerns, E. H.; Di, L. Physicochemical Profiling: Overview of the Screens. *Drug Discov. Today. Technol.* **2004**, *1* (4), 343–348.
- (90) Avdeef, A. Physicochemical Profiling (Solubility, Permeability and Charge State). *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2001, pp 277–351.
- (91) Amidon, G.; Lennernäs, H.; Shah, V.; Crison, J. A Theoretical Basis for a Biopharmaceutic Drug Classification: The Correlation of in Vitro Drug Product Dissolution and in Vivo Bioavailability. *Pharm. Res.* **1995**, *12* (3), 413–420.
- (92) Avdeef, A. Charge State and the pKa. In *Absorption and Drug Development. Solubility, Permeability and Charge State*; John Wiley & Sons, Inc., 2012; pp 32–33.
- (93) Asokan, A.; Cho, M. J. Exploitation of Intracellular pH Gradients in the Cellular Delivery of Macromolecules. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91* (4), 903–913.
- (94) Avdeef, A.; Comer, J. E. A.; Thomson, S. J. pH-Metric Log P. 3. Glass Electrode Calibration in Methanol-Water, Applied to pKa Determination of Water-Insoluble Substances. *Anal. Chem.* **1993**, *65* (1), 42–49.
- (95) Gans, P. GLEE, a New Computer Program for Glass Electrode Calibration. *Talanta* **2000**, *51* (1), 33–37.

- (96) Avdeef, A.; Bucher, J. J. Accurate Measurements of the Concentration of Hydrogen Ions with a Glass Electrode: Calibrations Using the Prideaux and Other Universal Buffer Solutions and a Computer-Controlled Automatic Titrator. *Anal. Chem.* **1978**, *50* (14), 2137–2142.
- (97) Bjerrum Jonas. *Metal - Ammine Formation in Aqueous Solution*; Haase, Copenhagen, 1941.
- (98) Gans, P.; Sabatini, A.; Vacca A. Investigation of Equilibria in Solution. Determination of Equilibrium Constants with the HYPERQUAD Suite of Programs. *Talanta* **1996**, *43* (10), 1739–1753.
- (99) Serjeant, E. P.; Albert, A. *The Determination of Ionization Constants: A Laboratory Manual*, 2nd ed.; Chapman and Hall: London, 1971.
- (100) Tam, K. Y.; Takács-Novák, K. Multi-Wavelength Spectrophotometric Determination of Acid Dissociation Constants: A Validation Study. *Anal. Chim. Acta* **2001**, *434* (1), 157–167.
- (101) Rabenstein, D. L.; Sayer, T. L. Determination of Microscopic Acid Dissociation Constants by Nuclear Magnetic Resonance Spectrometry. *Anal. Chem.* **1976**, *48* (8), 1141–1146.
- (102) Oumada, F. Z.; Ràfols, C.; Rosés, M.; Bosch, E. Chromatographic Determination of Aqueous Dissociation Constants of Some Water-Insoluble Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs. *J. Pharm. Sci.* **2002**, *91* (4), 991–999.
- (103) Cabot, J. M.; Fuguet, E.; Rosés, M. Internal Standard Capillary Electrophoresis as a High-Throughput Method for pKa Determination in Drug Discovery and Development. *ACS Comb. Sci.* **2014**, *16* (10), 518–525.
- (104) Verbić, T. Ž.; Drakulić, B. J.; Zloh, M.; Juranić, I. O. The Effect of Phenyl Substituents on C-13 NMR Shifts and Metal Ions Binding to 4-Phenyl-2,4-Dioxobutanoic Acid Derivatives. *Lett. Org. Chem.* **2008**, *5* (8), 692–699.
- (105) P. Job. Formation and Stability of Inorganic Complexes in Solution. *Ann. di Chim. Appl.* **1928**, *9*, 113–203.
- (106) Renny, J. S.; Tomasevich, L. L.; Tallmadge, E. H.; Collum, D. B. Method of Continuous Variations: Applications of Job Plots to the Study of Molecular Associations in Organometallic Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2013**, *52* (46), 11998–12013.
- (107) Yoe, J. H.; Jones, A. L. Colorimetric Determination of Iron with Disodium-1,2-Dihydroxybenzene-3,5-Disulfonate. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* **1944**, *16* (2), 111–115.
- (108) Rose, N. J.; Drago, R. S. Molecular Addition Compounds of Iodine. I. An Absolute Method for the Spectroscopic Determination of Equilibrium Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **1959**, *81* (23), 6138–6141.
- (109) Hirose, K. A Practical Guide for the Determination of Binding Constants. *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* **2001**, *39*, 193–209.

- (110) Bruneau, E.; Lavabre, D.; Levy, G.; Micheau, J. C. Quantitative Analysis of Continuous-Variation Plots with a Comparison of Several Methods: Spectrophotometric Study of Organic and Inorganic 1:1 Stoichiometry Complexes. *J. Chem. Educ.* **1992**, *69* (10), 833.
- (111) Gupta, L.; Hoepker, A. C.; Ma, Y.; Viciu, M. S.; Faggin, M. F.; Collum, D. B. Lithium Diisopropylamide-Mediated Ortholithiation of 2-Fluoropyridines: Rates, Mechanisms, and the Role of Autocatalysis. *J. Org. Chem.* **2013**, *78* (9), 4214–4230.
- (112) Sayago, A.; Boccio, M.; Asuero, A. G. Continuous Variation Data: 1:1 or 2:2 Weak Complexes? *Int. J. Pharm.* **2005**, *295* (1-2), 29–34.
- (113) Boccio, M.; Sayago, A.; Asuero, A. G. A Bilogarithmic Method for the Spectrophotometric Evaluation of Stability Constants of 1:1 Weak Complexes from Mole Ratio Data. *Int. J. Pharm.* **2006**, *318* (1-2), 70–77.
- (114) Milletti, F.; Vulpetti, A. Tautomer Preference in PDB Complexes and Its Impact on Structure-Based Drug Discovery. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50* (6), 1062–1074.
- (115) Billamboz, M.; Bailly, F.; Barreca, M. L.; De Luca, L.; Mouscadet, J.-F.; Calmels, C.; Andréola, M.-L.; Witvrouw, M.; Christ, F.; Debyser, Z.; Cotelle, P. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Series of 2-Hydroxyisoquinoline-1,3(2H,4H)-Diones as Dual Inhibitors of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Integrase and the Reverse Transcriptase RNase H Domain. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (24), 7717–7730.
- (116) Brecker, L.; Pogorevc, M.; Griengl, H.; Steiner, W.; Kappe, T.; Ribbons, D. W. Synthesis of 2,4-Diketoacids and Their Aqueous Solution Structures. *New J. Chem.* **1999**, *23* (4), 437–446.
- (117) Sigalov, M. V. Keto–Enol Tautomerism of Phenindione and Its Derivatives: An NMR and Density Functional Theory (DFT) Reinvestigation. *J. Phys. Chem. A* **2015**, *119* (8), 1404–1414.
- (118) Ferrari, E.; Saladini, M.; Pignedoli, F.; Spagnolo, F.; Benassi, R. Solvent Effect on Keto-Enol Tautomerism in a New  $\beta$ -Diketone: A Comparison between Experimental Data and Different Theoretical Approaches. *New J. Chem.* **2011**, *35* (12), 2840–2847.
- (119) Verbić, T. Ž. Proučavanje protolitičkih ravnoteža i korelacije strukture i osobina 4-aril-2,4-dioksobutanskih kiselina, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, 2010.
- (120) Huang, M.; Richards, W. G.; Grant, G. H. Diketoacid HIV-1 Integrase Inhibitors: An Ab Initio Study. *J. Phys. Chem. A* **2005**, *109* (23), 5198–5202.
- (121) Miertuš, S.; Scrocco, E.; Tomasi, J. Electrostatic Interaction of a Solute with a Continuum. A Direct Utilization of AB Initio Molecular Potentials for the Prevision of Solvent Effects. *Chem. Phys.* **1981**, *55* (1), 117–129.
- (122) Kerdcharoen, T.; Morokuma, K. ONIOM-XS: An Extension of the ONIOM Method for Molecular Simulation in Condensed Phase. *Chem. Phys. Lett.* **2002**, *355* (3-4), 257–262.
- (123) ADMET Predictor. Simulations Plus, Inc 2014.

- (124) Zhang, X.-Y.; Liu, W.; Tang, W.; Lai, Y.-B. 3-Phenyl-1H-Pyrazole-5-Carboxylic Acid. *Acta Crystallogr. Sect. E Struct. Reports Online* **2007**, *63* (9), o3764–o3764.
- (125) Li, P.; Zhang, Y.; Wang, Y.; Wang, Y.; Li, H. Luminescent europium(III)- $\beta$ -Diketonate Complexes Hosted in Nanozeolite L as Turn-on Sensors for Detecting Basic Molecules. *Chem. Commun.* **2014**, *50* (89), 13680–13682.
- (126) Ko, S.-B.; Park, H.-J.; Gong, S.; Wang, X.; Lu, Z.-H.; Wang, S. Blue Phosphorescent N-Heterocyclic Carbene Chelated Pt(II) Complexes with an  $\alpha$ -Duryl- $\beta$ -Diketonato Ancillary Ligand. *Dalt. Trans.* **2015**, *44* (18), 8433–8443.
- (127) Wang, Y.-F.; Chiba, S. Mn(III)-Mediated Reactions of Cyclopropanols with Vinyl Azides: Synthesis of Pyridine and 2-Azabicyclo[3.3.1]non-2-En-1-ol Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131* (35), 12570–12572.
- (128) Maehama, S. Catalysts with High Water Resistance and Low Environmental Load for Manufacture of Polyurethanes. JP 2014234392, 2014.
- (129) Liu, R.; Conradie, J. Tris( $\beta$ -diketonato)chromium(III) Complexes: Effect of the  $\beta$ -Diketonate Ligand on the Redox Properties. *Electrochim. Acta* **2015**, *185*, 288–296.
- (130) Freitag, R.; Conradie, J. Electrochemical and Computational Chemistry Study of Mn( $\beta$ -diketonato)<sub>3</sub> Complexes. *Electrochim. Acta* **2015**, *158*, 418–426.
- (131) Kemp, K. C.; Fourie, E.; Conradie, J.; Swarts, J. C. Ruthenocene-Containing  $\beta$ -Diketones: Synthesis, pK<sub>a</sub>' Values, Keto–enol Isomerization Kinetics, and Electrochemical Aspects. *Organometallics* **2008**, *27* (3), 353–362.
- (132) Iglesias, E. Enolization of Benzoylacetone in Aqueous Surfactant Solutions: A Novel Method for Determining Enolization Constants. *J. Phys. Chem.* **1996**, *100* (30), 12592–12599.
- (133) Kuhn, A.; von Eschwege, K. G.; Conradie, J. Electrochemical and Density Functional Theory Modeled Reduction of Enolized 1,3-Diketones. *Electrochim. Acta* **2011**, *56* (17), 6211–6218.
- (134) Posyagin, G. S.; Posyagina, E. Y.; Zalesov, V. V.; Kataev, S. S. Polarographic Behavior of Methyl 4-Aryl-2,4-Dioxobutanoates. *Russ. J. Gen. Chem.* **2001**, *71* (10), 1574–1577.
- (135) Crum-Brown, A.; Fraser, T. R. On the Connection between Chemical Constitution and Physiological Action. Part 1. On the Physiological Action of the Ammonium Bases, Derived from Strychia, Brucia, Thebaia, Codeia, Morphia and Nicotia. *Trans. Roy. Soc. Edinburgh.* **1868**, *25*, 151–203.
- (136) Meyer, H. Lipoid Theorie Der Narkose. *Arch. Exp. Path. Pharm* **1899**, *42*, 109–118.
- (137) Overton, E.; (Zurich), U. *Studien Uber die Narkose, zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie*; Gustav Fischer: Jena, 1901.
- (138) Hansch, C.; Maloney, P. P.; Fujita, T.; Muir, R. M. Correlation of Biological Activity of Phenoxyacetic Acids with Hammett Substituent Constants and Partition Coefficients. *Nature* **1962**, *194* (4824), 178–180.

- (139) Dossetter, A. G.; Griffen, E. J.; Leach, A. G. Matched Molecular Pair Analysis in Drug Discovery. *Drug Discov. Today* **2013**, *18* (15-16), 724–731.
- (140) Clark, M.; Cramer, R. D. The Probability of Chance Correlation Using Partial Least Squares (PLS). *Quant. Struct. Relationships* **1993**, *12* (2), 137–145.
- (141) Caron, G.; Nurisso, A.; Ermondi, G. How to Extend the Use of Grid-Based Interaction Energy Maps from Chemistry to Biotopics. *ChemMedChem* **2009**, *4* (1), 29–36.
- (142) Pastor, M.; Cruciani, G.; McLay, I.; Pickett, S.; Clementi, S. GRid-INdependent Descriptors (GRIND): A Novel Class of Alignment-Independent Three-Dimensional Molecular Descriptors. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (17), 3233–3243.
- (143) Goodford, P. J. A Computational Procedure for Determining Energetically Favorable Binding Sites on Biologically Important Macromolecules. *J. Med. Chem.* **1985**, *28* (7), 849–857.
- (144) Goodford, P. The Basic Principles of GRID. In *Molecular Interaction Fields*; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2005; pp 1–25.
- (145) Klebe, G.; Abraham, U.; Mietzner, T. Molecular Similarity Indices in a Comparative Analysis (CoMSIA) of Drug Molecules to Correlate and Predict Their Biological Activity. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (24), 4130–4146.
- (146) Cruciani, G.; Watson, K. A. Comparative Molecular Field Analysis Using GRID Force-Field and GOLPE Variable Selection Methods in a Study of Inhibitors of Glycogen Phosphorylase B. *J. Med. Chem.* **1994**, *37* (16), 2589–2601.
- (147) Abdi, H.; Williams, L. J. Principal Component Analysis. *Wiley Interdiscip. Rev. Comput. Stat.* **2010**, *2* (4), 433–459.
- (148) Cruciani, G.; Crivori, P.; Carrupt, P.-A.; Testa, B. Molecular Fields in Quantitative Structure–permeation Relationships: The VolSurf Approach. *J. Mol. Struct. THEOCHEM* **2000**, *503* (1-2), 17–30.
- (149) Fontaine, F.; Pastor, M.; Sanz, F. Incorporating Molecular Shape into the Alignment-Free GRid-INdependent Descriptors. *J. Med. Chem.* **2004**, *47* (11), 2805–2815.
- (150) Durán, Á.; Martínez, G. C.; Pastor, M. Development and Validation of AMANDA, a New Algorithm for Selecting Highly Relevant Regions in Molecular Interaction Fields. *J. Chem. Inf. Model.* **2008**, *48* (9), 1813–1823.
- (151) Clementi, S.; Cruciana, G.; Riganelli, D.; Valigi, R.; Constantino, G.; Baroni, M.; Wold, S. Autocorrelation as a Tool for a Congruent Description of Molecules in 3D-QSAR Studies. *Pharm. Pharmacol. Lett.* **1993**, *3* (1), 5–8.
- (152) Gibbons, S.; Udo, E. E. The Effect of Reserpine, a Modulator of Multidrug Efflux Pumps, on the in Vitro Activity of Tetracycline against Clinical Isolates of Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus (MRSA) Possessing the tet(K) Determinant. *Phyther. Res.* **2000**, *14* (2), 139–140.

- (153) Ross, J. I.; Farrell, A. M.; Eady, E. A.; Cove, J. H.; Cunliffe, W. J. Characterisation and Molecular Cloning of the Novel Macrolide-Streptogramin B Resistance Determinant from *Staphylococcus Epidermidis*. *J. Antimicrob. Chemother.* **1989**, *24* (6), 851–862.
- (154) Richardson, J. F.; Reith, S. Characterization of a Strain of Methicillin-Resistant *Staphylococcus Aureus* (EMRSA-15) by Conventional and Molecular Methods. *J. Hosp. Infect.* **1993**, *25* (1), 45–52.
- (155) Kaatz, G. W.; Seo, S. M.; Ruble, C. A. Efflux-Mediated Fluoroquinolone Resistance in *Staphylococcus Aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1993**, *37* (5), 1086–1094.
- (156) Gibbons, S.; Oluwatuyi, M.; Kaatz, G. W. A Novel Inhibitor of Multidrug Efflux Pumps in *Staphylococcus Aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2003**, *51* (1), 13–17.
- (157) Verbić, T. Ž.; Drakulić, B. J.; Zloh, M. F.; Pecelj, J. R.; Popović, G. V.; Juranić, I. O. An LFER Study of the Protolytic Equilibria of 4-Aryl-2,4-Dioxobutanoic Acids in Aqueous Solutions. *J. Serb. Chem. Soc.* **2007**, *72* (12), 1201–1216.
- (158) Charton, M. Nature of the Ortho Effect. V. Ortho-Substituent Constants. *J. Am. Chem. Soc.* **1969**, *91* (24), 6649–6654.
- (159) Beiginejad, H.; Nematollahi, D.; Noroozi, M.; Lotfi, S. Electrochemical Oxidation and Adsorption of Hematoxylin at Glassy Carbon Electrode in Various pH Values. *J. Iran. Chem. Soc.* **2015**, *12* (2), 325–333.
- (160) Tesio, A. Y.; Robledo, S. N.; Fernández, H.; Zon, M. A. Electrochemical Oxidation of Butein at Glassy Carbon Electrodes. *Bioelectrochemistry* **2013**, *91*, 62–69.
- (161) Gunić, E.; Tabaković, I.; Gaši, K. M.; Miljković, D.; Juranić, I. Products and Mechanisms in the Anodic Oxidation of Solanidine-Type Steroidal Alkaloids. *J. Org. Chem.* **1994**, *59* (6), 1264–1269.
- (162) Swenson, E. R. Safety of Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Expert Opin. Drug Saf.* **2014**, *13* (4), 459–472.
- (163) Khalifah, R. G. The Carbon Dioxide Hydration Activity of Carbonic Anhydrase: I. Stop-Flow Kinetic Studies on the Native Human Isoenzymes B and C. *J. Biol. Chem.* **1971**, *246* (8), 2561–2573.
- (164) Zeng, L.-F.; Zhang, H.-S.; Wang, Y.-H.; Sanchez, T.; Zheng, Y.-T.; Neamati, N.; Long, Y.-Q. Efficient Synthesis and Utilization of Phenyl-Substituted Heteroaromatic Carboxylic Acids as Aryl Diketo Acid Isosteres in the Design of Novel HIV-1 Integrase Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (16), 4521–4524.
- (165) Lomenick, B.; Olsen, R. W.; Huang, J. Identification of Direct Protein Targets of Small Molecules. *ACS Chem. Biol.* **2011**, *6* (1), 34–46.

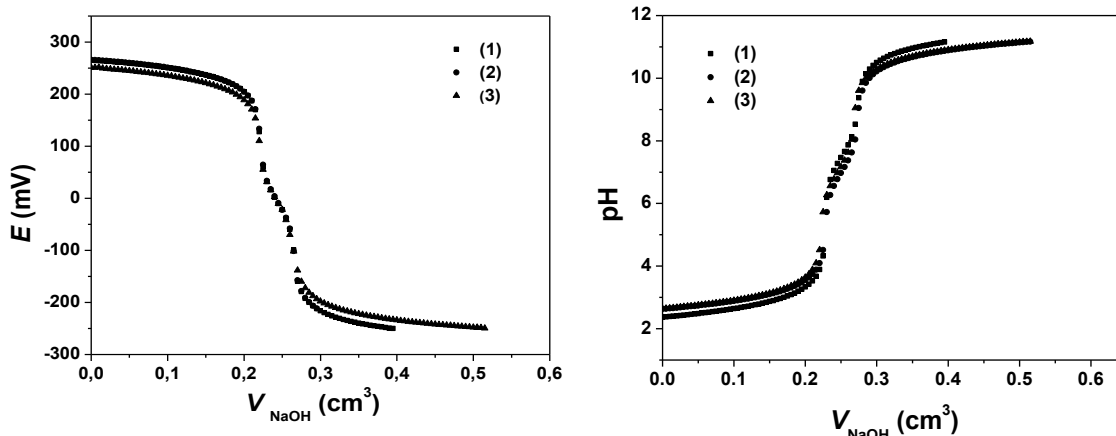
- (166) von Itzstein, M.; Wu, W.-Y.; Kok, G. B.; Pegg, M. S.; Dyason, J. C.; Jin, B.; Phan, T. Van; Smythe, M. L.; White, H. F.; Oliver, S. W.; Colman, P. M.; Varghese, J. N.; Ryan, D. M.; Woods, J. M.; Bethell, R. C.; Hotham, V. J.; Cameron, J. M.; Penn, C. R. Rational Design of Potent Sialidase-Based Inhibitors of Influenza Virus Replication. *Nature* **1993**, *363* (6428), 418–423.
- (167) Cvijetić, I. N.; Žižak, Ž. P.; Stanojković, T. P.; Juranić, Z. D.; Terzić, N.; Opsenica, I. M.; Opsenica, D. M.; Juranić, I. O.; Drakulić, B. J. An Alignment Independent 3D QSAR Study of the Antiproliferative Activity of 1,2,4,5-Tetraoxanes. *Eur. J. Med. Chem.* **2010**, *45*, 4570–4577.
- (168) Šolaja, B. A.; Terzić, N.; Pocsfalvi, G.; Gerena, L.; Tinant, B.; Opsenica, D.; Milhous, W. K. Mixed Steroidal 1,2,4,5-Tetraoxanes: Antimalarial and Antimycobacterial Activity. *J. Med. Chem.* **2002**, *45* (16), 3331–3336.
- (169) Opsenica, I.; Opsenica, D.; Smith, K. S.; Milhous, W. K.; Šolaja, B. A. Chemical Stability of the Peroxide Bond Enables Diversified Synthesis of Potent Tetraoxane Antimalarials. *J. Med. Chem.* **2008**, *51* (7), 2261–2266.
- (170) Opsenica, I.; Terzić, N.; Opsenica, D.; Milhous, W. K.; Šolaja, B. A. 7,8,15,16-Tetraoxa-Dispiro[5.2.5.2]Hexadecane-3-Carboxylic Acid Derivatives and Their Antimalarial Activity. *J. Serbian Chem. Soc.* **2004**, *69* (11), 919–922.
- (171) Terzić, N.; Opsenica, D.; Milić, D.; Tinant, B.; Smith, K. S.; Milhous, W. K.; Šolaja, B. A. Deoxycholic Acid-Derived Tetraoxane Antimalarials and Antiproliferatives. *J. Med. Chem.* **2007**, *50* (21), 5118–5127.
- (172) Opsenica, D.; Pocsfalvi, G.; Juranić, Z.; Tinant, B.; Declercq, J.-P.; Kyle, D. E.; Milhous, W. K.; Šolaja, B. A. Cholic Acid Derivatives as 1,2,4,5-Tetraoxane Carriers: Structure and Antimalarial and Antiproliferative Activity. *J. Med. Chem.* **2000**, *43* (17), 3274–3282.
- (173) Opsenica, D.; Angelovski, G.; Pocsfalvi, G.; Juranić, Z.; Žižak, Ž.; Kyle, D.; Milhous, W. K.; Šolaja, B. A. Antimalarial and Antiproliferative Evaluation of Bis-Steroidal Tetraoxanes. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, *11* (13), 2761–2768.
- (174) Pedretti, A.; Villa, L.; Vistoli, G. VEGA – An Open Platform to Develop Chemo-Bio-Informatics Applications, Using Plug-in Architecture and Script Programming. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2004**, *18* (3), 167–173.
- (175) Hawkins, P. C. D.; Skillman, A. G.; Warren, G. L.; Ellingson, B. A.; Stahl, M. T. Conformer Generation with OMEGA: Algorithm and Validation Using High Quality Structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50* (4), 572–584.
- (176) Rush, T. S.; Grant, J. A.; Mosyak, L.; Nicholls, A. A Shape-Based 3-D Scaffold Hopping Method and Its Application to a Bacterial Protein–Protein Interaction. *J. Med. Chem.* **2005**, *48* (5), 1489–1495.
- (177) Bajusz, D.; Rácz, A.; Héberger, K. Why Is Tanimoto Index an Appropriate Choice for Fingerprint-Based Similarity Calculations? *J. Cheminform.* **2015**, *7* (1), 1–13.
- (178) Golbraikh, A.; Tropsha, A. Beware of q<sup>2</sup>! *J. Mol. Graph. Model.* **2002**, *20* (4), 269–276.



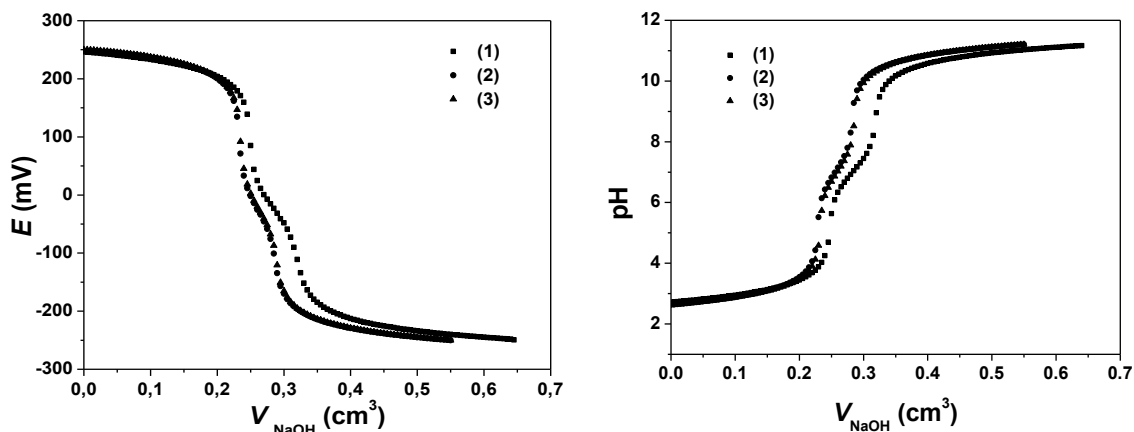
- (179) Kumar, V.; Kannan, K. K. Enzyme-Substrate Interactions. Structure of Human Carbonic Anhydrase I Complexed with Bicarbonate. *J. Mol. Biol.* **1994**, *241* (2), 226–232.
- (180) Güzel, O.; Temperini, C.; Innocenti, A.; Scozzafava, A.; Salman, A.; Supuran, C. T. Carbonic Anhydrase Inhibitors. Interaction of 2-(Hydrazinocarbonyl)-3-Phenyl-1H-Indole-5-Sulfonamide with 12 Mammalian Isoforms: Kinetic and X-Ray Crystallographic Studies. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2008**, *18* (1), 152–158.
- (181) Alterio, V.; Hilvo, M.; Di Fiore, A.; Supuran, C. T.; Pan, P.; Parkkila, S.; Scaloni, A.; Pastorek, J.; Pastorekova, S.; Pedone, C.; Scozzafava, A.; Monti, S. M.; De Simone, G. Crystal Structure of the Catalytic Domain of the Tumor-Associated Human Carbonic Anhydrase IX. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2009**, *106* (38), 16233–16238.
- (182) Whittington, D. A.; Waheed, A.; Ulmasov, B.; Shah, G. N.; Grubb, J. H.; Sly, W. S.; Christianson, D. W. Crystal Structure of the Dimeric Extracellular Domain of Human Carbonic Anhydrase XII, a Bitopic Membrane Protein Overexpressed in Certain Cancer Tumor Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2001**, *98* (17), 9545–9550.
- (183) Martin, D. P.; Cohen, S. M. Nucleophile Recognition as an Alternative Inhibition Mode for Benzoic Acid Based Carbonic Anhydrase Inhibitors. *Chem. Commun.* **2012**, *48* (43), 5259–5261.
- (184) Güzel-Akdemir, Ö.; Akdemir, A.; Isik, S.; Vullo, D.; Supuran, C. T. O-Benzenedisulfonimido-sulfonamides Are Potent Inhibitors of the Tumor-Associated Carbonic Anhydrase Isoforms CA IX and CA XII. *Bioorg. Med. Chem.* **2013**, *21* (6), 1386–1391.
- (185) European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID), Determination of Minimum Inhibitory Concentrations (MICs) of Antibacterial Agents by Broth Dilution. *Clin. Microbiol. Infect.* **2003**, *9* (8), ix – xv.
- (186) Frisch, M. J.; Trucks, G. W.; Schlegel, H. B.; Scuseria, G. E.; Robb, M. A.; Cheeseman, J. R.; Montgomery, J. A.; Vreven, T.; Kudin, K. N.; Burant, J. C.; Millam, J. M.; Iyengar, S. S.; Tomasi, J.; Barone, V.; Mennucci, B.; Cossi, M.; Scalmani, G.; Rega, N.; Petersson, G. A.; Nakatsuji, H.; Hada, M.; Ehara, M.; Toyota, K.; Fukuda, R.; Hasegawa, J.; Ishida, M.; Nakajima, T.; Honda, Y.; Kitao, O.; Nakai, H.; Klene, M.; Li, X.; Knox, J. E.; Hratchian, H. P.; Cross, J. B.; Bakken, V.; Adamo, C.; Jaramillo, J.; Gomperts, R.; Stratmann, R. E.; Yazyev, O.; Austin, A. J.; Cammi, R.; Pomelli, C.; Ochterski, J. W.; Ayala, P. Y.; Morokuma, K.; Voth, G. A.; Salvador, P.; Dannenberg, J. J.; Zakrzewski, V. G.; Dapprich, S.; Daniels, A. D.; Strain, M. C.; Farkas, O.; Malick, D. K.; Rabuck, A. D.; Raghavachari, K.; Foresman, J. B.; Ortiz, J. V.; Cui, Q.; Baboul, A. G.; Clifford, S.; Cioslowski, J.; Stefanov, B. B.; Liu, G.; Liashenko, A.; Piskorz, P.; Komaromi, I.; Martin, R. L.; Fox, D. J.; Keith, T.; Laham, A.; Peng, C. Y.; Nanayakkara, A.; Challacombe, M.; Gill, P. M. W.; Johnson, B.; Chen, W.; Wong, M. W.; Gonzalez, C.; Pople, J. A. Gaussian 03, Revision C.02. 2003.
- (187) CORINA. Molecular Networks GmbH: Erlangen, Germany.
- (188) Stewart, J. J. P. MOPAC: A Semiempirical Molecular Orbital Program.

- J. Comput. Aided. Mol. Des.* 4 (1), 1–103.
- (189) Gaillard, P.; Carrupt, P.-A.; Testa, B.; Boudon, A. Molecular Lipophilicity Potential, a Tool in 3D QSAR: Method and Applications. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 8 (2), 83–96.
- (190) Kubinyi, H. Quantitative Structure-Activity Relations. 7. The Bilinear Model, a New Model for Nonlinear Dependence of Biological Activity on Hydrophobic Character. *J. Med. Chem.* 1977, 20 (5), 625–629.
- (191) Granr, J. A.; Gallardo, M. A.; Pickup, B. T. A Fast Method of Molecular Shape Comparison: A Simple Application of a Gaussian Description of Molecular Shape. *J. Comput. Chem.* 1996, 17 (14), 1653–1666.
- (192) Halgren, T. A. MMFF VI. MMFF94s Option for Energy Minimization Studies. *J. Comput. Chem.* 1999, 20 (7), 720–729.
- (193) Stewart, J. J. P. Optimization of Parameters for Semiempirical Methods V: Modification of NDDO Approximations and Application to 70 Elements. *J. Mol. Model.* 2007, 13 (12), 1173–1213.
- (194) Fisher, S. Z.; Aggarwal, M.; Kovalevsky, A. Y.; Silverman, D. N.; McKenna, R. Neutron Diffraction of Acetazolamide-Bound Human Carbonic Anhydrase II Reveals Atomic Details of Drug Binding. *J. Am. Chem. Soc.* 2012, 134 (36), 14726–14729.
- (195) Jo, S.; Kim, T.; Iyer, V. G.; Im, W. CHARMM-GUI: A Web-Based Graphical User Interface for CHARMM. *J. Comput. Chem.* 2008, 29 (11), 1859–1865.
- (196) Phillips, J. C.; Braun, R.; Wang, W.; Gumbart, J.; Tajkhorshid, E.; Villa, E.; Chipot, C.; Skeel, R. D.; Kalé, L.; Schulten, K. Scalable Molecular Dynamics with NAMD. *J. Comput. Chem.* 2005, 26 (16), 1781–1802.
- (197) McGann, M. R.; Almond, H. R.; Nicholls, A.; Grant, J. A.; Brown, F. K. Gaussian Docking Functions. *Biopolymers* 2003, 68 (1), 76–90.
- (198) McGann, M. FRED Pose Prediction and Virtual Screening Accuracy. *J. Chem. Inf. Model.* 2011, 51 (3), 578–596.
- (199) Goujon, M.; McWilliam, H.; Li, W.; Valentin, F.; Squizzato, S.; Paern, J.; Lopez, R. A New Bioinformatics Analysis Tools Framework at EMBL–EBI. *Nucleic Acids Res.* 2010, 38 (Web Server issue), W695–W699.
- (200) Holm, L.; Park, J. DaliLite Workbench for Protein Structure Comparison. *Bioinforma.* 2000, 16 (6), 566–567.
- (201) Baroni, M.; Cruciani, G.; Sciabola, S.; Perruccio, F.; Mason, J. S. A Common Reference Framework for Analyzing/Comparing Proteins and Ligands. Fingerprints for Ligands And Proteins (FLAP): Theory and Application. *J. Chem. Inf. Model.* 2007, 47 (2), 279–294.
- (202) Cross, S.; Ortuso, F.; Baroni, M.; Costa, G.; Distinto, S.; Moraca, F.; Alcaro, S.; Cruciani, G. GRID-Based Three-Dimensional Pharmacophores II: PharmBench, a Benchmark Data Set for Evaluating Pharmacophore Elucidation Methods. *J. Chem. Inf. Model.* 2012, 52 (10), 2599–2608.
- (203) The PyMol Molecular Graphics System. Schrodinger LLC.

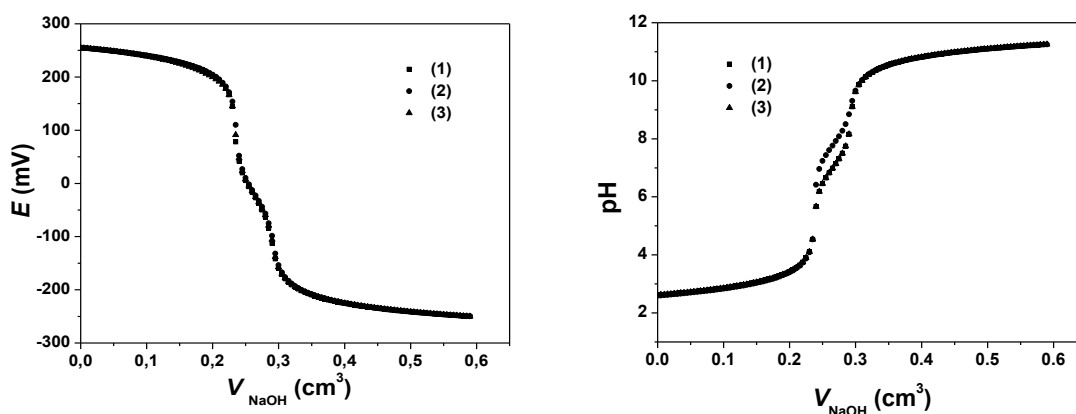
## 7. Prilog



**Slika P1.** Krive titracija smeše jedinjenja **2** ( $c = 9,9903 \cdot 10^{-4}$  M) i standardnog rastvora HCl ( $0,200 \text{ cm}^3$ ,  $c_{\text{HCl}} = 0,1194$  M) standardnim rastvorom natrijum-hidroksida ( $c_{\text{NaOH}} = 0,1311$  M),  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl).



**Slika P2.** Krive titracija smeše jedinjenja **5** ( $c = 5,8578 \cdot 10^{-4}$  M) i standardnog rastvora HCl ( $0,200 \text{ cm}^3$ ,  $c_{\text{HCl}} = 0,1194$  M) standardnim rastvorom natrijum-hidroksida ( $c_{\text{NaOH}} = 0,1311$  M),  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl).



**Slika P3.** Krive titracija smeše jedinjenja **15** ( $c = 6,0503 \cdot 10^{-4}$  M) i standardnog rastvora HCl ( $0,200 \text{ cm}^3$ ,  $c_{\text{HCl}} = 0,1194$  M) standardnim rastvorom natrijum-hidroksida ( $c_{\text{NaOH}} = 0,1311$  M),  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl).

**Tabela P1.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiseline konstante  $K_{a1}$  2-CH<sub>3</sub>-ADK (2) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (8); debljina kivete 1 cm;  $c = 5,023 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\max} = 302,9$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

$A_{\lambda_{\max}}$	pH	$[\text{H}_3\text{O}^+]$	$\frac{A - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]}$
0,472	1,31	$6,17 \cdot 10^{-2}$	-3,05
0,502	1,54	$3,63 \cdot 10^{-2}$	-4,37
0,517	1,74	$2,29 \cdot 10^{-2}$	-6,27
0,539	1,96	$1,38 \cdot 10^{-2}$	-8,80
0,556	2,14	$9,12 \cdot 10^{-3}$	-11,46
0,563	2,29	$6,46 \cdot 10^{-3}$	-15,04
0,599	2,53	$3,72 \cdot 10^{-3}$	-16,43
0,627	2,76	$2,19 \cdot 10^{-3}$	-15,50
0,629	2,93	$1,48 \cdot 10^{-3}$	-21,02
0,645	3,12	$9,55 \cdot 10^{-4}$	-16,46
0,660	3,53		

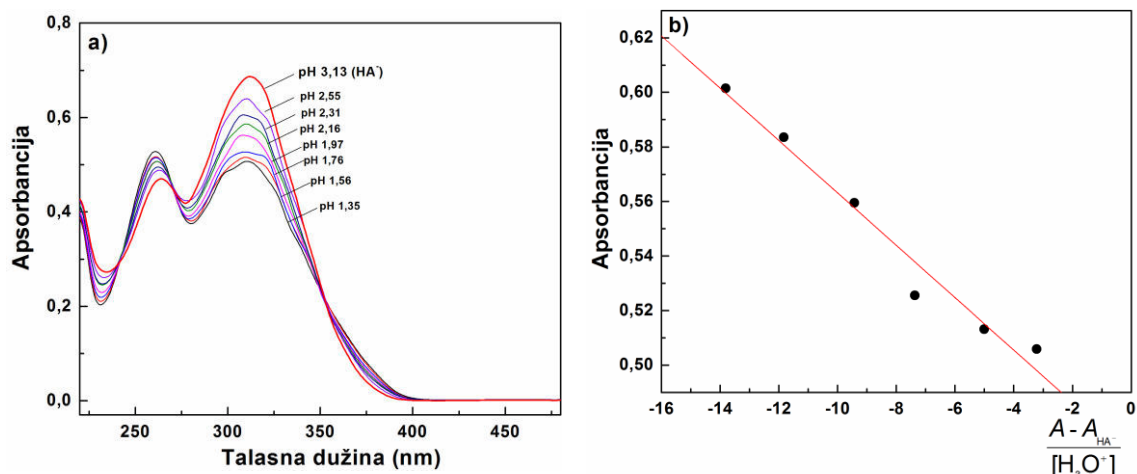
$$A = A_{\text{H}_2\text{A}} - K_{a1} \frac{A_{\lambda_{\max}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]} = (0,47 \pm 0,01) - (7,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-3} \frac{A_{\lambda_{\max}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]}; r = 0,997$$

**Tabela P2.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiseline konstante  $K_{a2}$  2-CH<sub>3</sub>-ADK (2) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (7); debljina kivete 1 cm;  $c = 5,023 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\max} = 305,9$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

$A_{\lambda_{\max}}$	pH	$[\text{H}_3\text{O}^+]$	$[\text{H}_3\text{O}^+] \cdot (A_{\text{HA}^-} - A)$
0,675	6,20	$7,94 \cdot 10^{-7}$	$-3,38 \cdot 10^{-8}$
0,721	6,54	$3,63 \cdot 10^{-7}$	$-3,23 \cdot 10^{-8}$
0,741	6,73	$2,34 \cdot 10^{-7}$	$-2,53 \cdot 10^{-8}$
0,810	7,10	$1,00 \cdot 10^{-7}$	$-1,77 \cdot 10^{-8}$
0,846	7,24	$7,24 \cdot 10^{-8}$	$-1,55 \cdot 10^{-8}$
0,851	7,43	$4,68 \cdot 10^{-8}$	$-1,02 \cdot 10^{-8}$
0,922	7,66	$2,75 \cdot 10^{-8}$	$-7,98 \cdot 10^{-9}$
0,934	7,70	$2,51 \cdot 10^{-8}$	$-7,58 \cdot 10^{-9}$
0,911	7,71	$2,45 \cdot 10^{-8}$	$-6,83 \cdot 10^{-9}$
0,633	3,55		

$$A = A_{\text{A}^{2-}} + \frac{1}{K_{a2}} [\text{H}_3\text{O}^+] (A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\max}}) = (0,97 \pm 0,02) + (8,6 \pm 0,7) \cdot 10^6 [\text{H}_3\text{O}^+] (A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\max}});$$

$$r = 0,976$$

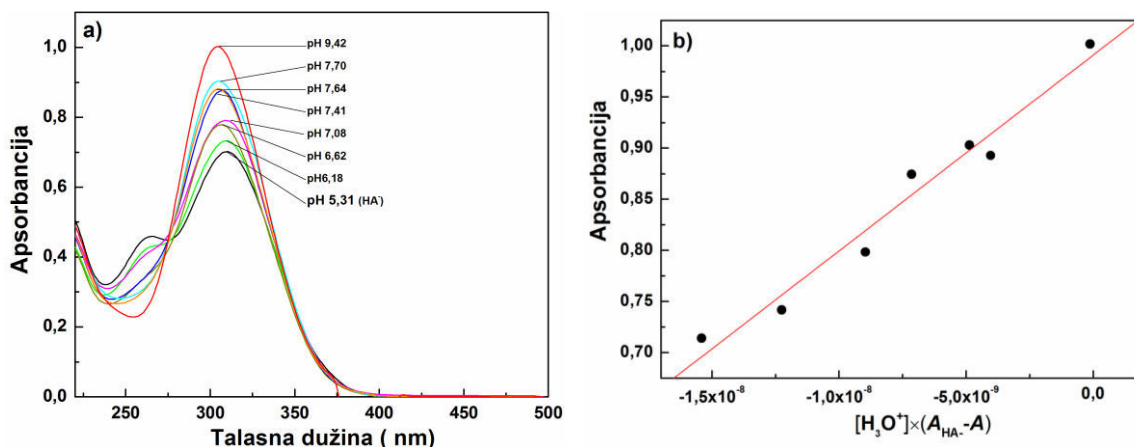


**Slika P4.** Spektrofotometrijsko određivanje kiseline konstante  $K_{a1}$  2,4-diCH<sub>3</sub>-ADK (2); a) apsorpcioni spektri korišćeni za određivanje  $K_{a1}$ ,  $c = 6,021 \cdot 10^{-5}$  M; b) grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom (8);  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P3.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiseline konstante  $K_{a1}$  2,4-diCH<sub>3</sub>-ADK (5) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (8); debljina kivete 1 cm;  $c = 6,021 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\text{max}} = 312,3$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

$A_{\lambda_{\text{max}}}$	pH	$[H_3O^+]$	$\frac{A - A_{HA^-}}{[H_3O^+]}$
0,506	1,35	$5,62 \cdot 10^{-2}$	-3,22
0,513	1,56	$3,47 \cdot 10^{-2}$	-5,00
0,526	1,76	$2,19 \cdot 10^{-2}$	-7,36
0,559	1,97	$1,35 \cdot 10^{-2}$	-9,43
0,584	2,16	$8,71 \cdot 10^{-3}$	-11,84
0,601	2,31	$6,17 \cdot 10^{-3}$	-13,81
0,636	2,55	$3,55 \cdot 10^{-3}$	-14,19
0,687	3,13		

$$A = A_{H_2A} - K_{a1} \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{HA^-}}{[H_3O^+]} = (0,47 \pm 0,01) - (9,6 \pm 0,8) \cdot 10^{-3} \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{HA^-}}{[H_3O^+]}; r = 0,985$$



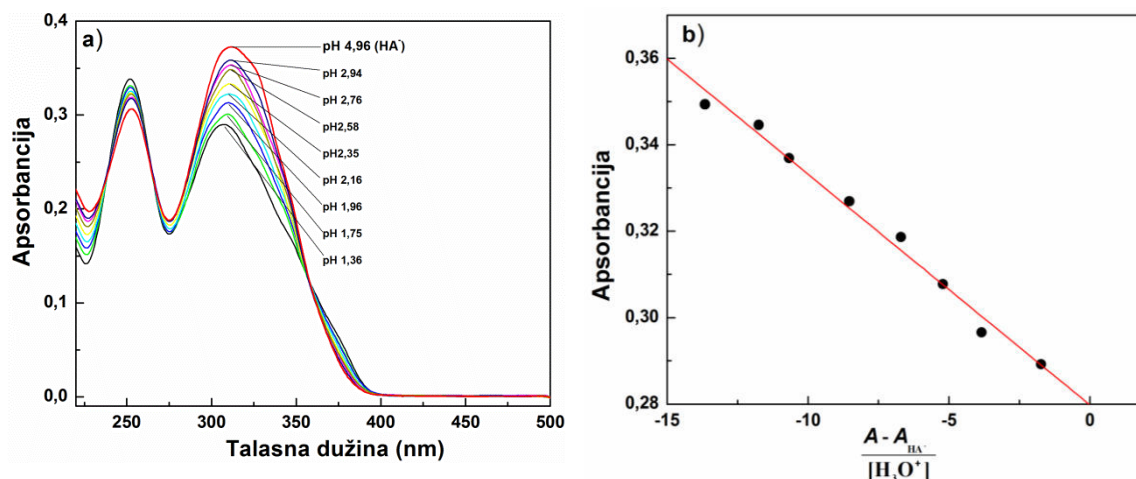
**Slika P5.** Spektrofotometrijsko određivanje kiseline konstante  $K_{a_2}$  2,4-diCH<sub>3</sub>-ADK (2); a) apsorpcijski spektri korišćeni za određivanje  $K_{a_2}$ ,  $c = 6,021 \cdot 10^{-5}$  M; b) grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom (7);  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P4.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiseline konstante  $K_{a_2}$  2,4-diCH<sub>3</sub>-ADK (5) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (7); debljina kivete 1 cm;  $c = 6,021 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\text{max}} = 305,9$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

$A_{\lambda_{\text{max}}}$	pH	$[\text{H}_3\text{O}^+]$	$[\text{H}_3\text{O}^+](A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}})$
0,691	5,31		
0,714	6,18	$6,61 \cdot 10^{-7}$	$-1,54 \cdot 10^{-8}$
0,723	6,52	$3,02 \cdot 10^{-7}$	$-9,84 \cdot 10^{-9}$
0,742	6,62	$2,40 \cdot 10^{-7}$	$-1,23 \cdot 10^{-8}$
0,737	6,72	$1,91 \cdot 10^{-7}$	$-8,76 \cdot 10^{-9}$
0,807	6,98	$1,05 \cdot 10^{-7}$	$-1,22 \cdot 10^{-8}$
0,798	7,08	$8,32 \cdot 10^{-8}$	$-8,96 \cdot 10^{-9}$
0,778	7,22	$6,03 \cdot 10^{-8}$	$-5,25 \cdot 10^{-9}$
0,874	7,41	$3,89 \cdot 10^{-8}$	$-7,14 \cdot 10^{-9}$
0,903	7,64	$2,29 \cdot 10^{-8}$	$-4,87 \cdot 10^{-9}$
0,893	7,70	$2,00 \cdot 10^{-8}$	$-4,03 \cdot 10^{-9}$
0,881	7,71	$1,95 \cdot 10^{-8}$	$-3,71 \cdot 10^{-9}$
1,002	9,42	$3,80 \cdot 10^{-10}$	$-1,18 \cdot 10^{-10}$

$$A = A_{A^{2-}} + \frac{1}{K_{a_2}} [\text{H}_3\text{O}^+] (A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}}) = (0,99 \pm 0,01) - (19 \pm 1) \cdot 10^6 [\text{H}_3\text{O}^+] (A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}})$$

$$r = 0,983$$



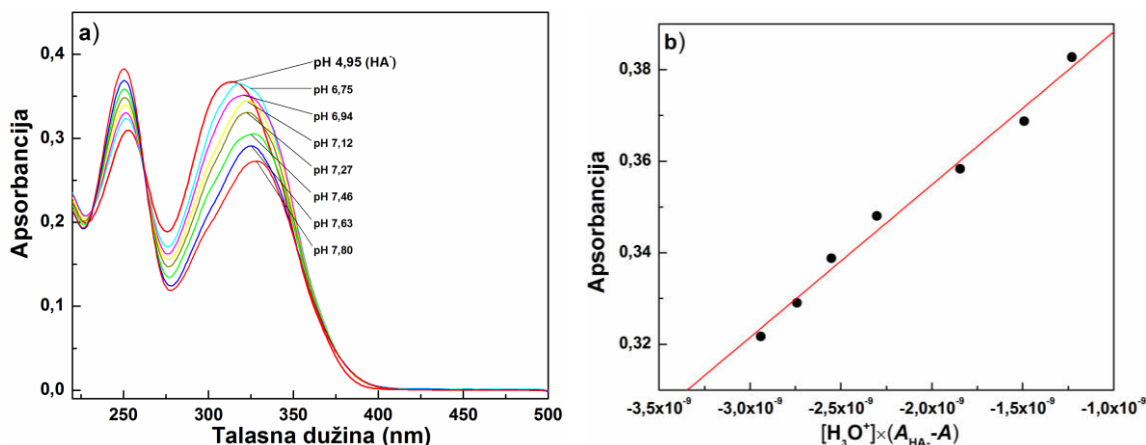
**Slika P6.** Spektrofotometrijsko određivanje kiselinske konstante  $K_{a1}$  3-CH<sub>3</sub>-ADK (**3**); a) apsorpcioni spektri korišćeni za određivanje  $K_{a1}$ ,  $c = 4,908 \cdot 10^{-5}$  M; b) grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom (8);  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P5.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiselinske konstante  $K_{a1}$  3-CH<sub>3</sub>-ADK (**3**) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (8); debljina kivete 1 cm;  $c = 4,908 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\text{max}} = 305,4$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

$A_{\lambda_{\text{max}}}$	pH	$[\text{H}_3\text{O}^+]$	$\frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]}$
0,289	1,36	$4,37 \cdot 10^{-2}$	-1,74
0,272	1,57	$2,69 \cdot 10^{-2}$	-3,45
0,297	1,75	$1,78 \cdot 10^{-2}$	-3,85
0,308	1,96	$1,10 \cdot 10^{-2}$	-5,22
0,319	2,16	$6,92 \cdot 10^{-3}$	-6,70
0,345	2,76	$1,74 \cdot 10^{-3}$	-11,76
0,327	2,35	$4,47 \cdot 10^{-3}$	-8,54
0,337	2,58	$2,63 \cdot 10^{-3}$	-10,68
0,349	2,94	$1,15 \cdot 10^{-3}$	-13,66
0,333	3,14	$7,24 \cdot 10^{-4}$	-43,79
0,353	3,36	$4,37 \cdot 10^{-4}$	-27,79
0,359	3,55	$2,82 \cdot 10^{-4}$	-21,04
0,365	4,96		

$$A = A_{\text{H}_2\text{A}} - K_{a1} \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]} = (0,28 \pm 0,01) - (5,3 \pm 0,2) \cdot 10^{-3} \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]}$$

$$r = 0,994$$



**Slika P7.** Spektrofotometrijsko određivanje kiseline konstante  $K_{a_2}$  3-CH<sub>3</sub>-ADK (3); a) apsorpcijski spektri korišćeni za određivanje  $K_{a_2}$ ,  $c = 4,908 \cdot 10^{-5}$  M; b) grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom (7);  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

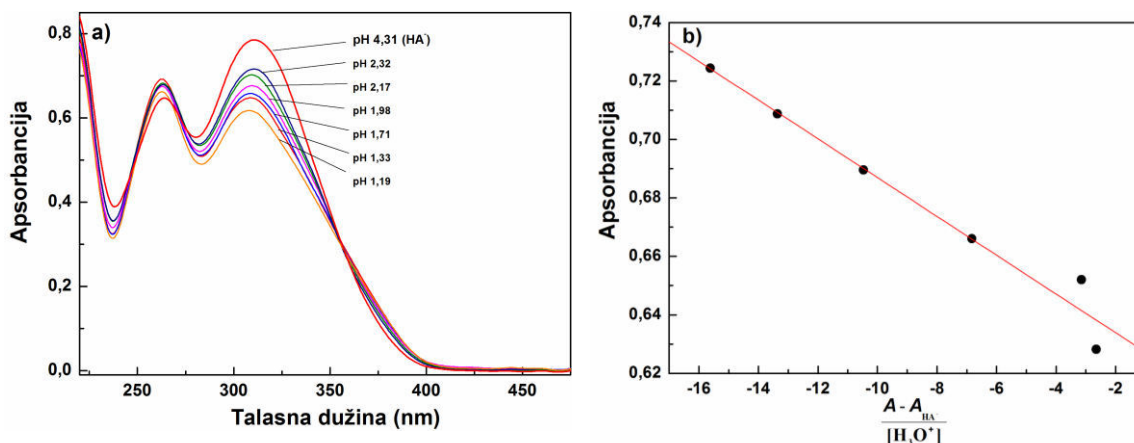
**Tabela P6.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiseline konstante  $K_{a_2}$  3-CH<sub>3</sub>-ADK (3) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (7); debljina kivete 1 cm;  $c = 4,908 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\text{max}} = 250,0$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

$A_{\lambda_{\text{max}}}$	pH	$[\text{H}_3\text{O}^+]$	$[\text{H}_3\text{O}^+](A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}})$
0,305	4,95		
0,304	6,18	$6,61 \cdot 10^{-7}$	$1,07 \cdot 10^{-9}$
0,308	6,35	$4,47 \cdot 10^{-7}$	$-1,09 \cdot 10^{-9}$
0,312	6,56	$2,75 \cdot 10^{-7}$	$-1,77 \cdot 10^{-9}$
0,322	6,75	$1,78 \cdot 10^{-7}$	$-2,94 \cdot 10^{-9}$
0,329	6,94	$1,15 \cdot 10^{-7}$	$-2,74 \cdot 10^{-9}$
0,339	7,12	$7,59 \cdot 10^{-8}$	$-2,55 \cdot 10^{-9}$
0,348	7,27	$5,37 \cdot 10^{-8}$	$-2,30 \cdot 10^{-9}$
0,358	7,46	$3,47 \cdot 10^{-8}$	$-1,84 \cdot 10^{-9}$
0,369	7,63	$2,34 \cdot 10^{-8}$	$-1,49 \cdot 10^{-9}$
0,383	7,80	$1,58 \cdot 10^{-8}$	$-1,23 \cdot 10^{-9}$

$$A = A_{A^{2-}} + \frac{1}{K_{a2}} [\text{H}_3\text{O}^+] (A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}}) = (0,42 \pm 0,01) + (33 \pm 1,7) \cdot 10^6 [\text{H}_3\text{O}^+] (A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}})$$

$$r = 0,993$$



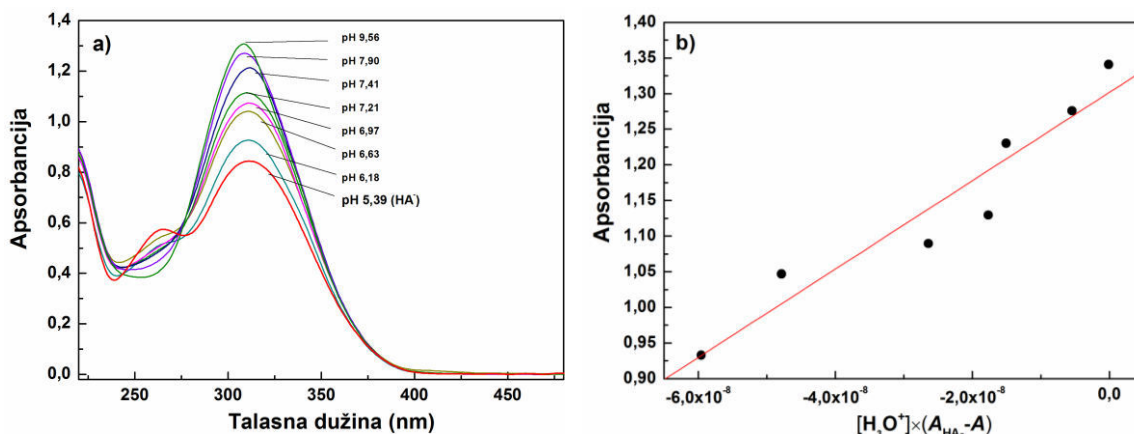


**Slika P8.** Spektrofotometrijsko određivanje kiseline konstante  $K_{a1}$  2,4,5-triCH<sub>3</sub>-ADK (**6**); **a**) apsorpcioni spektri korišćeni za određivanje  $K_{a1}$ ,  $c = 5,904 \cdot 10^{-5}$  M; **b**) grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom (8);  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P7.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiseline konstante  $K_{a1}$  2,4,5-triCH<sub>3</sub>-ADK (**6**) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (8); debljina kivete 1 cm;  $c = 5,904 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\text{max}} = 308,8$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

$A_{\lambda_{\text{max}}}$	pH	$[\text{H}_3\text{O}^+]$	$\frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]}$
0,628	1,19	$6,46 \cdot 10^{-2}$	-2,65
0,652	1,33	$4,68 \cdot 10^{-2}$	-3,14
0,666	1,71	$1,95 \cdot 10^{-2}$	-6,83
0,690	1,98	$1,05 \cdot 10^{-2}$	-10,47
0,709	2,17	$6,76 \cdot 10^{-3}$	-13,37
0,724	2,32	$4,79 \cdot 10^{-3}$	-15,61
0,799	4,31		

$$A = A_{\text{H}_2\text{A}} - K_{a1} \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]} = (0,62 \pm 0,01) - (6,6 \pm 0,6) \cdot 10^{-3} \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]}; r = 0,984$$



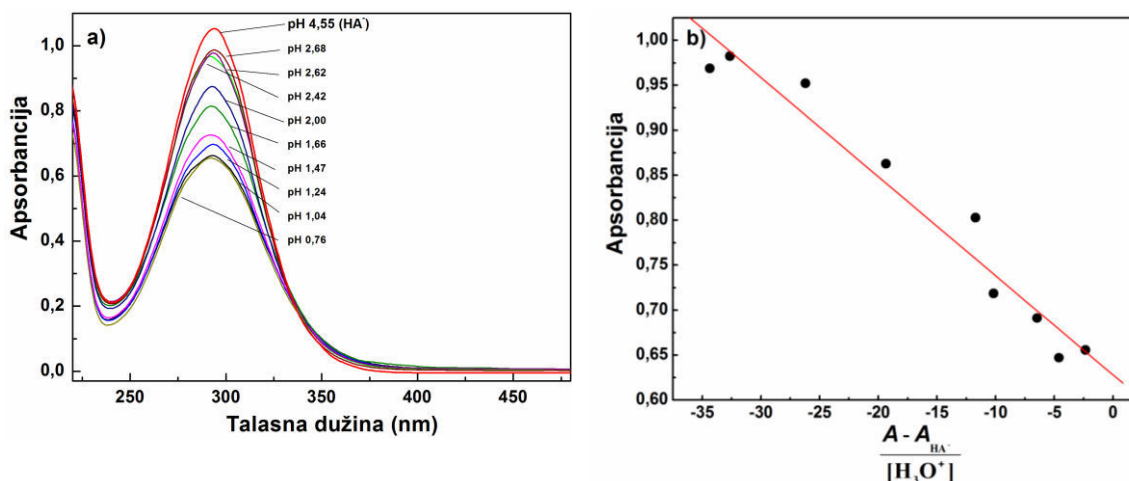
**Slika P9.** Spektrofotometrijsko određivanje kiselinske konstante  $K_{a_2}$  2,4,5-triCH<sub>3</sub>-ADK (**6**); **a**) apsorpcijski spektri korišćeni za određivanje  $K_{a_2}$ ,  $c = 5,904 \cdot 10^{-5}$  M; **b**) grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom (7);  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P8.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiselinske konstante  $K_{a_2}$  2,4,5-triCH<sub>3</sub>-ADK (**6**) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (7); debljina kivete 1 cm;  $c = 5,904 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\text{max}} = 308,0$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

$A_{\lambda_{\text{max}}}$	pH	$[\text{H}_3\text{O}^+]$	$[\text{H}_3\text{O}^+](A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}})$
0,844	5,39		
0,938	6,18	$6,61 \cdot 10^{-7}$	$-6,18 \cdot 10^{-8}$
1,041	6,63	$4,47 \cdot 10^{-7}$	$-4,61 \cdot 10^{-8}$
1,069	6,97	$2,75 \cdot 10^{-7}$	$-2,40 \cdot 10^{-8}$
1,122	7,21	$1,78 \cdot 10^{-7}$	$-1,71 \cdot 10^{-8}$
1,237	7,41	$1,15 \cdot 10^{-7}$	$-1,52 \cdot 10^{-8}$
1,315	7,9	$7,59 \cdot 10^{-8}$	$-5,93 \cdot 10^{-9}$
1,329	9,56	$5,37 \cdot 10^{-8}$	$-1,33 \cdot 10^{-10}$

$$A = A_{A^{2-}} + \frac{1}{K_{a2}} [\text{H}_3\text{O}^+](A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}}) = (1,30 \pm 0,03) + (6,2 \pm 0,8) \cdot 10^6 [\text{H}_3\text{O}^+](A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}})$$

$$r = 0,957$$

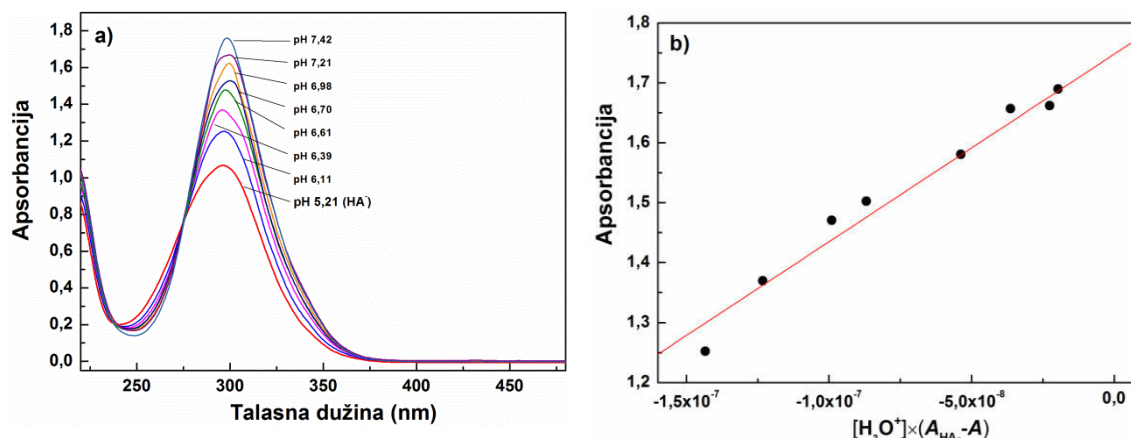


**Slika P10.** Spektrofotometrijsko određivanje kiseline konstante  $K_{a1}$  2,3,5,6-tetraCH<sub>3</sub>-ADK (7); **a)** apsorpcioni spektri korišćeni za određivanje  $K_{a1}$ ,  $c = 6,066 \cdot 10^{-5}$  M; **b)** grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom (8);  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P9.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiseline konstante  $K_{a1}$  2,3,5,6-tetraCH<sub>3</sub>-ADK (7) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (8); debljina kivete 1 cm;  $c = 6,066 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\text{max}} = 293,0$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

$A_{\lambda_{\text{max}}}$	pH	$[\text{H}_3\text{O}^+]$	$\frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]}$
0,656	0,76	$1,74 \cdot 10^{-1}$	-2,37
0,647	1,04	$9,12 \cdot 10^{-2}$	-4,61
0,691	1,24	$5,75 \cdot 10^{-2}$	-6,53
0,719	1,47	$3,39 \cdot 10^{-2}$	-10,29
0,803	1,66	$2,19 \cdot 10^{-2}$	-12,09
0,863	2,00	$1,00 \cdot 10^{-2}$	-20,43
0,952	2,42	$3,80 \cdot 10^{-3}$	-30,20
0,969	2,62	$2,40 \cdot 10^{-3}$	-41,01
0,982	2,68	$2,09 \cdot 10^{-3}$	-40,57
1,047	2,80		

$$A = A_{\text{H}_2\text{A}} - K_{a1} \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]} = (0,63 \pm 0,02) - (1,1 \pm 0,1) \cdot 10^{-2} \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]}; r = 0,977$$



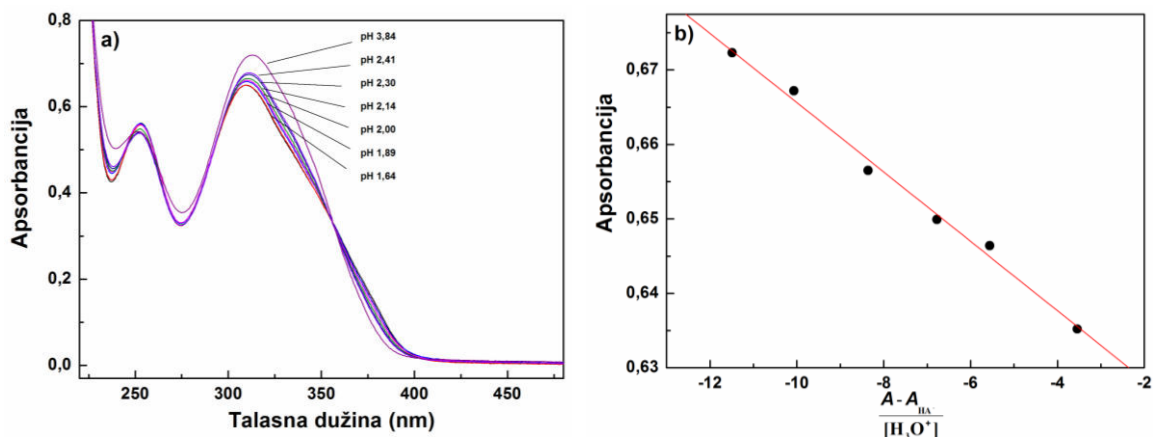
**Slika P11.** Spektrofotometrijsko određivanje kiseline konstante  $K_{a_2}$  2,3,5,6-tetraCH<sub>3</sub>-ADK (7); **a)** apsorpcioni spektri korišćeni za određivanje  $K_{a_2}$ ,  $c = 6,066 \cdot 10^{-5}$  M; **b)** grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom (7);  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P10.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiseline konstante  $K_{a_2}$  2,3,5,6-tetraCH<sub>3</sub>-ADK (7) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (7); debljina kivete 1 cm;  $c = 6,066 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\text{max}} = 296,0$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

$A_{\lambda_{\text{max}}}$	pH	$[\text{H}_3\text{O}^+]$	$[\text{H}_3\text{O}^+](A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}})$
1,067	5,21		
1,252	6,11	$7,76 \cdot 10^{-7}$	$-1,43 \cdot 10^{-7}$
1,370	6,39	$4,07 \cdot 10^{-7}$	$-1,23 \cdot 10^{-7}$
1,471	6,61	$2,45 \cdot 10^{-7}$	$-9,91 \cdot 10^{-8}$
1,503	6,70	$2,00 \cdot 10^{-7}$	$-8,69 \cdot 10^{-8}$
1,581	6,98	$1,05 \cdot 10^{-7}$	$-5,38 \cdot 10^{-8}$
1,657	7,21	$6,17 \cdot 10^{-8}$	$-3,64 \cdot 10^{-8}$
1,662	7,42	$3,80 \cdot 10^{-8}$	$-2,26 \cdot 10^{-8}$
1,690	7,50	$3,16 \cdot 10^{-8}$	$-1,97 \cdot 10^{-8}$

$$A = A_{A^{2-}} + \frac{1}{K_{a_2}} [\text{H}_3\text{O}^+] (A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}}) = (1,75 \pm 0,02) + (3,1 \pm 0,2) \cdot 10^6 [\text{H}_3\text{O}^+] (A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}})$$

$$r = 0,987$$

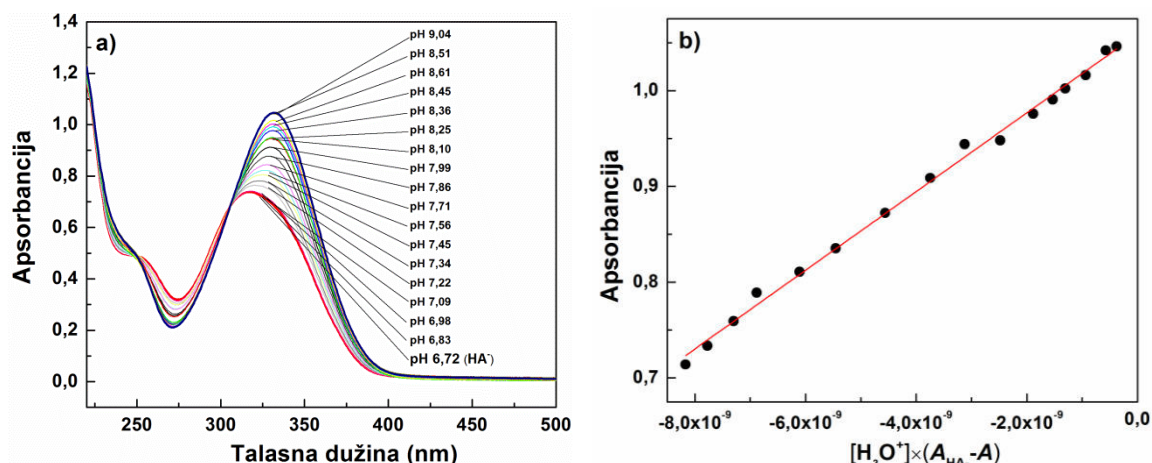


**Slika P12.** Spektrofotometrijsko određivanje kiseline konstante  $K_{a1}$  3-OCH<sub>3</sub>-ADK (14); **a)** apsorpcijski spektri korišćeni za određivanje  $K_{a1}$ ,  $c = 9,451 \cdot 10^{-5}$  M; **b)** grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom (8);  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P11.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiseline konstante  $K_{a1}$  3-OCH<sub>3</sub>-ADK (14) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (8); debljina kivete 1 cm;  $c = 9,451 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\text{max}} = 315,0$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

$A_{\lambda_{\text{max}}}$	pH	$[\text{H}_3\text{O}^+]$	$\frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]}$
0,635	1,64	$2,31 \cdot 10^{-2}$	-3,55
0,646	1,90	$1,27 \cdot 10^{-2}$	-5,56
0,650	2,00	$9,93 \cdot 10^{-3}$	-6,78
0,657	2,14	$7,26 \cdot 10^{-3}$	-8,36
0,667	2,30	$4,97 \cdot 10^{-3}$	-10,07
0,672	2,41	$3,91 \cdot 10^{-3}$	-11,49
0,717	3,84		

$$A = A_{\text{H}_2\text{A}} - K_{a1} \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]} = (0,62 \pm 0,01) - (4,7 \pm 0,2) \cdot 10^{-3} \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]}; r = 0,996$$



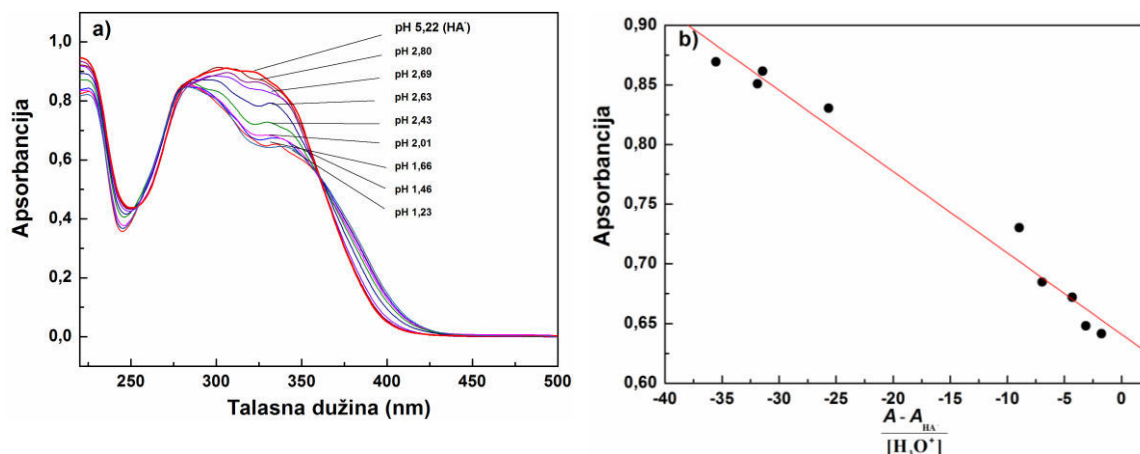
**Slika P13.** Spektrofotometrijsko određivanje kiseline konstante  $K_{a2}$  3-OCH<sub>3</sub>-ADK (**14**); **a)** apsorpcijski spektri korišćeni za određivanje  $K_{a2}$ ,  $c = 9,451 \cdot 10^{-5}$  M; **b)** grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom (7);  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P12.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiseline konstante  $K_{a2}$  3-OCH<sub>3</sub>-ADK (**14**) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (7); debljina kivete 1 cm;  $c = 9,451 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\text{max}} = 332,0$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

$A_{\lambda_{\text{max}}}$	pH	$[\text{H}_3\text{O}^+]$	$[\text{H}_3\text{O}^+](A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}})$
0,637	5,86		
0,714	6,97	$1,07 \cdot 10^{-7}$	$-8,17 \cdot 10^{-9}$
0,734	7,09	$8,09 \cdot 10^{-8}$	$-7,78 \cdot 10^{-9}$
0,759	7,22	$6,00 \cdot 10^{-8}$	$-7,30 \cdot 10^{-9}$
0,789	7,34	$4,54 \cdot 10^{-8}$	$-6,88 \cdot 10^{-9}$
0,811	7,45	$3,52 \cdot 10^{-8}$	$-6,11 \cdot 10^{-9}$
0,835	7,56	$2,75 \cdot 10^{-8}$	$-5,45 \cdot 10^{-9}$
0,872	7,71	$1,94 \cdot 10^{-8}$	$-4,56 \cdot 10^{-9}$
0,909	7,86	$1,38 \cdot 10^{-8}$	$-3,74 \cdot 10^{-9}$
0,944	7,99	$1,02 \cdot 10^{-8}$	$-3,12 \cdot 10^{-9}$
0,948	8,10	$7,98 \cdot 10^{-9}$	$-2,48 \cdot 10^{-9}$
0,976	8,25	$5,57 \cdot 10^{-9}$	$-1,89 \cdot 10^{-9}$
0,991	8,36	$4,34 \cdot 10^{-9}$	$-1,53 \cdot 10^{-9}$
1,002	8,45	$3,57 \cdot 10^{-9}$	$-1,30 \cdot 10^{-9}$
1,016	8,61	$2,47 \cdot 10^{-9}$	$-9,36 \cdot 10^{-10}$
1,042	8,85	$1,41 \cdot 10^{-9}$	$-5,70 \cdot 10^{-10}$
1,046	9,04	$9,20 \cdot 10^{-10}$	$-3,76 \cdot 10^{-10}$

$$A = A_{A^{2-}} + \frac{1}{K_{a2}} [\text{H}_3\text{O}^+] (A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}}) = (1,06 \pm 0,01) + (4,1 \pm 0,1) \cdot 10^7 [\text{H}_3\text{O}^+] (A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}})$$

$$r = 0,998$$

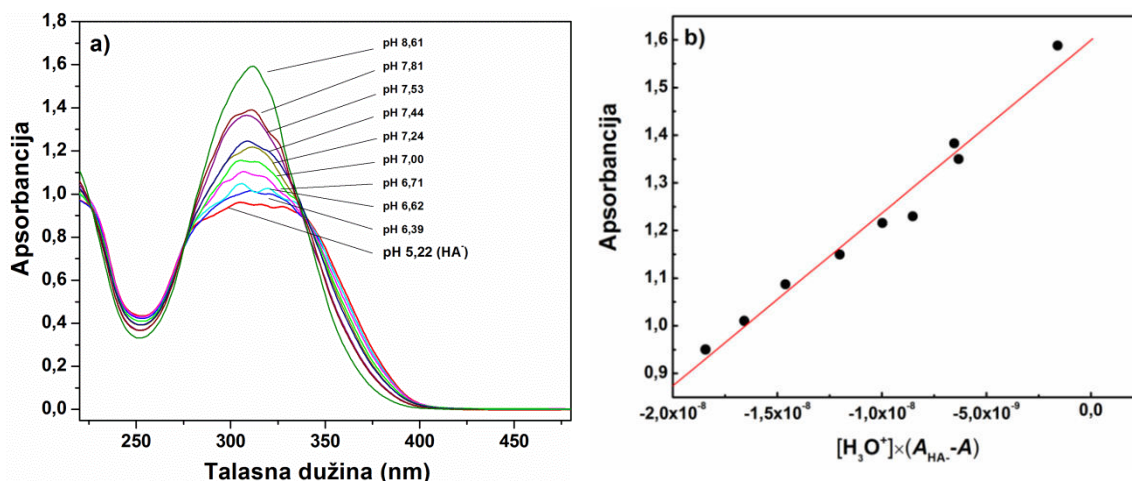


**Slika P14.** Spektrofotometrijsko određivanje kiseline konstante  $K_{a1}$  4-OCH<sub>3</sub>-2,5-diCH<sub>3</sub>-ADK (**10**); **a**) apsorpcioni spektri korišćeni za određivanje  $K_{a1}$ ,  $c = 5,999 \cdot 10^{-5}$  M; **b**) grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom (8);  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P13.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiseline konstante  $K_{a1}$  4-OCH<sub>3</sub>-2,5-diCH<sub>3</sub>-ADK (**10**) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (8); debljina kivete 1 cm;  $c = 5,999 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\text{max}} = 330,0$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

$A_{\lambda_{\text{max}}}$	pH	$[\text{H}_3\text{O}^+]$	$\frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]}$
0,672	1,23	$5,89 \cdot 10^{-2}$	-4,31
0,685	1,46	$3,47 \cdot 10^{-2}$	-6,95
0,730	1,66	$2,19 \cdot 10^{-2}$	-8,93
0,793	2,01	$9,77 \cdot 10^{-3}$	-9,98
0,830	2,43	$3,72 \cdot 10^{-3}$	-25,66
0,851	2,63	$2,34 \cdot 10^{-3}$	-31,90
0,862	2,69	$2,04 \cdot 10^{-3}$	-31,43
0,869	2,80	$1,58 \cdot 10^{-3}$	-35,54
0,926	5,22		

$$A = A_{\text{H}_2\text{A}} - K_{a1} \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]} = (0,64 \pm 0,01) - (6,8 \pm 0,4) \cdot 10^{-3} \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]}; r = 0,989$$



**Slika P15.** Spektrofotometrijsko određivanje kiseline konstante  $K_{a_2}$  4-OCH<sub>3</sub>-2,5-diCH<sub>3</sub>-ADK (**10**); **a**) apsorpcioni spektri korišćeni za određivanje  $K_{a_2}$ ,  $c = 5,999 \cdot 10^{-5}$  M; **b**) grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom (7);  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

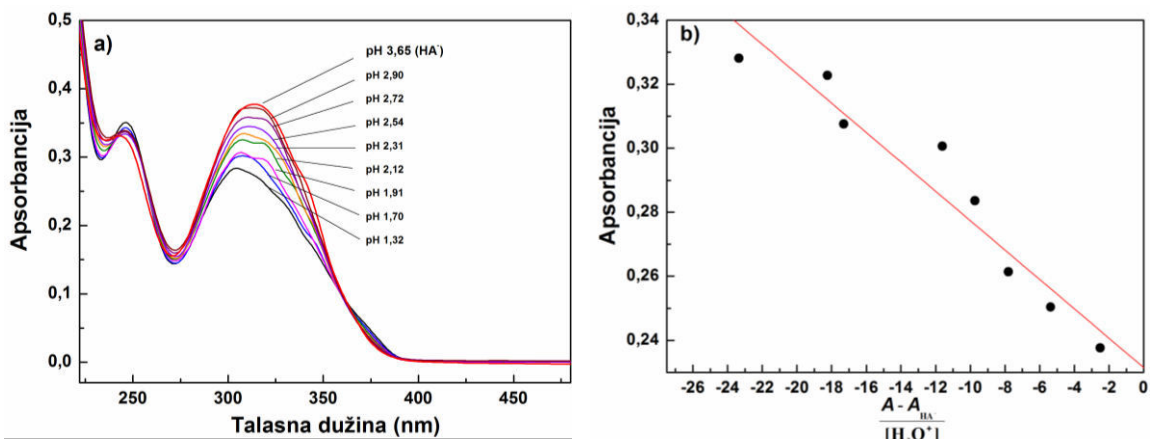
**Tabela P14.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiseline konstante  $K_{a_2}$  4-OCH<sub>3</sub>-2,5-diCH<sub>3</sub>-ADK (**10**) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (7); debljina kivete 1 cm;  $c = 5,999 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\text{max}} = 313,1$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

$A_{\lambda_{\text{max}}}$	pH	$[\text{H}_3\text{O}^+]$	$[\text{H}_3\text{O}^+](A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}})$
0,941	5,22		
0,967	6,39	$4,07 \cdot 10^{-7}$	$-1,07 \cdot 10^{-8}$
1,010	6,62	$2,40 \cdot 10^{-7}$	$-1,66 \cdot 10^{-8}$
1,008	6,71	$1,95 \cdot 10^{-7}$	$-1,31 \cdot 10^{-8}$
1,087	7,00	$1,00 \cdot 10^{-7}$	$-1,46 \cdot 10^{-8}$
1,150	7,24	$5,75 \cdot 10^{-8}$	$-1,20 \cdot 10^{-8}$
1,216	7,44	$3,63 \cdot 10^{-8}$	$-9,97 \cdot 10^{-9}$
1,230	7,53	$2,95 \cdot 10^{-8}$	$-8,52 \cdot 10^{-9}$
1,350	7,81	$1,55 \cdot 10^{-8}$	$-6,33 \cdot 10^{-9}$
1,588	8,61	$2,45 \cdot 10^{-9}$	$-1,59 \cdot 10^{-9}$

$$A = A_{A^{2-}} + \frac{1}{K_{a_2}} [\text{H}_3\text{O}^+] (A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}}) = (1,60 \pm 0,03) + (3,6 \pm 0,2) \cdot 10^7 [\text{H}_3\text{O}^+] (A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}})$$

$$r = 0,987$$





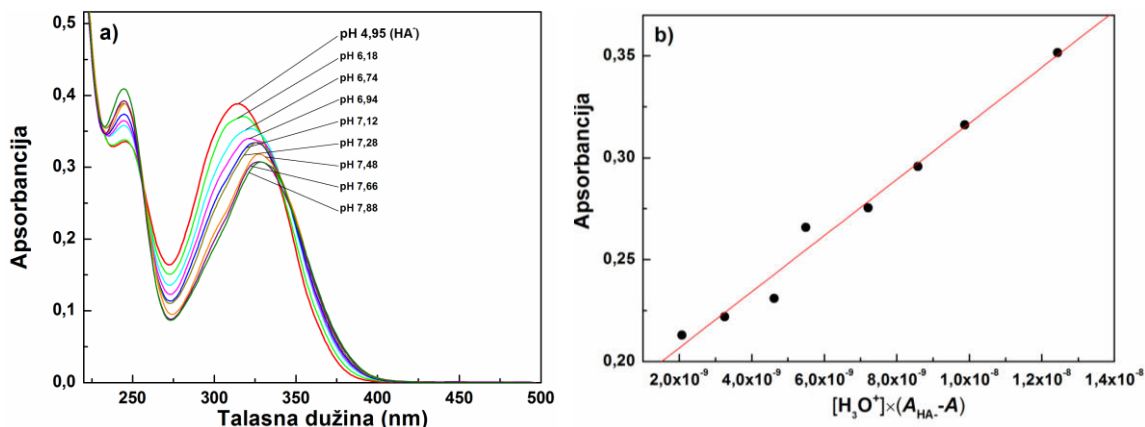
**Slika P16.** Spektrofotometrijsko određivanje kiseline konstante  $K_{a1}$  3-Br ADK (**15**); a) apsorpcioni spektri korišćeni za određivanje  $K_{a1}$ ,  $c = 5,228 \cdot 10^{-5}$  M; b) grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom (8);  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P15.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiseline konstante  $K_{a1}$  3-Br ADK (**15**) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (8); debljina kivete 1 cm;  $c = 5,228 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\text{max}} = 327,6$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

$A_{\lambda_{\text{max}}}$	pH	$[\text{H}_3\text{O}^+]$	$\frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]}$
0,238	1,32	$4,79 \cdot 10^{-2}$	-2,50
0,230	1,52	$3,02 \cdot 10^{-2}$	-4,21
0,250	1,70	$2,00 \cdot 10^{-2}$	-5,37
0,261	1,91	$1,23 \cdot 10^{-2}$	-7,81
0,284	2,12	$7,59 \cdot 10^{-3}$	-9,73
0,301	2,31	$4,90 \cdot 10^{-3}$	-11,61
0,308	2,54	$2,88 \cdot 10^{-3}$	-17,30
0,323	2,72	$1,91 \cdot 10^{-3}$	-18,24
0,328	2,90	$1,26 \cdot 10^{-3}$	-23,35
0,331	3,11	$7,76 \cdot 10^{-4}$	-33,58
0,355	3,32	$4,79 \cdot 10^{-4}$	-34,37
0,334	3,50	$3,16 \cdot 10^{-4}$	-74,31
0,357	3,65		

$$A = A_{\text{H}_2\text{A}} - K_{a1} \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]} = (0,23 \pm 0,01) - (4,6 \pm 0,5) \cdot 10^{-3} \cdot \frac{A_{\lambda_{\text{max}}} - A_{\text{HA}^-}}{[\text{H}_3\text{O}^+]}$$

$$r = 0,963$$



**Slika P17.** Spektrofotometrijsko određivanje kiselinske konstante  $K_{a2}$  3-Br ADK (**15**); **a)** apsorpcijski spektri korišćeni za određivanje  $K_{a2}$ ,  $c = 5,228 \cdot 10^{-5}$  M; **b)** grafik linearne zavisnosti predstavljene jednačinom (7);  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P16.** Eksperimentalni podaci potrebni za izračunavanje kiselinske konstante  $K_{a2}$  3-Br ADK (**15**) transformisanom spektrofotometrijskom jednačinom (7); debljina kivete 1 cm;  $c = 5,228 \cdot 10^{-5}$  M;  $\lambda_{\text{max}} = 305,4$  nm;  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ;  $I = 0,1$  M (NaCl); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

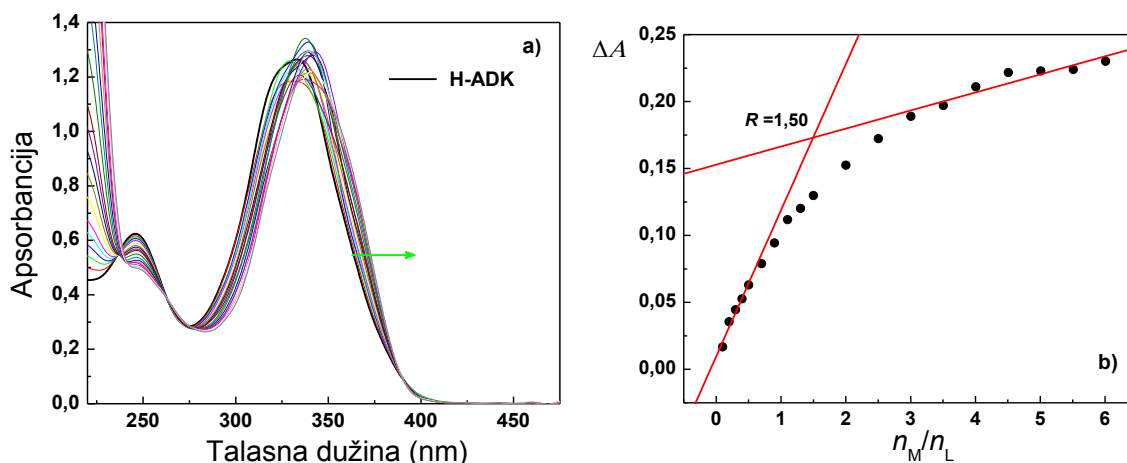
$A_{\lambda_{\text{max}}}$	pH	$[\text{H}_3\text{O}^+]$	$[\text{H}_3\text{O}^+](A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}})$
0,370	4,95		
0,352	6,18	$6,61 \cdot 10^{-7}$	$1,24 \cdot 10^{-8}$
0,350	6,35	$4,47 \cdot 10^{-7}$	$9,27 \cdot 10^{-9}$
0,336	6,56	$2,75 \cdot 10^{-7}$	$9,38 \cdot 10^{-9}$
0,316	6,74	$1,82 \cdot 10^{-7}$	$9,88 \cdot 10^{-9}$
0,296	6,94	$1,15 \cdot 10^{-7}$	$8,58 \cdot 10^{-9}$
0,275	7,12	$7,59 \cdot 10^{-8}$	$7,21 \cdot 10^{-9}$
0,266	7,28	$5,25 \cdot 10^{-8}$	$5,49 \cdot 10^{-9}$
0,231	7,48	$3,31 \cdot 10^{-8}$	$4,62 \cdot 10^{-9}$
0,222	7,66	$2,19 \cdot 10^{-8}$	$3,25 \cdot 10^{-9}$
0,213	7,88	$1,32 \cdot 10^{-8}$	$2,08 \cdot 10^{-9}$

$$A = A_{A^{2-}} + \frac{1}{K_{a2}} [\text{H}_3\text{O}^+](A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}}) = (0,18 \pm 0,01) + (13 \pm 1) \cdot 10^6; [\text{H}_3\text{O}^+](A_{\text{HA}^-} - A_{\lambda_{\text{max}}})$$

$$r = 0,991$$

**Tabela P17.** Eksperimentalni podaci za određivanje konstante stabilnosti kompleksa jedinjenja **2** sa  $Zn^{2+}$  jonom u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ) metodom molskog odnosa;  $\lambda_{opt} = 373,7$  nm;  $c_2 = 8,7828 \cdot 10^{-5}$  M;  $c_{Zn^{2+}} = (0,0874 - 4,2304) \cdot 10^{-4}$  M.

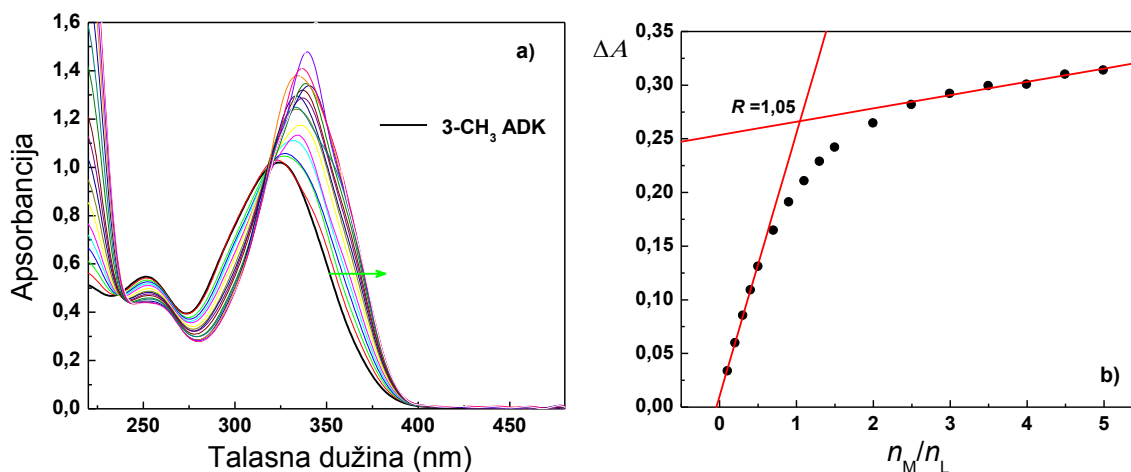
$V_{Zn^{2+}}$ ( $\mu l$ )	$n_M/n_L$	$A$	$A_{supst.}$	$\Delta A$	$V_{Zn^{2+}}$ ( $\mu l$ )	$n_M/n_L$	$A$	$A_{supst.}$	$\Delta A$
1,74	0,100	0,187	0,153	0,034	26,10	1,497	0,394	0,152	0,242
3,48	0,200	0,213	0,153	0,060	34,80	1,996	0,416	0,151	0,265
5,22	0,299	0,238	0,153	0,085	43,50	2,495	0,433	0,151	0,282
6,96	0,399	0,262	0,153	0,109	52,20	2,994	0,442	0,150	0,292
8,70	0,499	0,284	0,153	0,131	60,90	3,492	0,449	0,150	0,299
12,18	0,698	0,317	0,152	0,165	69,60	3,991	0,450	0,149	0,301
15,66	0,898	0,343	0,152	0,191	78,30	4,490	0,459	0,149	0,310
19,14	1,098	0,363	0,152	0,211	87,00	4,989	0,462	0,148	0,314
22,62	1,297	0,381	0,152	0,229					



**Slika P18.** Spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti kompleksa jedinjenja **1** sa  $Zn^{2+}$  jonom: **a)** UV/VIS spektri jedinjenja **1** ( $c_2 = 9,4244 \cdot 10^{-5}$  M) sa  $Zn^{2+}$  jonom ( $c_{Zn^{2+}} = (0,0943-5,4074) \cdot 10^{-4}$  M); **b)** grafik molskog odnosa za formiranje kompleksa jedinjenja **1** sa  $Zn^{2+}$  jonom. Snimano u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P18.** Eksperimentalni podaci za određivanje konstante stabilnosti kompleksa jedinjenja **1** sa  $Zn^{2+}$  jonom u TBS-u (pH=7,34,  $c^{tot}=30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ) metodom molskog odnosa;  $\lambda_{opt} = 371,1$  nm.

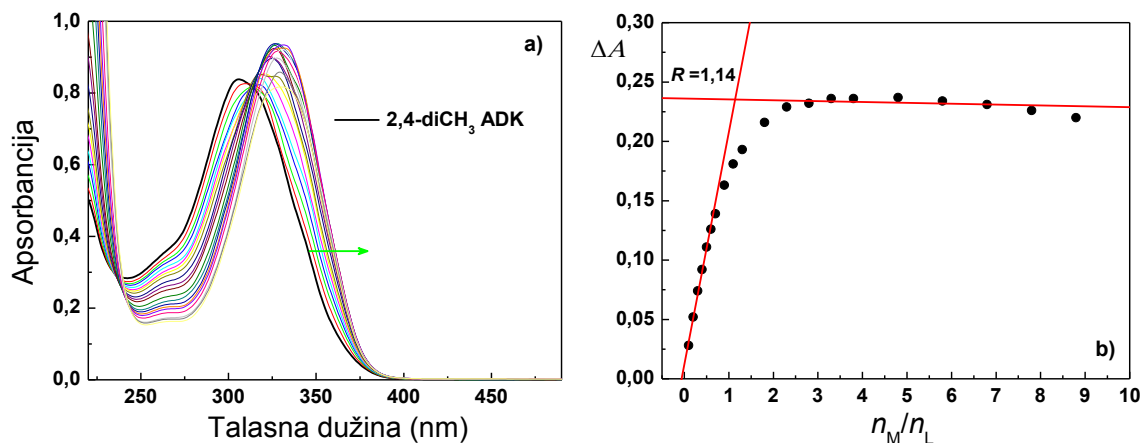
$V_{Zn^{2+}}$ (μl)	$n_M/n_L$	$A$	$A_{supst.}$	$\Delta A$
1,98	0,100	0,353	0,336	0,017
3,96	0,200	0,371	0,336	0,035
5,94	0,300	0,380	0,335	0,045
7,92	0,401	0,388	0,335	0,053
9,90	0,501	0,398	0,335	0,063
13,86	0,701	0,413	0,334	0,079
17,82	0,901	0,428	0,334	0,094
21,78	1,102	0,445	0,333	0,112
25,74	1,302	0,453	0,333	0,120
29,70	1,502	0,462	0,332	0,130
39,60	2,003	0,483	0,331	0,152
49,50	2,504	0,502	0,330	0,172
59,40	3,005	0,517	0,328	0,189
69,30	3,506	0,524	0,327	0,197
79,20	4,006	0,537	0,326	0,211
89,10	4,507	0,546	0,325	0,222
99,00	5,008	0,546	0,324	0,223
108,90	5,509	0,546	0,322	0,224
118,80	6,010	0,551	0,321	0,230



**Slika P19.** Spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti kompleksa jedinjenja **3** sa  $Zn^{2+}$  jonom: **a)** UV/VIS spektri jedinjenja **3** ( $c_3 = 8,7828 \cdot 10^{-5}$  M) sa  $Zn^{2+}$  jonom ( $c_{Zn^{2+}} = (0,0874-4,2304) \cdot 10^{-4}$  M); **b)** grafik molskog odnosa za formiranje kompleksa jedinjenja **3** sa  $Zn^{2+}$  jonom. Snimano u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P19.** Eksperimentalni podaci za određivanje konstante stabilnosti kompleksa jedinjenja **3** sa  $Zn^{2+}$  jonom u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ) metodom molskog odnosa;  $\lambda_{opt} = 373,7$  nm.

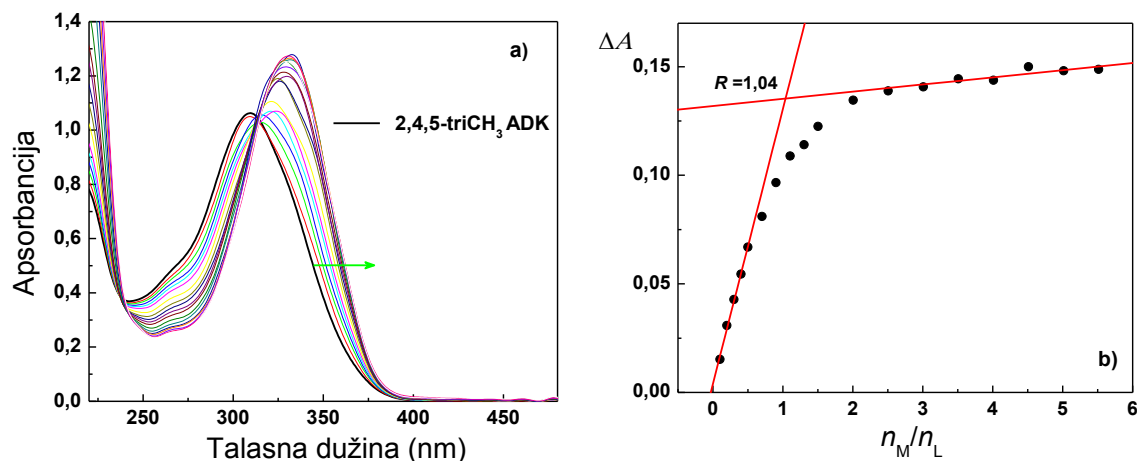
$V_{Zn^{2+}}$ (μl)	$n_M/n_L$	$A$	$A_{supst.}$	$\Delta A$
1,74	0,100	0,187	0,153	0,034
3,48	0,200	0,213	0,153	0,060
5,22	0,299	0,238	0,153	0,085
6,96	0,399	0,262	0,153	0,109
8,70	0,499	0,284	0,153	0,131
12,18	0,698	0,317	0,152	0,165
15,66	0,898	0,343	0,152	0,191
19,14	1,098	0,363	0,152	0,211
22,62	1,297	0,381	0,152	0,229
26,10	1,497	0,394	0,152	0,242
34,80	1,996	0,416	0,151	0,265
43,50	2,495	0,433	0,151	0,282
52,20	2,994	0,442	0,150	0,292
60,90	3,492	0,449	0,150	0,299
69,60	3,991	0,450	0,149	0,301
78,30	4,490	0,459	0,149	0,310
87,00	4,989	0,462	0,148	0,314



**Slika P20.** Spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti kompleksa jedinjenja **5** sa  $Zn^{2+}$  jonom: **a)** UV/VIS spektri jedinjenja **5** ( $c_5 = 7,5085 \cdot 10^{-5}$  M) sa  $Zn^{2+}$  jonom ( $c_{Zn^{2+}} = (0,0749-5,1913) \cdot 10^{-4}$  M); **b)** grafik molskog odnosa za formiranje kompleksa jedinjenja **5** sa  $Zn^{2+}$  jonom. Snimano u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P20.** Eksperimentalni podaci za određivanje konstante stabilnosti jedinjenja **5** sa  $Zn^{2+}$  jonom u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ) metodom molskog odnosa;  $\lambda_{opt} = 360,9$  nm.

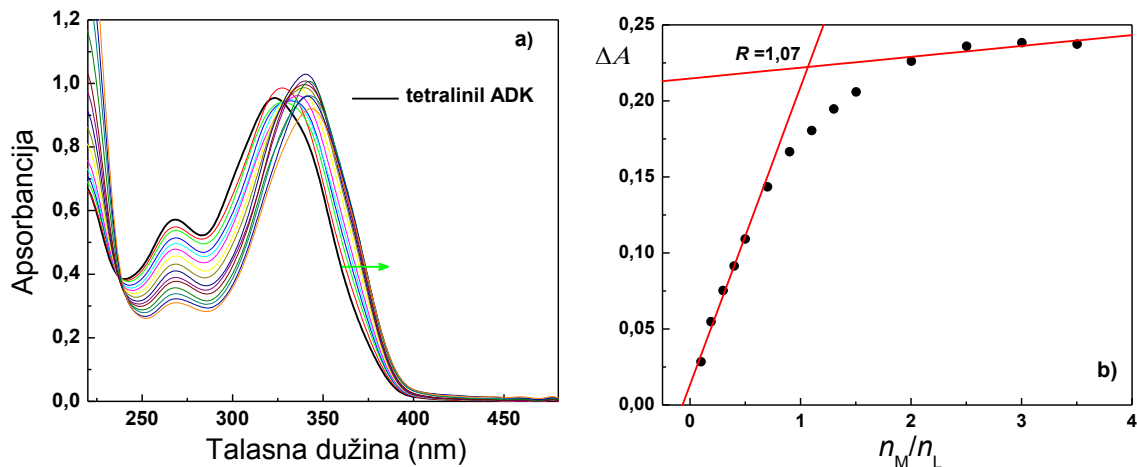
$V_{Zn^{2+}}$ (μl)	$n_M/n_L$	$A$	$A_{supst.}$	$\Delta A$
7,88	0,100	0,164	0,136	0,028
15,76	0,200	0,188	0,136	0,052
23,64	0,300	0,209	0,135	0,074
31,52	0,400	0,227	0,135	0,092
39,4	0,500	0,246	0,135	0,111
47,28	0,600	0,260	0,134	0,126
55,16	0,700	0,273	0,134	0,139
70,96	0,900	0,296	0,133	0,163
86,76	1,100	0,313	0,132	0,181
102,56	1,301	0,324	0,131	0,193
141,96	1,801	0,346	0,130	0,216
181,36	2,300	0,357	0,128	0,229
220,76	2,800	0,358	0,126	0,232
260,16	3,300	0,360	0,124	0,236
299,56	3,799	0,359	0,122	0,237
378,36	4,799	0,356	0,119	0,237
457,16	5,798	0,350	0,116	0,234
535,96	6,798	0,344	0,113	0,231
614,76	7,797	0,336	0,110	0,226
693,56	8,797	0,327	0,107	0,220



**Slika P21.** Spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti kompleksa jedinjenja **6** sa  $Zn^{2+}$  jonom: **a)** UV/VIS spektri jedinjenja **6** ( $c_6 = 8,4035 \cdot 10^{-5}$  M) sa  $Zn^{2+}$  jonom ( $c_{Zn^{2+}} = (0,0843-4,4671) \cdot 10^{-4}$  M); **b)** grafik molskog odnosa za formiranje kompleksa jedinjenja **6** sa  $Zn^{2+}$  jonom. Snimano u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P21.** Eksperimentalni podaci za određivanje konstante stabilnosti kompleksa jedinjenja **6** sa  $Zn^{2+}$  jonom u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ) metodom molskog odnosa;  $\lambda_{opt} = 371,1$  nm.

$V_{Zn^{2+}}$ (μl)	$n_M/n_L$	$A$	$A_{supst.}$	$\Delta A$
1,77	0,100	0,115	0,099	0,016
3,54	0,201	0,130	0,099	0,031
5,31	0,301	0,142	0,099	0,043
7,08	0,401	0,154	0,099	0,055
8,85	0,501	0,166	0,099	0,067
12,39	0,702	0,180	0,099	0,081
15,93	0,902	0,196	0,099	0,097
19,47	1,103	0,208	0,099	0,109
23,01	1,303	0,213	0,099	0,114
26,55	1,504	0,221	0,098	0,123
35,40	2,005	0,233	0,098	0,135
44,25	2,507	0,237	0,098	0,139
53,10	3,008	0,238	0,097	0,141
61,95	3,509	0,242	0,097	0,145
70,80	4,011	0,241	0,097	0,144
79,65	4,512	0,246	0,096	0,150
88,50	5,013	0,244	0,096	0,148
97,35	5,515	0,245	0,096	0,149

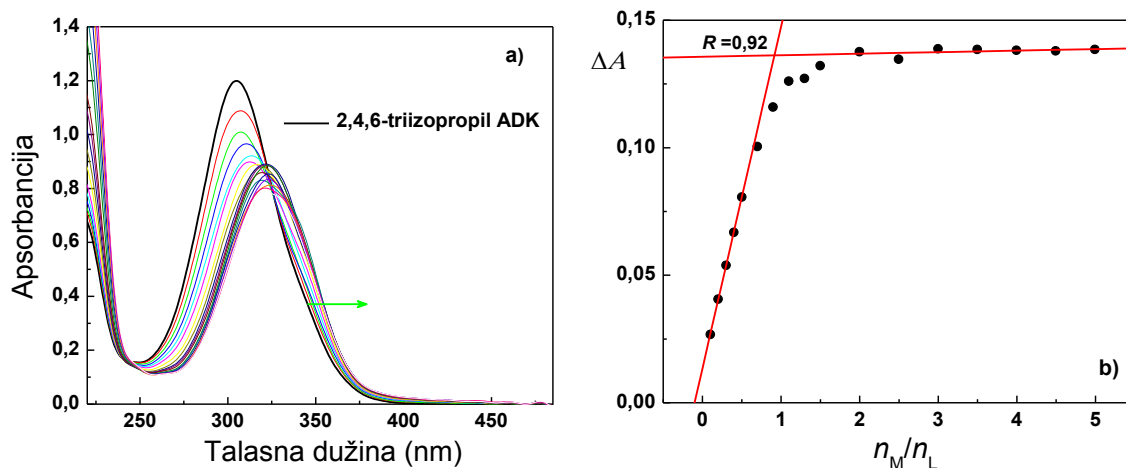


**Slika P22.** Spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti kompleksa jedinjenja **8** sa  $Zn^{2+}$  jonom: **a)** UV/VIS spektri jedinjenja **8** ( $c_8 = 8,6331 \cdot 10^{-5}$  M) sa  $Zn^{2+}$  jonom ( $c_{Zn^{2+}} = (0,0861-2,6926) \cdot 10^{-4}$  M); **b)** grafik molskog odnosa za formiranje kompleksa jedinjenja **8** sa  $Zn^{2+}$  jonom. Snimano u TBS-u ( $pH = 7,34$ ,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P22.** Eksperimentalni podaci za određivanje konstante stabilnosti kompleksa jedinjenja **8** sa  $Zn^{2+}$  jonom u TBS-u ( $pH = 7,34$ ,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ) metodom molskog odnosa;  $\lambda_{opt} = 373,7$  nm.

$V_{Zn^{2+}}$ ( $\mu l$ )	$n_M/n_L$	$A$	$A_{supst.}$	$\Delta A$
9,07	0,100	0,225	0,196	0,029
18,14	0,200	0,250	0,195	0,055
27,21	0,300	0,270	0,195	0,075
36,28	0,400	0,285	0,194	0,091
45,35	0,500	0,303	0,193	0,110
63,55	0,700	0,336	0,192	0,144
81,75	0,901	0,357	0,191	0,166
99,95	1,101	0,370	0,189	0,181
118,15	1,302	0,383	0,188	0,195
136,35	1,503	0,393	0,187	0,206
181,75	2,003	0,410	0,184	0,226
227,15	2,503	0,417	0,181	0,236
272,55	3,004	0,416	0,178	0,238
317,95	3,504	0,412	0,175	0,237

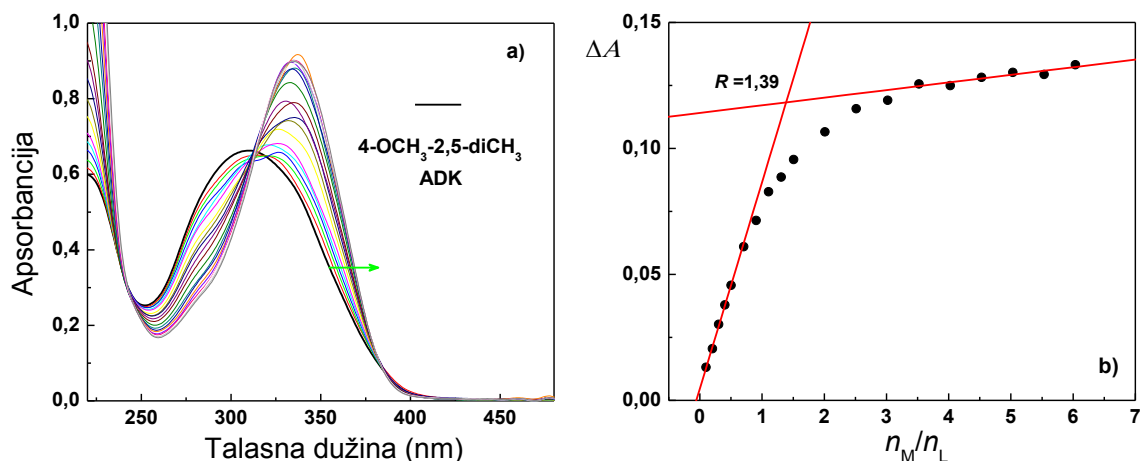




**Slika P23.** Spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti kompleksa jedinjenja **9** sa  $Zn^{2+}$  jonom: **a)** UV/VIS spektri jedinjenja **9** ( $c_9 = 7,6661 \cdot 10^{-5}$  M) sa  $Zn^{2+}$  jonom ( $c_{Zn^{2+}} = (0,0764-3,7111) \cdot 10^{-4}$  M); **b)** grafik moluskog odnosa za formiranje kompleksa jedinjenja **9** sa  $Zn^{2+}$  jonom. Snimano u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P23.** Eksperimentalni podaci za određivanje konstante stabilnosti kompleksa jedinjenja **9** sa  $Zn^{2+}$  jonom u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ) metodom moluskog odnosa;  $\lambda_{opt} = 360,9$  nm.

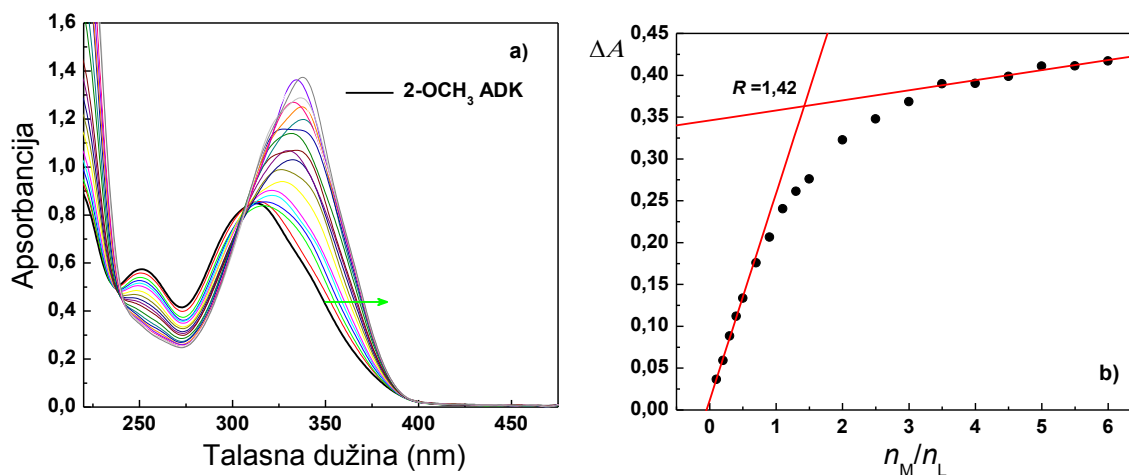
$V_{Zn^{2+}}$ (μl)	$n_M/n_L$	$A$	$A_{supst.}$	$\Delta A$
1,52	0,100	0,169	0,142	0,027
3,04	0,200	0,182	0,142	0,040
4,56	0,300	0,195	0,142	0,053
6,08	0,400	0,208	0,142	0,066
7,60	0,499	0,222	0,141	0,081
10,64	0,699	0,242	0,141	0,101
13,68	0,899	0,257	0,141	0,116
16,72	1,099	0,267	0,141	0,126
19,76	1,298	0,268	0,141	0,127
22,80	1,498	0,273	0,141	0,132
30,40	1,998	0,278	0,140	0,138
38,00	2,497	0,275	0,140	0,135
45,60	2,996	0,278	0,139	0,139
53,20	3,496	0,278	0,139	0,139
60,80	3,995	0,277	0,139	0,138
68,40	4,494	0,276	0,138	0,138
76,00	4,994	0,276	0,138	0,138



**Slika P24.** Spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti kompleksa jedinjenja **10** sa  $Zn^{2+}$  jonom: **a)** UV/VIS spektri jedinjenja **10** ( $c_{10} = 6,2929 \cdot 10^{-5}$  M) sa  $Zn^{2+}$  jonom ( $c_{Zn^{2+}} = (0,0634-3,7044) \cdot 10^{-4}$  M); **b)** grafik molskog odnosa za formiranje kompleksa jedinjenja **10** sa  $Zn^{2+}$  jonom. Snimano u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P24.** Eksperimentalni podaci za određivanje konstante stabilnosti kompleksa jedinjenja **10** sa  $Zn^{2+}$  jonom u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ) metodom molskog odnosa;  $\lambda_{opt} = 370,3$  nm.

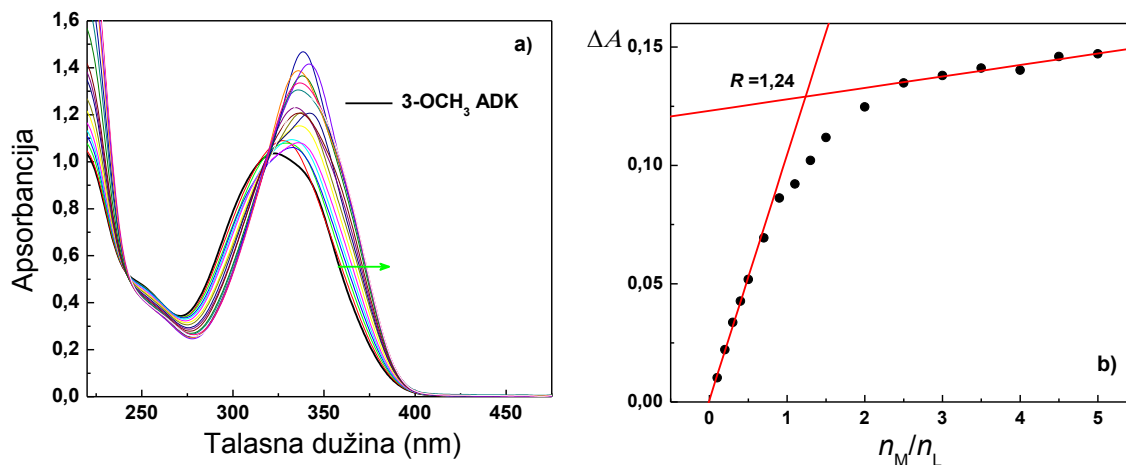
$V_{Zn^{2+}}$ (μl)	$n_M/n_L$	$A$	$A_{supst.}$	$\Delta A$
1,15	0,101	0,203	0,189	0,014
2,30	0,201	0,210	0,189	0,021
3,45	0,302	0,219	0,189	0,030
4,60	0,403	0,227	0,189	0,038
5,75	0,503	0,235	0,189	0,046
8,05	0,704	0,250	0,189	0,061
10,35	0,906	0,260	0,189	0,071
12,65	1,107	0,271	0,189	0,082
14,95	1,308	0,277	0,188	0,089
17,25	1,509	0,284	0,188	0,096
23,00	2,013	0,294	0,188	0,106
28,75	2,516	0,303	0,187	0,116
34,50	3,019	0,306	0,187	0,119
40,25	3,522	0,312	0,187	0,125
46,00	4,025	0,311	0,186	0,125
51,75	4,528	0,314	0,186	0,128
57,50	5,031	0,315	0,185	0,130
63,25	5,534	0,314	0,185	0,129
69,00	6,038	0,318	0,185	0,133



**Slika P25.** Spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti kompleksa jedinjenja **13** sa  $Zn^{2+}$  jonom: **a)** UV/VIS spektri jedinjenja **13** ( $c_{13} = 8,8595 \cdot 10^{-5}$  M) sa  $Zn^{2+}$  jonom ( $c_{Zn^{2+}} = (0,0886-5,0935) \cdot 10^{-4}$  M); **b)** grafik molskog odnosa za formiranje kompleksa jedinjenja **13** sa  $Zn^{2+}$  jonom. Snimano u TBS-u ( $pH = 7,34$ ,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P25.** Eksperimentalni podaci za određivanje konstante stabilnosti kompleksa jedinjenja **13** sa  $Zn^{2+}$  jonom u TBS-u ( $pH = 7,34$ ,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ) metodom molskog odnosa;  $\lambda_{opt} = 363,5$  nm.

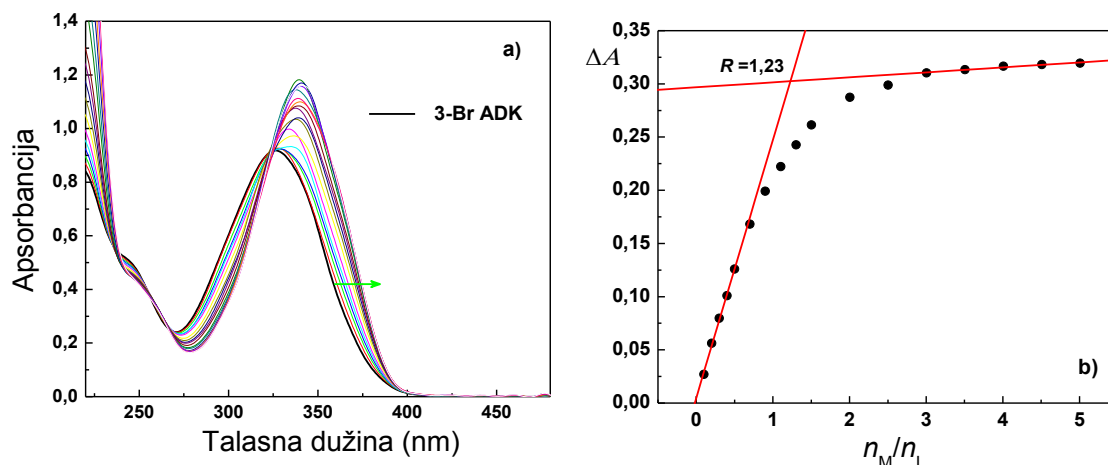
$V_{Zn^{2+}}$ (μl)	$n_M/n_L$	$A$	$A_{supst.}$	$\Delta A$
1,86	0,100	0,285	0,249	0,036
3,72	0,200	0,308	0,249	0,059
5,58	0,300	0,337	0,248	0,089
7,44	0,400	0,360	0,248	0,112
9,30	0,500	0,382	0,248	0,134
13,02	0,700	0,424	0,248	0,176
16,74	0,899	0,454	0,247	0,207
20,46	1,099	0,487	0,247	0,240
24,18	1,299	0,508	0,247	0,261
27,90	1,499	0,522	0,246	0,276
37,20	1,999	0,568	0,245	0,323
46,50	2,498	0,592	0,245	0,347
55,80	2,998	0,612	0,244	0,368
65,10	3,498	0,633	0,243	0,390
74,40	3,998	0,632	0,242	0,390
83,70	4,497	0,640	0,241	0,399
93,00	4,997	0,651	0,240	0,411
102,30	5,497	0,651	0,239	0,412
111,60	5,996	0,656	0,239	0,417



**Slika P26.** Spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti kompleksa jedinjenja **14** sa  $Zn^{2+}$  jonom: **a)** UV/VIS spektri jedinjenja **14** ( $c_{14} = 8,1509 \cdot 10^{-5}$  M) sa  $Zn^{2+}$  jonom ( $c_{Zn^{2+}} = (0,0816-3,9653) \cdot 10^{-4}$  M); **b)** grafik molskog odnosa za formiranje kompleksa jedinjenja **14** sa  $Zn^{2+}$  jonom. Snimano u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P26.** Eksperimentalni podaci za određivanje konstante stabilnosti kompleksa jedinjenja **14** sa  $Zn^{2+}$  jonom u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ) metodom molskog odnosa;  $\lambda_{opt} = 382,2$  nm.

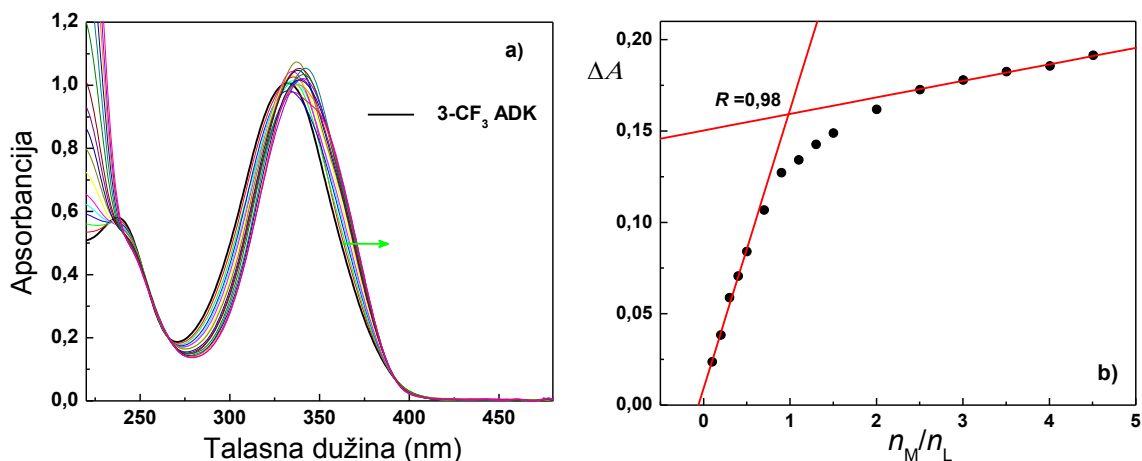
$V_{Zn^{2+}}$ ( $\mu l$ )	$n_M/n_L$	$A$	$A_{supst.}$	$\Delta A$
1,48	0,100	0,127	0,116	0,011
2,96	0,200	0,138	0,116	0,022
4,44	0,300	0,150	0,116	0,034
5,92	0,400	0,159	0,116	0,043
7,40	0,500	0,168	0,116	0,052
10,36	0,700	0,185	0,116	0,069
13,32	0,900	0,202	0,116	0,086
16,28	1,100	0,208	0,116	0,092
19,24	1,300	0,218	0,116	0,102
22,20	1,500	0,227	0,115	0,112
29,60	2,000	0,240	0,115	0,125
37,00	2,500	0,250	0,115	0,135
44,40	3,000	0,252	0,114	0,138
51,80	3,500	0,255	0,114	0,141
59,20	4,000	0,254	0,114	0,140
66,60	4,500	0,260	0,113	0,147
74,00	5,000	0,260	0,113	0,147



**Slika P27.** Spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti kompleksa jedinjenja **15** sa  $Zn^{2+}$  jonom: **a)** UV/VIS spektri jedinjenja **15** ( $c_{15} = 7,5528 \cdot 10^{-5}$  M) sa  $Zn^{2+}$  jonom ( $c_{Zn^{2+}} = (0,0757-3,6729) \cdot 10^{-4}$  M); **b)** grafik molskog odnosa za formiranje kompleksa jedinjenja **15** sa  $Zn^{2+}$  jonom. Snimano u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P27.** Eksperimentalni podaci za određivanje konstante stabilnosti kompleksa jedinjenja **15** sa  $Zn^{2+}$  jonom u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ) metodom molskog odnosa;  $\lambda_{opt} = 371,1$  nm.

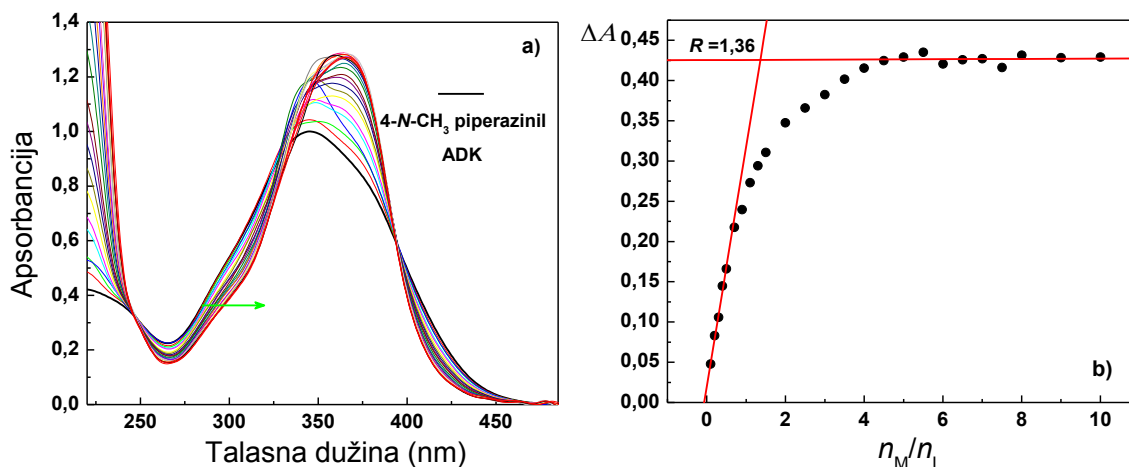
$V_{Zn^{2+}}$ ( $\mu l$ )	$n_M/n_L$	$A$	$A_{supst.}$	$\Delta A$
1,59	0,100	0,236	0,209	0,027
3,18	0,200	0,265	0,209	0,056
4,77	0,301	0,289	0,209	0,080
6,36	0,401	0,310	0,209	0,101
7,95	0,501	0,335	0,209	0,126
11,13	0,701	0,376	0,208	0,168
14,31	0,902	0,407	0,208	0,199
17,49	1,102	0,430	0,208	0,222
20,67	1,303	0,450	0,208	0,242
23,85	1,503	0,469	0,207	0,262
31,80	2,004	0,494	0,207	0,287
39,75	2,505	0,505	0,206	0,299
47,70	3,006	0,516	0,205	0,311
55,65	3,507	0,518	0,205	0,313
63,60	4,008	0,521	0,204	0,317
71,55	4,509	0,522	0,204	0,318
79,50	5,010	0,522	0,203	0,319



**Slika P28.** Spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti kompleksa jedinjenja **16** sa  $Zn^{2+}$  jonom: **a)** UV/VIS spektri jedinjenja **16** ( $c_{16} = 8,4742 \cdot 10^{-5}$  M) sa  $Zn^{2+}$  jonom ( $c_{Zn^{2+}} = (0,0849-3,7201) \cdot 10^{-4}$  M); **b)** grafik molskog odnosa za formiranje kompleksa jedinjenja **16** sa  $Zn^{2+}$  jonom. Snimano u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P28.** Eksperimentalni podaci za određivanje konstante stabilnosti kompleksa jedinjenja **16** sa  $Zn^{2+}$  jonom u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ) metodom molskog odnosa;  $\lambda_{opt} = 370,3$  nm.

$V_{Zn^{2+}}$ (μl)	$n_M/n_L$	$A$	$A_{supst.}$	$\Delta A$
1,54	0,100	0,355	0,332	0,023
3,08	0,200	0,370	0,332	0,038
4,62	0,301	0,390	0,331	0,059
6,16	0,401	0,402	0,331	0,071
7,70	0,501	0,415	0,331	0,084
10,78	0,701	0,437	0,331	0,106
13,86	0,902	0,457	0,330	0,127
16,94	1,102	0,464	0,330	0,134
20,02	1,302	0,472	0,329	0,143
23,10	1,503	0,478	0,329	0,149
30,80	2,004	0,490	0,328	0,162
38,50	2,505	0,500	0,327	0,173
46,20	3,006	0,504	0,326	0,178
53,90	3,507	0,508	0,325	0,183
61,60	4,007	0,510	0,324	0,186
69,30	4,508	0,515	0,323	0,192



**Slika P29.** Spektrofotometrijsko određivanje konstanti stabilnosti kompleksa jedinjenja **20** sa  $Zn^{2+}$  jonom: **a)** UV/VIS spektri jedinjenja **20** ( $c_{20} = 8,1369 \cdot 10^{-5}$  M) sa  $Zn^{2+}$  jonom ( $c_{Zn^{2+}} = (0,0814-7,6335) \cdot 10^{-4}$  M); **b)** grafik moljskog odnosa za formiranje kompleksa jedinjenja **20** sa  $Zn^{2+}$  jonom. Snimano u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ); brzina snimanja spektara 500 nm/min.

**Tabela P29.** Eksperimentalni podaci za određivanje konstante stabilnosti kompleksa jedinjenja **20** sa  $Zn^{2+}$  jonom u TBS-u (pH = 7,34,  $c^{tot} = 30$  mM,  $t = 25 \pm 1^\circ C$ ) metodom moljskog odnosa;  $\lambda_{opt} = 372,8$  nm.

$V_{Zn^{2+}}$ (μl)	$n_M/n_L$	$A$	$A_{supst.}$	$\Delta A$	$V_{Zn^{2+}}$ (μl)	$n_M/n_L$	$A$	$A_{supst.}$	$\Delta A$
1,71	0,100	0,901	0,853	0,048	59,85	3,502	1,236	0,834	0,402
3,42	0,200	0,935	0,852	0,083	68,40	4,002	1,247	0,831	0,415
5,13	0,300	0,958	0,852	0,106	76,95	4,502	1,253	0,828	0,425
6,84	0,400	0,996	0,851	0,145	85,50	5,003	1,255	0,826	0,429
8,55	0,500	1,017	0,851	0,166	94,05	5,503	1,258	0,823	0,435
11,97	0,700	1,067	0,850	0,218	102,60	6,003	1,241	0,820	0,420
15,39	0,900	1,088	0,848	0,240	111,15	6,503	1,243	0,818	0,426
18,81	1,101	1,120	0,847	0,273	119,70	7,004	1,242	0,815	0,427
22,23	1,301	1,140	0,846	0,294	128,25	7,504	1,229	0,813	0,416
25,65	1,501	1,156	0,845	0,311	136,80	8,004	1,241	0,810	0,432
34,20	2,001	1,190	0,842	0,347	153,90	9,005	1,233	0,805	0,428
42,75	2,501	1,205	0,839	0,366	171,00	10,005	1,229	0,800	0,429
51,30	3,002	1,219	0,837	0,382					

Tablica za izračunavanje logK pomoću Rose Drago metode UV/Vis spektroskopija

Osnovne jednačine:

- 1 Uneti podatke u sivo obojena polja
- 2 složiti A od najveće ka najmanjoj vrednosti
- 3 Kod bn upisati -bn
- 4 Skloniti NUM oznake i izvući srednje vrednosti za log K

$\therefore X =$

$$\frac{-(b_1 - b_2) \pm \sqrt{(b_1 - b_2)^2 - 4 \cdot (c_1 - c_2) \cdot (a_1 - a_2)}}{2 \cdot (c_1 - c_2)}$$

$$Y = \frac{1}{K}$$

$$X = \epsilon_c - \epsilon_b - \epsilon_d$$

$$a_n = A_{obs} - \epsilon_b \cdot [H]_{in} - \epsilon_d \cdot [G]_{in}$$

$$b_n = [H]_{in} + [G]_{in}$$

$$c_n = \frac{[H]_{in} \cdot [G]_{in}}{A_{obs} - \epsilon_b \cdot [H]_{in} - \epsilon_d \cdot [G]_{in}}$$

$$Y = \frac{a_n}{X} - b_n + c_n \cdot X$$

Titracioni podaci

		[L] <sub>tot</sub>	[M] <sub>tot</sub>	A	A <sub>L</sub>	A <sub>M</sub>	A-A <sub>L</sub> -A <sub>M</sub>	C <sub>M</sub> /C <sub>L</sub>
λ	373,4 n=1	8,65E-05	1,73E-04		0,41	0,181	0	0,229
ε <sub>M</sub>	0 n=2	8,65E-05	1,30E-04		0,377	0,181	0	1,50258
ε <sub>L</sub>	2093,534 n=3	8,65E-05	1,13E-04		0,364	0,181	0	0,183
	n=4	8,65E-05	9,52E-05		0,357	0,181	0	0,176
	n=5	8,65E-05	7,79E-05		0,336	0,181	0	0,155
	n=6	8,65E-05	6,05E-05		0,31	0,181	0	0,129

Izračunavanje parametara a, b, c

Izr. X<sub>1,2</sub>

Sortiranje X1 i X2

n	a <sub>n</sub>	b <sub>n</sub>	c <sub>n</sub>	kombinacije od n		X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>
n=1	0,229	-2,60E-04	6,54E-08	1	2	4436,7	921,3	4436,7	921,3
n=2	0,196	-2,16E-04	5,73E-08	2	3	3231,0	976,2	3231,0	976,2
n=3	0,183	-1,99E-04	5,32E-08	3	4	2214,5	493,7	2214,5	493,7
n=4	0,176	-1,82E-04	4,68E-08	4	5	3280,9	1919,7	3280,9	1919,7
n=5	0,155	-1,64E-04	4,34E-08	5	6	3312,7	2739,3	3312,7	2739,3
n=6	0,129	-1,47E-04	4,06E-08	6	1	1446,6	6398,3	6398,3	1446,6
n=1	0,212	-2,18E-04	4,96E-08	1	3	4034,0	935,1	4034,0	935,1
n=2	0,196	-1,81E-04	4,03E-08	2	4	2550,0	745,2	2550,0	745,2
n=3	0,185	-1,67E-04	3,70E-08	3	5	2324,7	1237,0	2324,7	1237,0
n=4	0,169	-1,52E-04	3,42E-08	4	6	3289,1	2305,0	3289,1	2305,0
n=5	0,153	-1,38E-04	3,10E-08	5	2	1125,8	2627,9	2627,9	1125,8
n=6	0,131	-1,23E-04	2,82E-08	6	3	#####	#####	#####	#####
n=1	0,212	-2,18E-04	4,96E-08	1	4	3336,6	854,1	3336,6	854,1
n=1	0,212	-2,18E-04	4,96E-08	1	5	3331,4	1012,8	3331,4	1012,8
n=2	0,196	-1,81E-04	4,03E-08	2	6	2615,9	1531,5	2615,9	1531,5

Y1 i Y2 i K1 i K2 iz X1 i X2

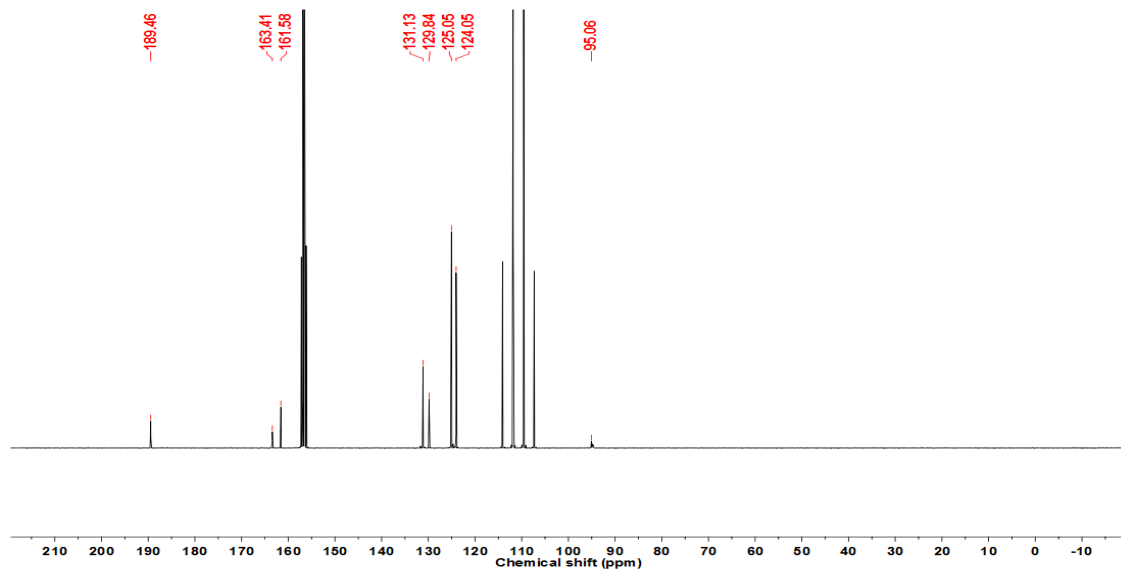
Sortiranje rezultata iz Y1, statistička obrada

Y1	Y2	K (1/Y1)	K (1/Y2)	log K (Y1)	log K (Y2)	
8,21E-05	4,92E-05	1,22E+04	2,03E+04	4,086	4,308	5,859
2,94E-05	4,04E-05	3,40E+04	2,48E+04	4,531	4,394	5,754
1,38E-06	1,98E-04	7,23E+05	5,05E+03	5,859	3,704	4,948
2,54E-05	-2,02E-07	3,93E+04	-4,95E+06	4,595	#####	4,942
2,64E-05	1,12E-05	3,79E+04	8,89E+04	4,579	4,949	4,934
1,33E-04	8,72E-07	7,53E+03	1,15E+06	3,877	6,060	4,595
3,50E-05	5,58E-05	2,86E+04	1,79E+04	4,456	4,253	4,579
-1,79E-06	1,12E-04	-5,58E+05	8,95E+03	#####	3,952	4,531
-1,30E-06	2,85E-05	-7,70E+05	3,51E+04	#####	4,546	4,456
1,16E-05	-7,35E-08	8,59E+04	-1,36E+07	4,934	#####	4,086
1,76E-06	3,28E-05	5,67E+05	3,05E+04	5,754	4,484	3,877
#####	#####	#####	#####	#####	#####	
1,14E-05	7,34E-05	8,76E+04	1,36E+04	4,942	4,135	
1,13E-05	4,23E-05	8,88E+04	2,37E+04	4,948	4,374	
-1,07E-06	8,32E-06	-9,31E+05	1,20E+05	#####	5,080	

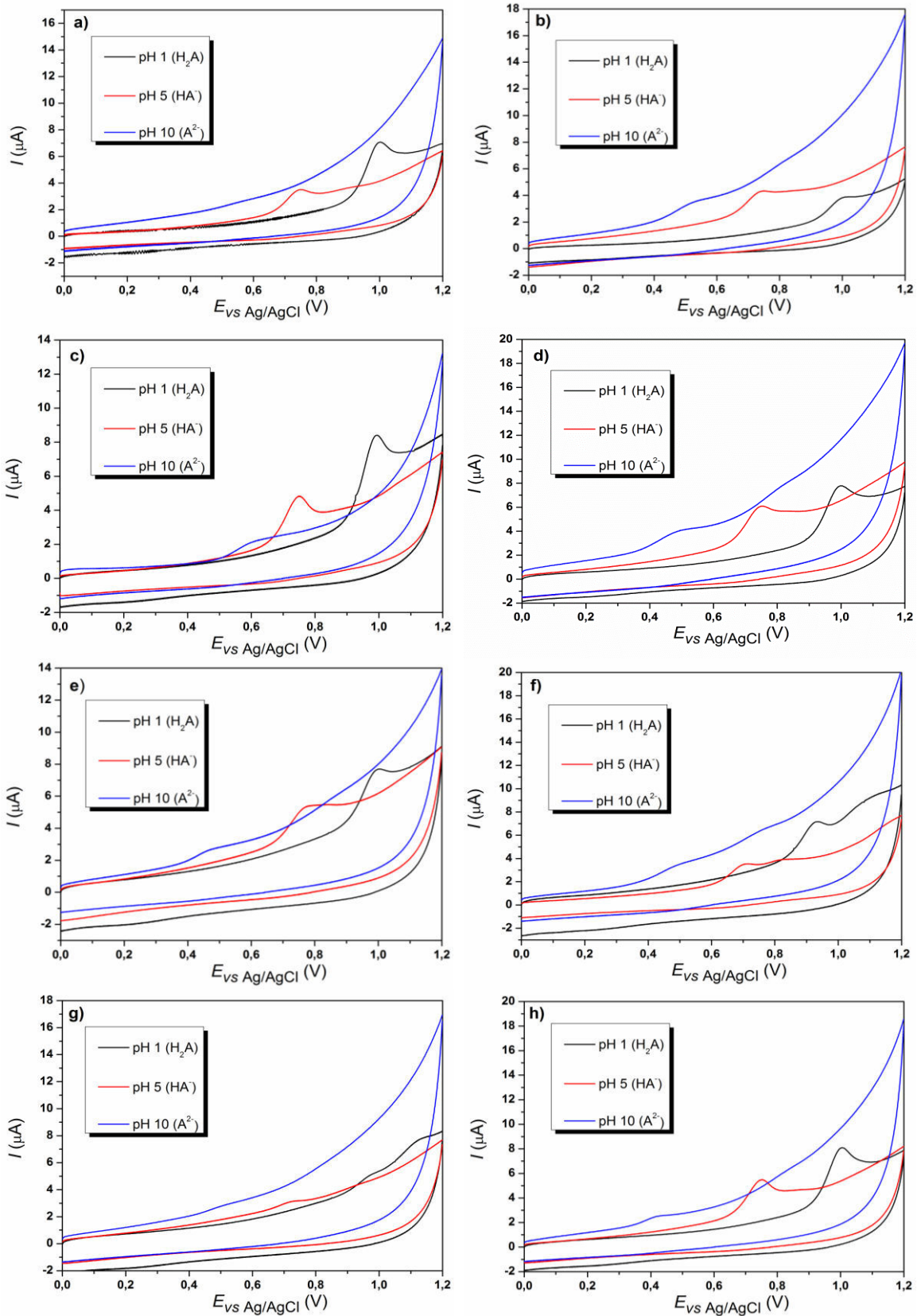
Sred. Vredno: 4,712  
st.dev. 0,219  
medijana 4,595

Slika P30. Primer Excel tablice za izračunavanje K<sub>s</sub> kompleksa tipa ML Rose-Drago metodom.

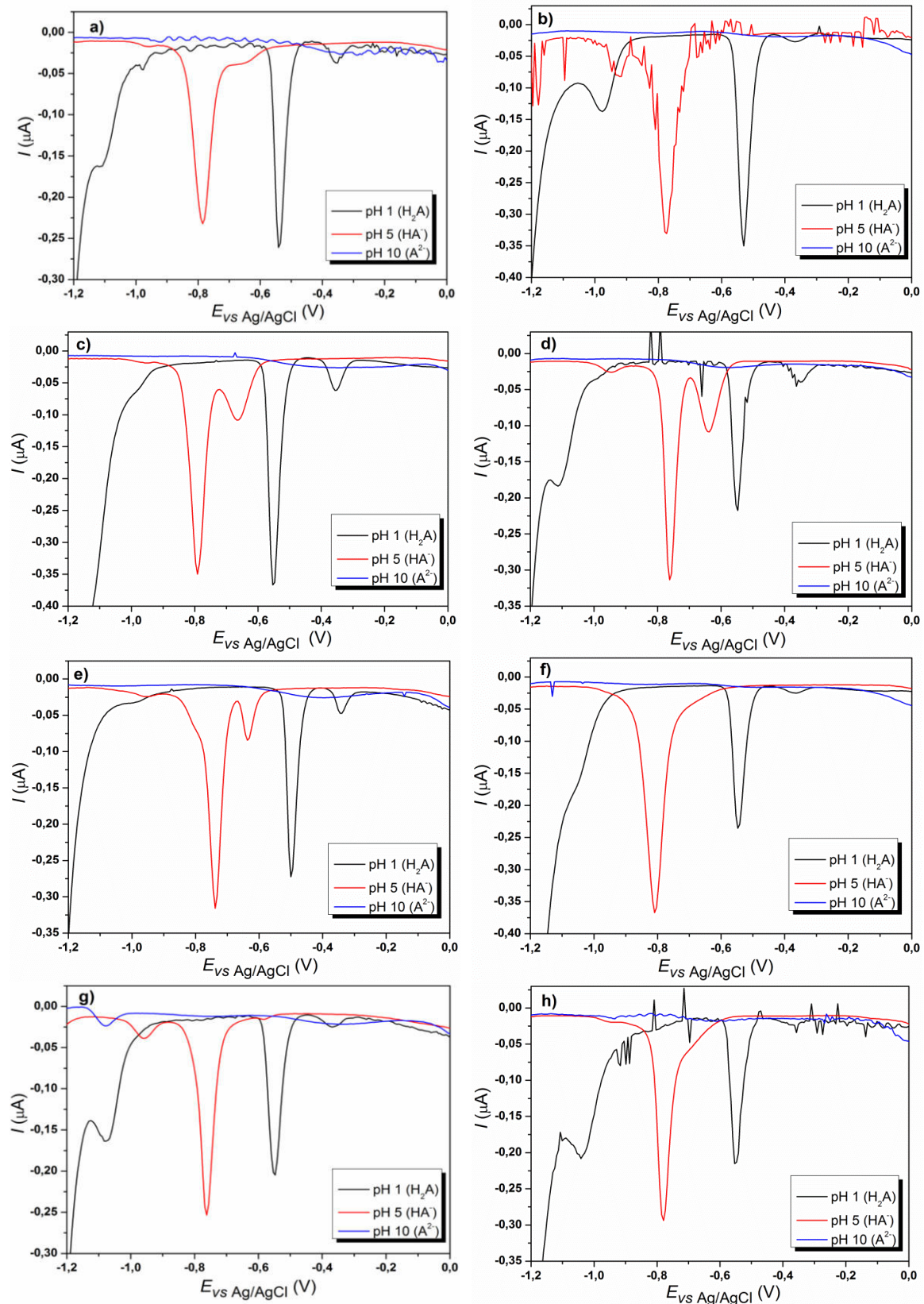




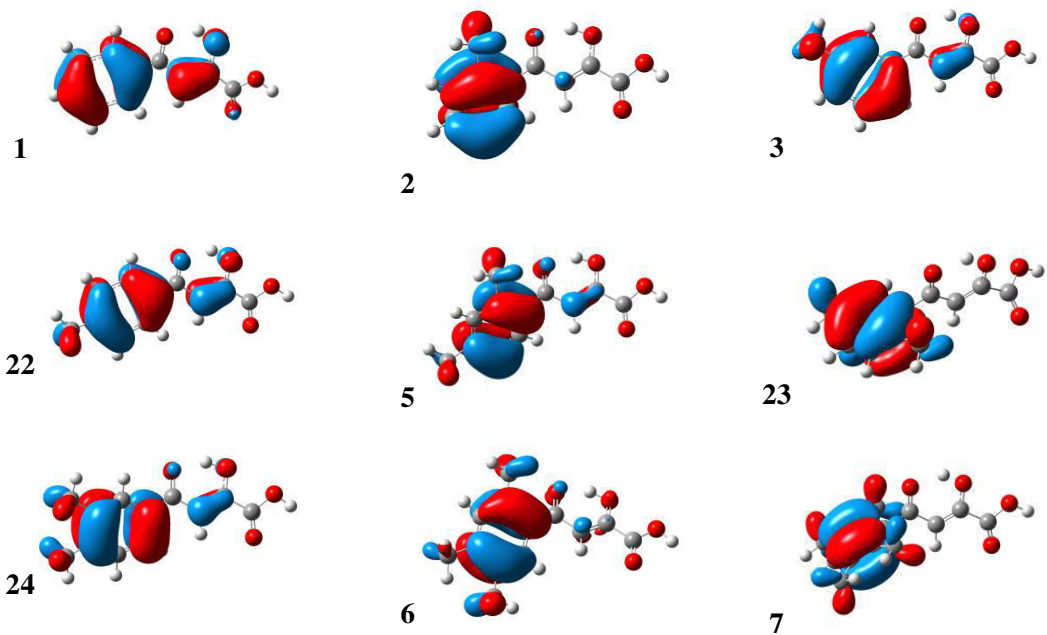
Slika P31.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar ADK 1 u  $\text{CF}_3\text{COOD}$ ,  $\text{pH} < 0$ ,  $t = 25^\circ\text{C}$ .



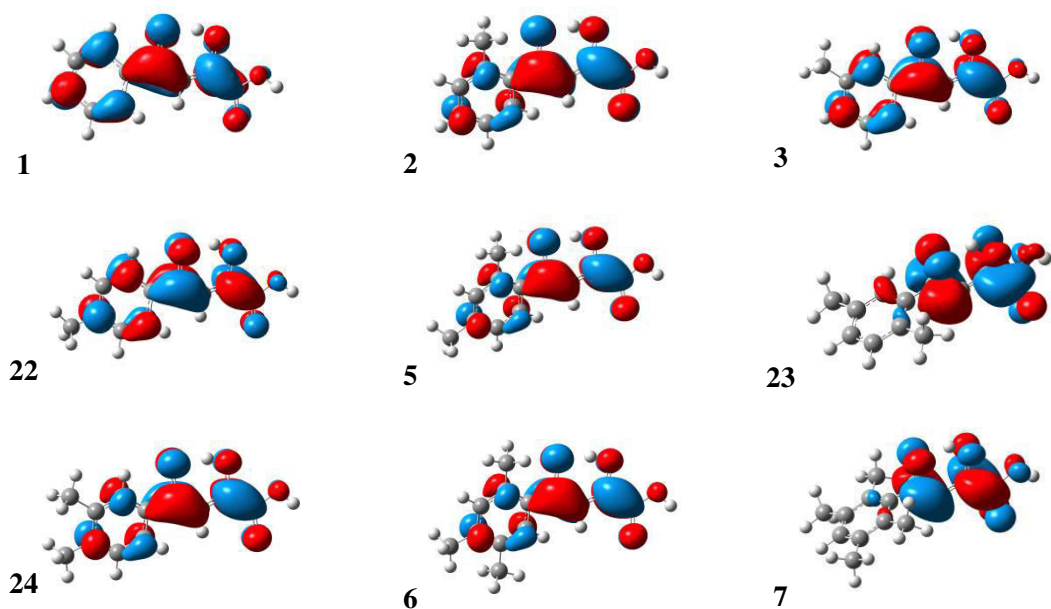
**Slika P32.** Ciklični voltamogrami ADK snimljeni u Britton-Robinson-ovom puferu na pH 1, pH 5 i pH 10; a) **1**,  $c_1 = 5,46 \cdot 10^{-5}$  M; b) **2**,  $c_2 = 4,61 \cdot 10^{-5}$  M; c) **3**,  $c_3 = 6,54 \cdot 10^{-5}$  M; d) **5**,  $c_5 = 6,58 \cdot 10^{-5}$  M; e) **6**,  $c_6 = 4,06 \cdot 10^{-5}$  M; f) **7**,  $c_7 = 4,43 \cdot 10^{-5}$  M; g) **23**,  $c_{23} = 4,09 \cdot 10^{-5}$  M; h) **24**,  $c_{24} = 5,22 \cdot 10^{-5}$  M.



**Slika P33.** Diferencijalni pulsni polarogrami ADK snimljeni u Britton-Robinson-ovom puferu na pH 1, pH 5 i pH 10; a) **2**,  $c_2 = 4,61 \cdot 10^{-5}$  M; b) **3**,  $c_3 = 6,54 \cdot 10^{-5}$  M; c) **5**,  $c_5 = 6,58 \cdot 10^{-5}$ ; d) **6**,  $c_6 = 4,06 \cdot 10^{-5}$  M; e) **7**,  $c_7 = 4,43 \cdot 10^{-5}$  M; f) **22**,  $c_{22} = 4,85 \cdot 10^{-5}$  M; **23**,  $c_{23} = 4,09 \cdot 10^{-5}$  M; h) **24**,  $c_{24} = 5,22 \cdot 10^{-5}$  M



Slika P34. HOMO orbitale molekuskog oblika ( $H_2A$ ) jedinjenja 1-3, 5-7, 22-24 prikazane na izokonturnom nivou 0,03.



Slika P35. LUMO orbitale molekuskog oblika ( $H_2A$ ) jedinjenja 1-3, 5-7, 22-24 prikazane na izokonturnom nivou 0,03.

**Tabela P30.** Energije graničnih molekularskih orbitala (date u Hartrijima), vrednosti indikatorske varijable (*I*) i dipolni momenti (u Debajima) molekularskih i monoanjonskih oblika jedinjenja **1-3**, **5-7**, **22-24**

Jedinjenje	Molekulski oblik (H <sub>2</sub> A)				Monoanjonski oblik (HA <sup>-</sup> )				
	HOMO	LUMO	HOMO-LUMO razlika	Dipolni moment	HOMO	LUMO	HOMO-LUMO razlika	Dipolni moment	<i>I</i>
<b>1</b>	-0,3470	0,0367	0,3837	2,7040	-0,3321	0,0625	0,3946	20,1289	0
<b>2</b>	-0,3359	0,0406	0,3764	2,3366	-0,3274	0,0670	0,3944	20,7147	1
<b>3</b>	-0,3363	0,0377	0,3740	2,8168	-0,3266	0,0625	0,3891	22,3967	1
<b>5</b>	-0,3299	0,0417	0,3716	2,8786	-0,3213	0,0683	0,3896	23,1538	1
<b>6</b>	-0,3196	0,0425	0,3621	3,1584	-0,3129	0,0687	0,3816	24,0766	2
<b>7</b>	-0,3100	0,0448	0,3548	2,4134	-0,3063	0,0778	0,3840	22,9021	4
<b>22</b>	-0,3360	0,0394	0,3754	3,2365	-0,3244	0,0641	0,3885	22,8528	0
<b>23</b>	-0,3236	0,0401	0,3638	2,6851	-0,3172	0,0670	0,3842	21,9031	2
<b>24</b>	-0,3300	0,0403	0,3703	3,3452	-0,3199	0,0641	0,3840	24,8252	1

**Tabela P31.** Energije graničnih molekularskih orbitala (date u Hartrijima) i dipolni momenti (u Debajima, D) radikal anjona i radikal katjona izvedenih iz molekularskih oblika jedinjenja **1-3**, **5-7**, **22-24**.

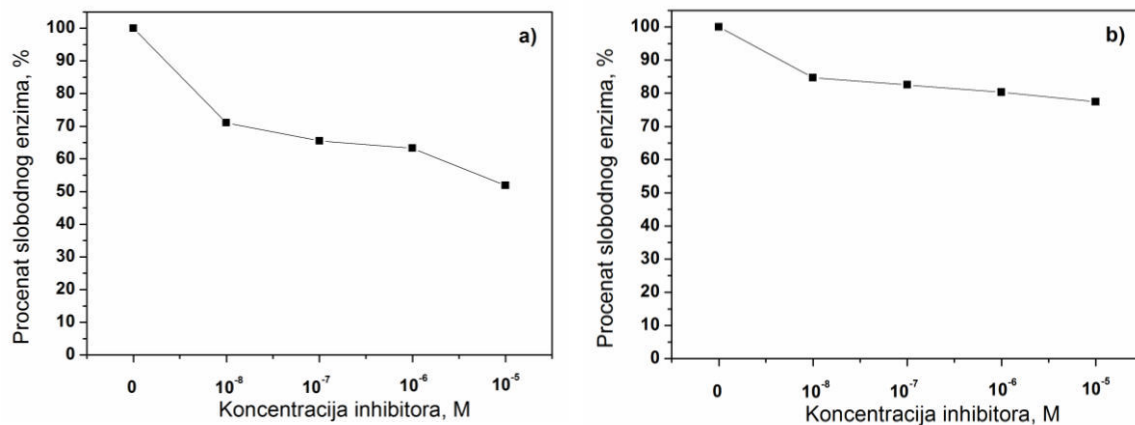
Jedinjenje	Radikal anjon				Radikal katjon			
	SOMO	LUMO	SOMO-LUMO razlika	Dipolni moment	SOMO	LUMO	SOMO-LUMO razlika	Dipolni moment
<b>1</b>	0,0757	0,2471	0,1713	5,1253	-0,3009	-0,1600	0,1409	2,2888
<b>2</b>	0,0767	0,2475	0,1708	5,6837	-0,2996	-0,1579	0,1417	3,0584
<b>3</b>	0,0756	0,2459	0,1703	6,6132	-0,2989	-0,1576	0,1413	3,3480
<b>5</b>	0,0774	0,2465	0,1691	7,7582	-0,2761	-0,1313	0,1449	2,9050
<b>6</b>	0,0772	0,2461	0,1689	8,8467	-0,2751	-0,1316	0,1435	1,9357
<b>7</b>	0,0784	0,2537	0,1754	8,6062	-0,2532	-0,0821	0,1711	10,3233
<b>22</b>	0,0765	0,2458	0,1693	7,3901	-0,2970	-0,1551	0,1419	2,9073
<b>23</b>	0,0766	0,2443	0,1677	7,0045	-0,2975	-0,1555	0,1421	3,4272
<b>24</b>	0,0763	0,2452	0,1690	8,6434	-0,2749	-0,1306	0,1443	3,1645

**Tabela P32.** Elementi interkorelacione matrice ( $r$  vrednosti) između oksidacionih/redukcionih potencijala na pH 1 i pH 5 i deskriptora dobijenih kvantno-mehaničkim proračunima. Skraćenice: “molekulski” -neutralni oblik jedinjenja; “anjon” - monoanjonski oblik jedinjenja; “RK” – radikal katjon; “RA” radikal anjon.

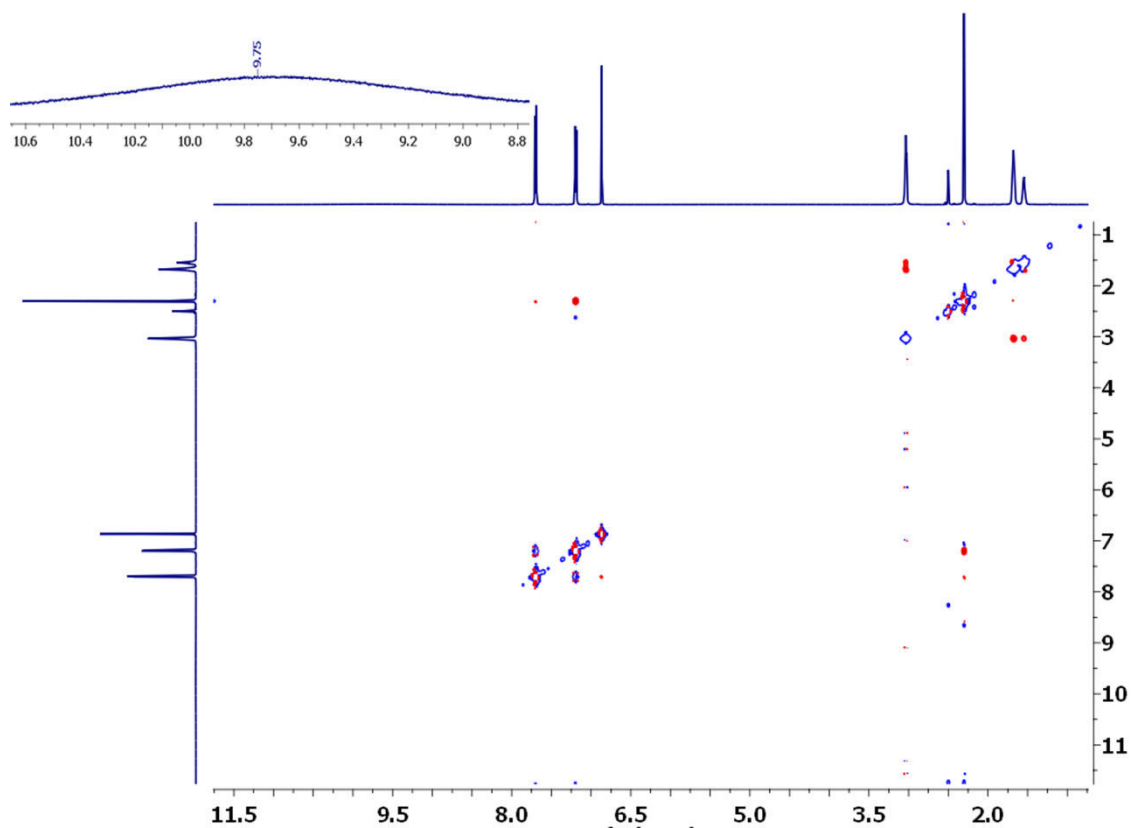
<b>E<sub>oks</sub>-pH 1</b>		<b>E<sub>red</sub>-pH 1</b>	
HOMO molekulski	-0,6797	HOMO molekulski	0,3250
LUMO molekulski	-0,5739	LUMO molekulski	0,2916
HOMO-LUMO razlika molekulski	0,6876	HOMO-LUMO razlika molekulski	-0,3233
Dipolni moment molekulski	0,3642	Dipolni moment molekulski	-0,6104
SOMO (RK)	-0,6565	SOMO (RA)	0,3298
LUMO (RK)	-0,7924	LUMO (RA)	0,8713
SOMO-LUMO razlika RK	-0,9352	SOMO-LUMO razlika RA	0,9361
Dipolni moment RK	-0,9519	Dipolni moment RA	-0,0503
Indikatorska varijabla	-0,7908	Indikatorska varijabla	0,5906
<b>E<sub>oks</sub>-pH 5</b>		<b>E<sub>red</sub>-pH 5</b>	
HOMO molekulski	-0,4092	HOMO molekulski	0,8213
LUMO molekulski	-0,3958	LUMO molekulski	0,7433
HOMO-LUMO razlika molekulski	0,3999	HOMO-LUMO razlika molekulski	-0,6495
Dipolni moment molekulski	0,4117	Dipolni moment molekulski	
SOMO (RK)	-0,4353	SOMO (RA)	0,6858
LUMO (RK)	-0,6048	LUMO (RA)	-0,6739
SOMO-LUMO razlika RK	-0,8283	SOMO-LUMO razlika RA	-0,6869
Dipolni moment RK	-0,9067	Dipolni moment RA	0,7311
Indikatorska varijabla	-0,5295	Indikatorska varijabla	0,9533

**Tabela P33.** Procenat inhibicije dve izoforme humane karboanhidraze (hKA I,  $c = 1 \cdot 10^{-6}$  M i hKA II,  $c = 1 \cdot 10^{-6}$  M) pomoću serije ADK koncentracija  $1 \cdot 10^{-8}$  M i  $1 \cdot 10^{-5}$  M.

Jedinjenje	R-	Procenat inhibicije pomoću ADK dve konc. $10^{-8}$ ( $10^{-5}$ ) M	
		hKA I	hKA II
3	3-CH <sub>3</sub>	29 (48)	15 (23)
4	4- <i>n</i> Bu	32 (45)	9 (26)
7	2,3,5,6-tetraCH <sub>3</sub>	29 (35)	13 (28)
10	4-OCH <sub>3</sub> -2,5-diCH <sub>3</sub>	17 (30)	3 (30)
11	4-OH-3,5-diCH <sub>3</sub>	21 (27)	3 (29)
14	3-OCH <sub>3</sub>	15 (22)	15 (26)
16	3-CF <sub>3</sub>	20 (27)	5 (21)
17	4-pirolidinil	16 (27)	12 (40)
18	4-morfolinil	22 (27)	18 (40)
19	4-imidazolil	18 (24)	15 (39)
20	4- <i>N</i> -CH <sub>3</sub> piperazinil	18 (26)	10 (42)
21	4- <i>N,N</i> -diCH <sub>3</sub>	18 (27)	3 (32)
22	4-CH <sub>3</sub>	30 (41)	7 (24)
23	2,5-diCH <sub>3</sub>	29 (41)	8 (27)
24	3,4-diCH <sub>3</sub>	26 (40)	15 (26)
25	4-izopropil	28 (45)	8 (26)
26	2,4,6-triEt	26 (37)	13 (29)

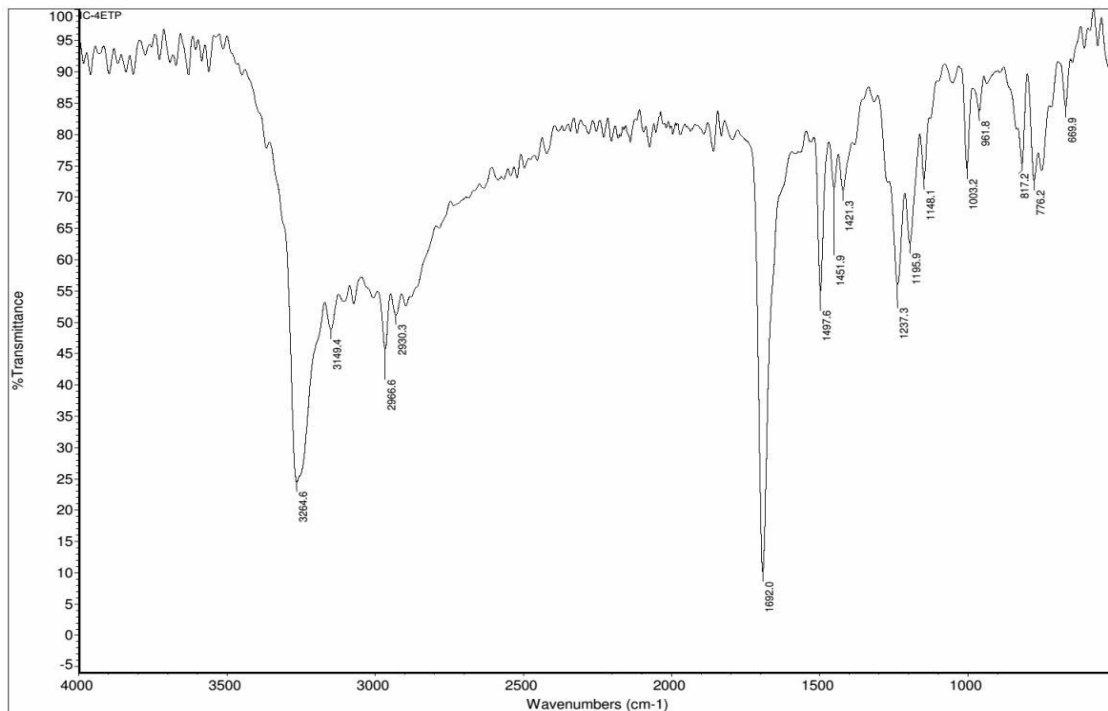


**Slika P36.** Krive zavisnosti procenta inhibicije hKA I (a) i hKA II (b) dejstvom različitih koncentracija jedinjenja 3.

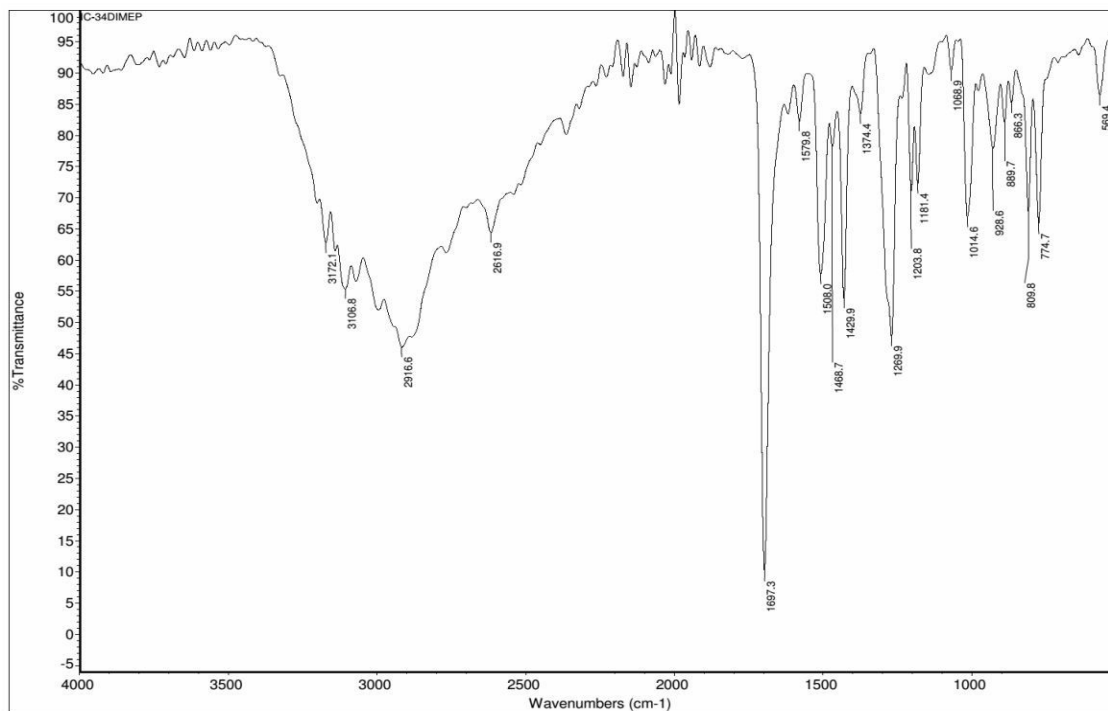


**Slika P37.** NOESY spektar 5-(4-metilfenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (25) u DMSO-u nakon dodatka jednog molarnog ekvivalenta piperidina.



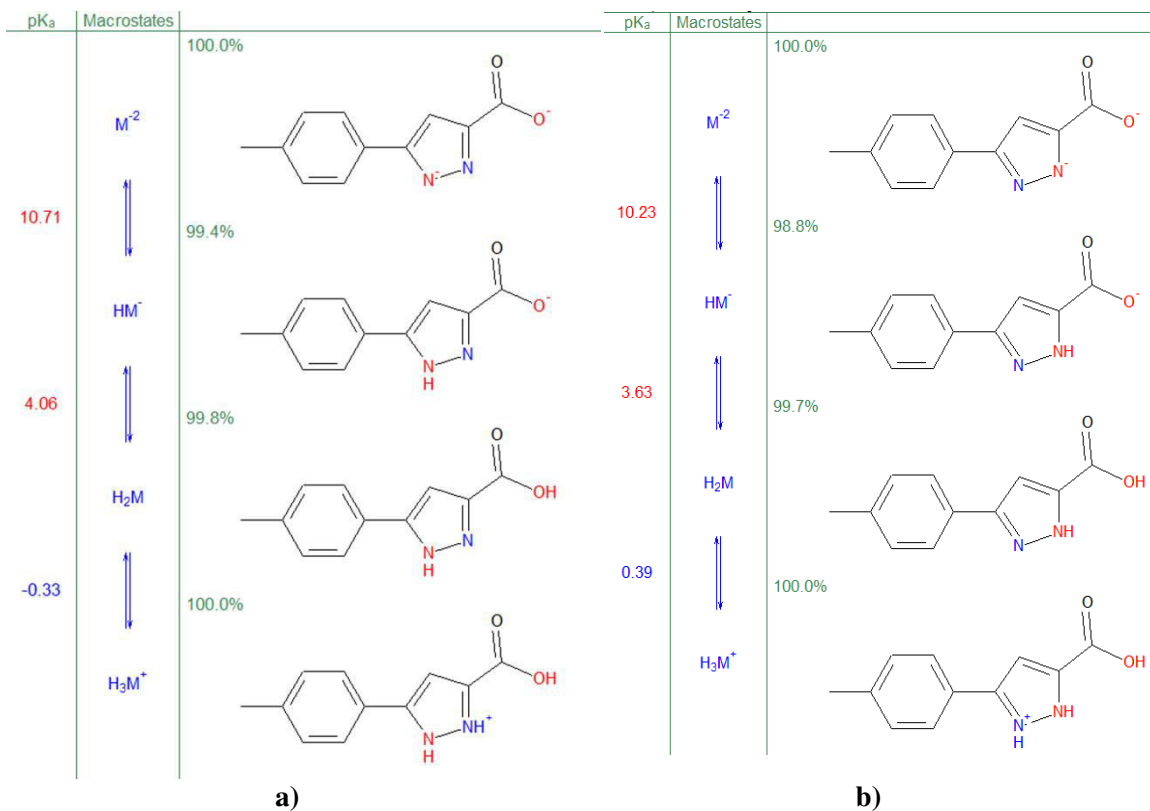


a)

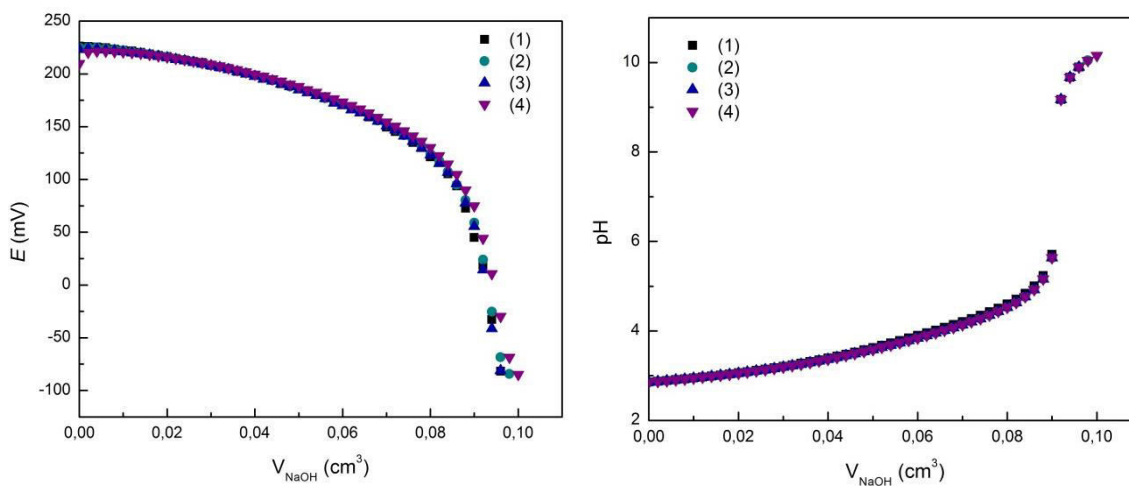


b)

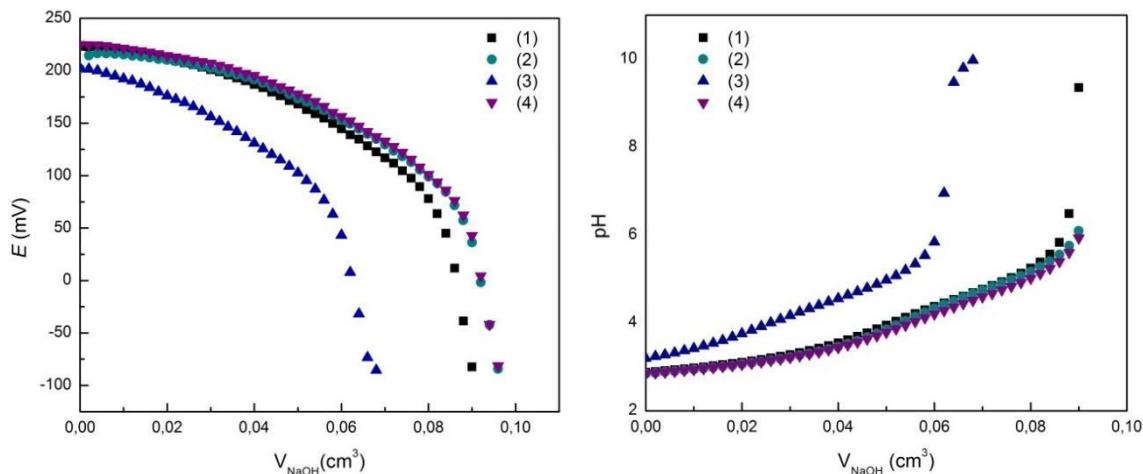
**Slika P38.** FT-IC spektri a) 4-Et (jedinjenje **26**) i b) 3,4-diCH<sub>3</sub> derivata (jedinjenje **31**). U IC spektru jedinjenja **31** primećeno je širenje N-H traka u oblasti ~3100 cm<sup>-1</sup> usled agregacije intramolekulskim vodoničnim vezama.



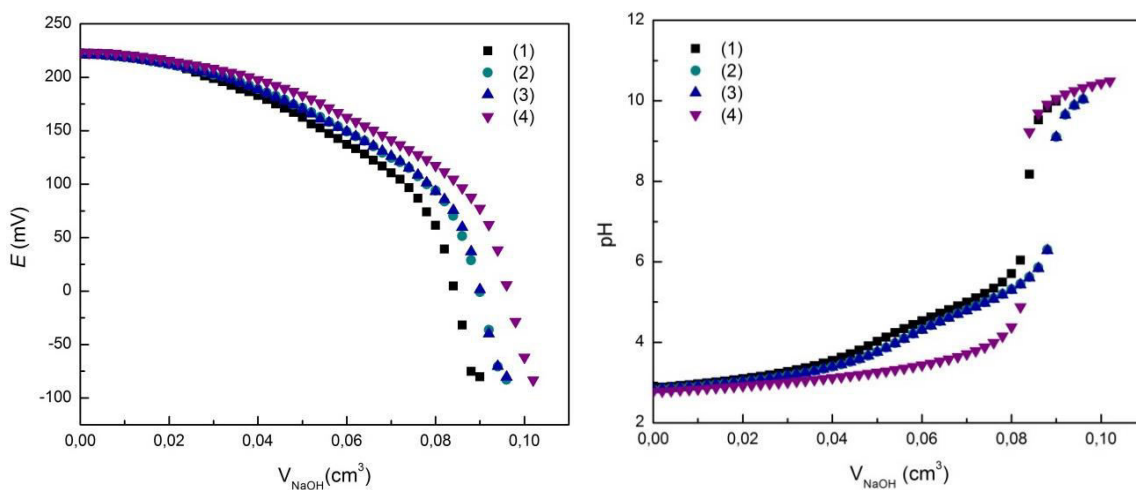
**Slika P39.** pK<sub>a</sub> vrednosti jedinjenja **25** predviđene programom ADMET predictor. Dva tautomera sa protonovanim pirazolskim azotom su uzeta za predikciju.



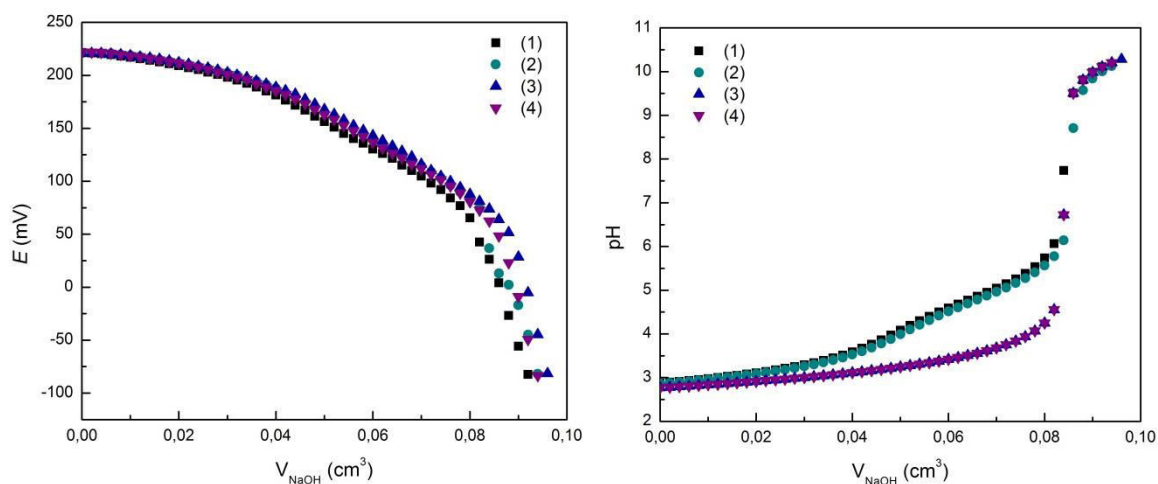
**Slika P40.** Titracione krive titracija smeše jedinjenja **41** ( $c_{41} = 1,2417 \cdot 10^{-3}$  M) i standardnog rastvora HCl ( $0,050 \text{ cm}^3$ ,  $c_{\text{HCl}} = 0,1070$  M) standardnim rastvorom natrijum-hidroksida ( $c_{\text{NaOH}} = 0,1132$  M),  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (KCl).



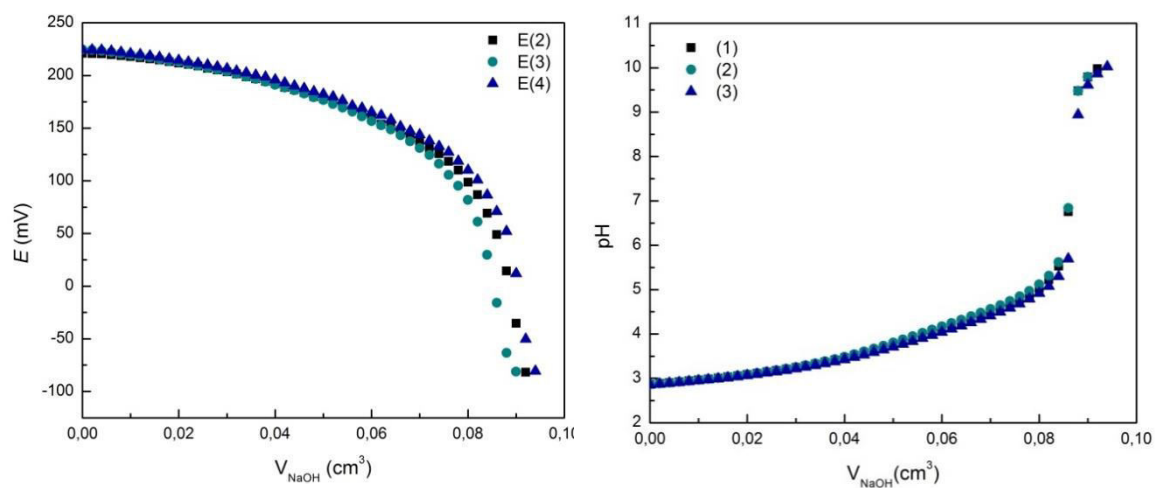
**Slika P41.** Titracione krive titracija smeše jedinjenja **49** ( $c_{49} = 1,1717 \cdot 10^{-3}$  M) i standardnog rastvora HCl ( $0,050 \text{ cm}^3$ ,  $c_{\text{HCl}} = 0,1070$  M) standardnim rastvorom natrijum-hidroksida ( $c_{\text{NaOH}} = 0,1132$  M),  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (KCl).



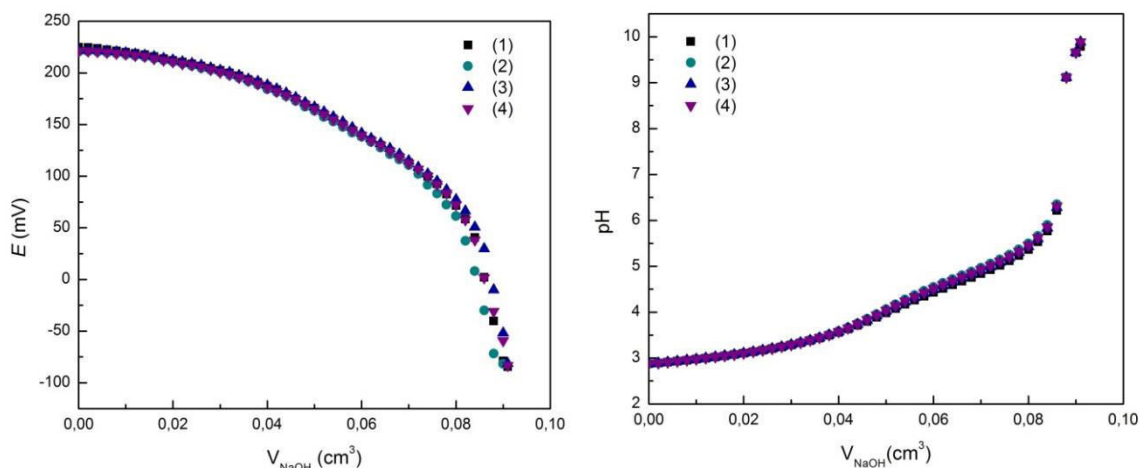
**Slika P42.** Titracione krive titracija smeše jedinjenja **33** ( $c_{33} = 1,0561 \cdot 10^{-3}$  M) i standardnog rastvora HCl ( $0,050 \text{ cm}^3$ ,  $c_{\text{HCl}} = 0,1070$  M) standardnim rastvorom natrijum-hidroksida ( $c_{\text{NaOH}} = 0,1132$  M),  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (KCl).



**Slika P43.** Titracione krive titracija smeše jedinjenja **51** ( $c_{51} = 1,0452 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) i standardnog rastvora HCl ( $0,050 \text{ cm}^3$ ,  $c_{\text{HCl}} = 0,1070 \text{ M}$ ) standardnim rastvorom natrijum-hidroksida ( $c_{\text{NaOH}} = 0,1132 \text{ M}$ ),  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1 \text{ M}$  (KCl).



**Slika P44.** Titracione krive titracija smeše jedinjenja **46** ( $c_{46} = 1,0907 \cdot 10^{-3} \text{ M}$ ) i standardnog rastvora HCl ( $0,050 \text{ cm}^3$ ,  $c_{\text{HCl}} = 0,1070 \text{ M}$ ) standardnim rastvorom natrijum-hidroksida ( $c_{\text{NaOH}} = 0,1132 \text{ M}$ ),  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1 \text{ M}$  (KCl).



**Slika P45.** Titracione krive titracija smeše jedinjenja **50** ( $c_{50} = 1,1281 \cdot 10^{-3}$  M) i standardnog rastvora HCl ( $0,050 \text{ cm}^3$ ,  $c_{\text{HCl}} = 0,1070$  M) standardnim rastvorom natrijum-hidroksida ( $c_{\text{NaOH}} = 0,1132$  M),  $t = 25 \pm 1^\circ\text{C}$ ,  $I = 0,1$  M (KCl).

**Tabela P34.** Izračunate molekulske osobine jedinjenja **25-45, 47, 48**

Jedinjenje	R-	UP*	PP*	NP*	Zapremina	VLogP*
<b>25</b>	4-Me-	224,8130	64,0790	160,7340	177,4143	1,4671
<b>26</b>	4-Et-	243,2491	64,0790	179,1701	192,8189	2,0007
<b>27</b>	4- <i>i</i> -Pr-	264,0426	64,0790	199,9636	209,9865	2,0888
<b>28</b>	4- <i>n</i> -Bu-	292,9753	65,6070	227,3683	230,5539	2,8327
<b>29</b>	4- <i>t</i> -Bu-	282,4734	63,6160	<b>218,8573</b>	<b>228,9744</b>	<b>2,6183</b>
<b>30</b>	2,4-di-Me-	246,8261	65,3018	181,5243	194,0475	1,9798
<b>31</b>	3,4-di-Me-	242,2963	65,0251	177,2712	193,6693	1,9467
<b>32</b>	2,4,5-tri-Me-	264,9485	64,5335	200,4150	212,3705	2,3428
<b>33</b>	2,3,5,6-tetra-Me-	284,3445	65,9355	<b>218,4090</b>	<b>228,3398</b>	<b>2,6140</b>
<b>34</b>	2,4,6-tri-Et-	327,5655	63,9959	263,5696	261,0485	3,4748
<b>35</b>	2,4-di- <i>i</i> -Pr-	326,4613	64,9063	261,5551	261,1596	2,9713
<b>36</b>	2,4,6-tri- <i>i</i> -Pr-	387,3279	64,1751	323,1528	311,0422	3,9021
<b>37</b>	$\beta$ -Tetralinil-	268,1217	65,0251	203,0966	218,2483	2,3040
<b>38</b>	$\beta$ -Naftil-	251,6167	64,3173	187,2994	206,9182	1,9691
<b>39</b>	4-Fenil-	273,0847	64,9809	208,1038	228,0558	2,2108
<b>40</b>	4-Pirolidinil-	281,5775	67,1797	214,3978	229,2079	1,7434
<b>41</b>	4-F-	205,8496	64,0790	141,7706	163,2093	1,2486
<b>42</b>	4-Cl-	217,0917	64,0790	153,0126	174,1838	1,6192
<b>43</b>	3-Br-	224,0955	64,6011	159,4944	179,5580	1,9400
<b>44</b>	4-OH-	211,6867	87,4045	124,2822	168,2015	0,4326
<b>45</b>	2-OMe-	236,4103	76,4652	159,9451	186,9544	0,9978
<b>47</b>	4-OMe-	232,9842	75,3840	157,6001	185,6467	1,0959
<b>48</b>	4-OMe-2,5-di-Me-	280,0472	75,7126	204,3346	222,4115	1,9971

\*UP- ukupna površina, PP- polarna površina, NP- nepolarna površina

**Tabela P35.** Statistički parametri PLS modela antiproliferativne aktivnosti jedinjenja **1b-33b** prema HeLa ćelijskoj liniji kancera.

LV	SSX <sub>acc</sub>	SSX <sub>acc</sub>	SDEC	SDEP	$r^2$	$q^2$ (LOO)	$q^2$ (LTO)	$q^2$ (RG)
1	30,23	30,23	0,35	0,43	0,58	0,36	0,37	0,40
2	24,52	54,75	0,21	0,28	0,85	0,73	0,74	0,75
3	16,28	71,03	0,13	0,19	0,94	0,87	0,87	0,85

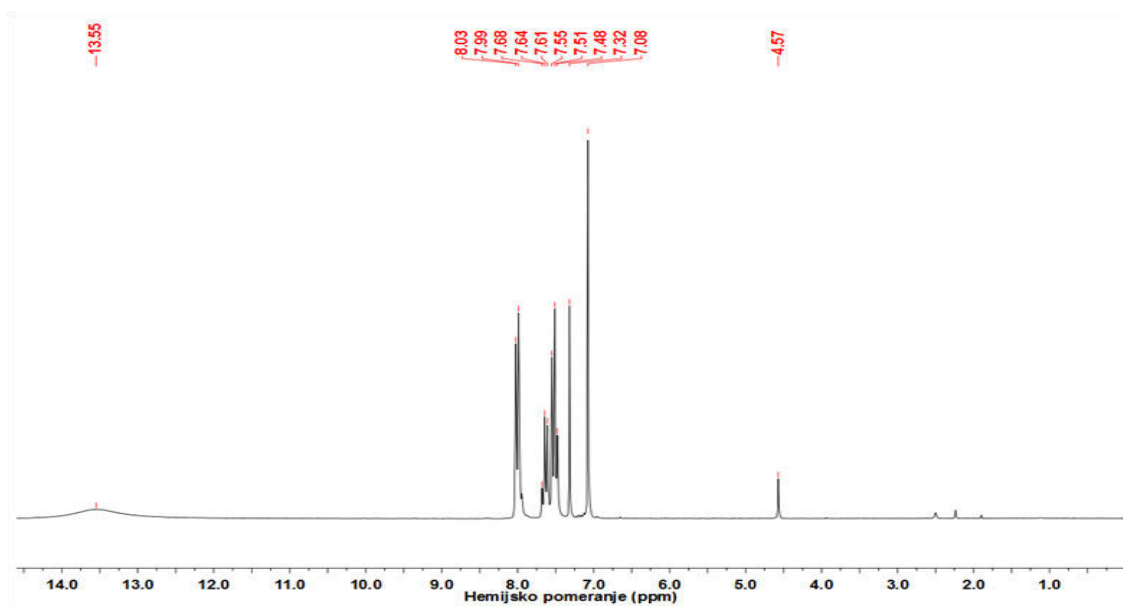
**Tabela P36.** Statistički parametri PLS modela antiproliferativne aktivnosti jedinjenja **1b-33b** prema FemX ćelijskoj liniji kancera.

LV	SSX <sub>acc</sub>	SSX <sub>acc</sub>	SDEC	SDEP	$r^2$	$q^2$ (LOO)	$q^2$ (LTO)	$q^2$ (RG)
1	35,56	35,56	0,33	0,38	0,62	0,48	0,48	0,46
2	23,22	58,79	0,23	0,30	0,81	0,68	0,67	0,66
3	14,28	73,06	0,18	0,26	0,89	0,77	0,77	0,74

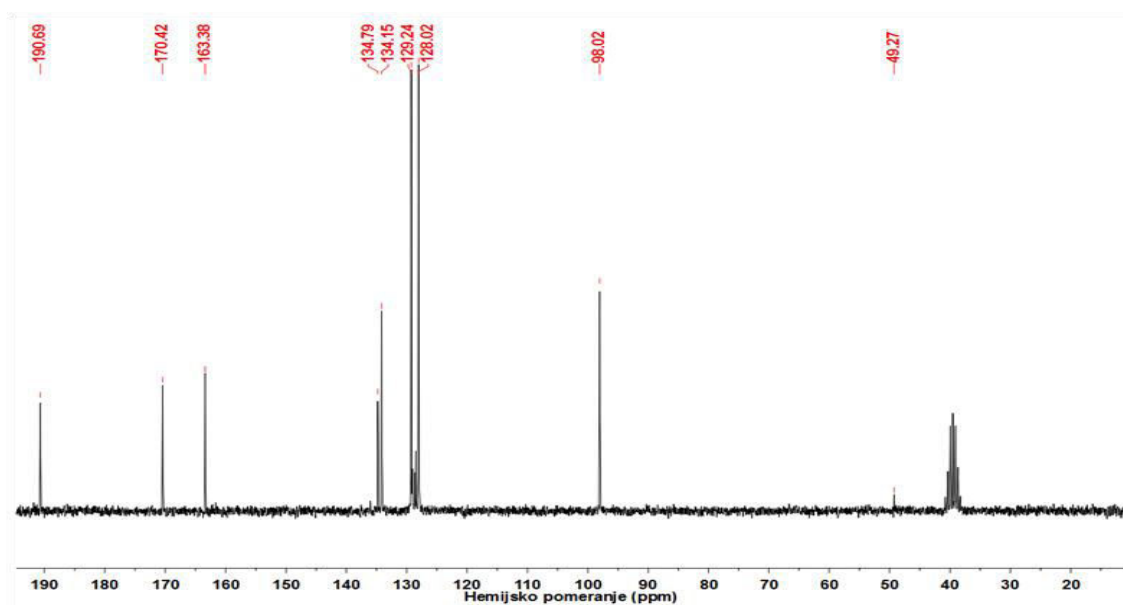
**Tabela P37.** Molekulski deskriptori izračunate pomoću VegaZZ i GRID/BIOCUBE programa

Jed.	PSA (Å <sup>2</sup> )	VlogP	Lipole (Broto)	O zapremina	N1 zapremina	DRY zapremina	p(IC <sub>50</sub> ) (HeLa)	p(IC <sub>50</sub> ) (FemX)
1b	84,7	2,97	1,55	0	0,62	0,38	4,12	4,14
2b	134,8	2,38	2,28	54,00	1,00	0,38	3,92	3,81
3b	141,4	1,86	3,12	48,12	0,75	0,38	3,94	3,92
4b	86,8	3,15	1,32	22,50	0,25	0,88	3,93	3,99
5b	154,7	1,47	3,87	127,25	0,38	0,38	3,87	3,92
6b	119,1	6,52	1,77	2,38	1,00	1,00	4,74	5,20
7b	171,0	6,02	2,09	55,50	0,75	1,38	5,16	4,60
8b	177,2	5,40	2,50	45,75	1,62	1,12	5,28	5,22
9b	120,9	6,67	1,77	22,12	2,00	1,50	5,19	4,88
10b	104,5	8,93	1,93	2,75	2,00	3,00	4,55	4,41
11b	102,6	7,04	1,51	1,88	1,25	3,25	5,14	5,04
12b	140,9	6,00	1,01	2,62	1,12	0,88	4,73	4,28
13b	141,5	6,08	0,99	2,75	1,12	0,75	4,96	4,13
14b	141,5	6,05	1,09	2,62	1,12	0,62	5,30	4,60
15b	149,5	5,52	1,09	2,88	1,50	0,88	4,97	4,37
16b	136,2	6,69	1,62	1,75	1,25	1,75	4,99	4,29
17b	213,0	13,12	0,24	7,38	4,50	9,25	3,98	4,32
18b	223,0	8,82	0,30	9,00	4,12	4,75	4,05	4,10
19b	359,1	6,10	0,15	91,25	5,25	1,00	5,43	5,51
20b	256,1	8,34	0,15	44,12	4,38	2,25	4,48	4,64
21b	343,7	7,14	0,19	108,88	3,12	1,25	5,28	5,38
22b	329,9	6,06	2,26	34,50	5,00	1,00	5,44	5,33
23b	219,0	8,99	1,21	8,75	3,75	3,50	3,92	3,99
24b	361,9	6,14	1,99	88,88	3,12	1,50	5,22	5,21
25b	215,9	9,60	0,72	39,88	4,12	2,75	5,08	4,59
26b	342,3	7,25	1,44	113,25	2,62	1,75	5,04	5,12
27b	244,1	8,33	1,09	6,25	2,50	1,12	4,69	4,71
28b	201,9	5,35	2,04	45,50	1,75	0,62	5,28	5,30
29b	202,3	5,40	2,08	49,25	2,00	1,38	5,39	5,37
30b	150,6	5,79	1,71	21,75	2,12	0,88	5,31	5,16
31b	149,4	5,83	1,95	22,38	2,00	1,38	5,17	5,35
32b	147,3	6,11	1,64	22,62	1,62	1,25	5,16	5,17
33b	145,3	6,11	1,87	22,50	1,62	1,38	5,16	5,05

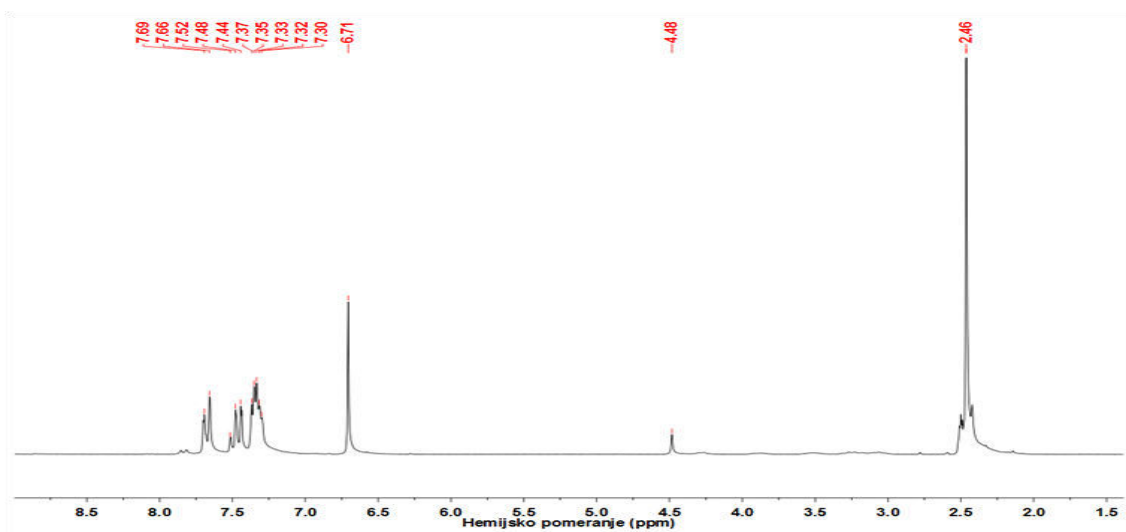
## Prilog 2. NMR spektri ADK



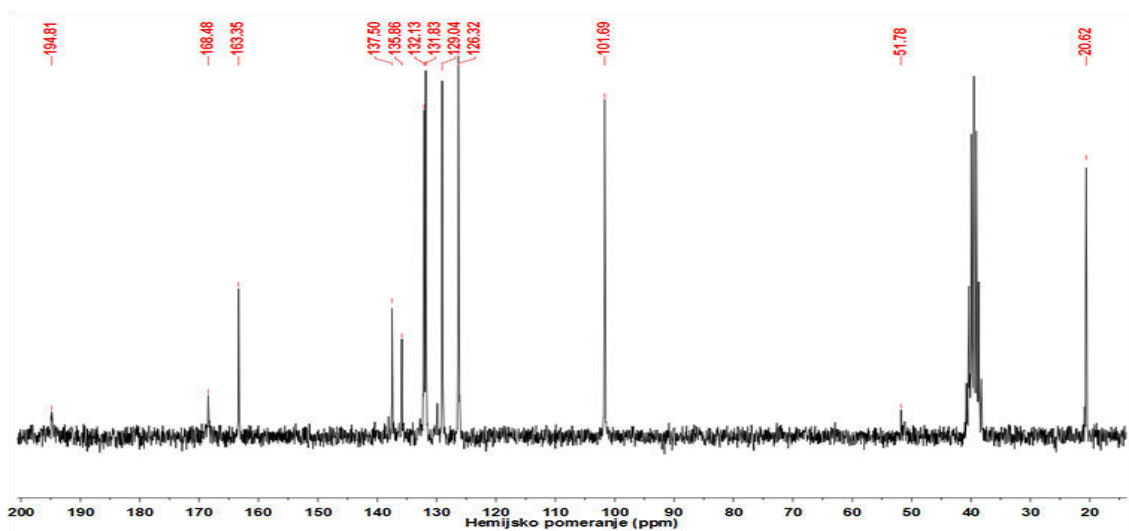
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-fenil-2,4-dioksobutanske kiseline (1)



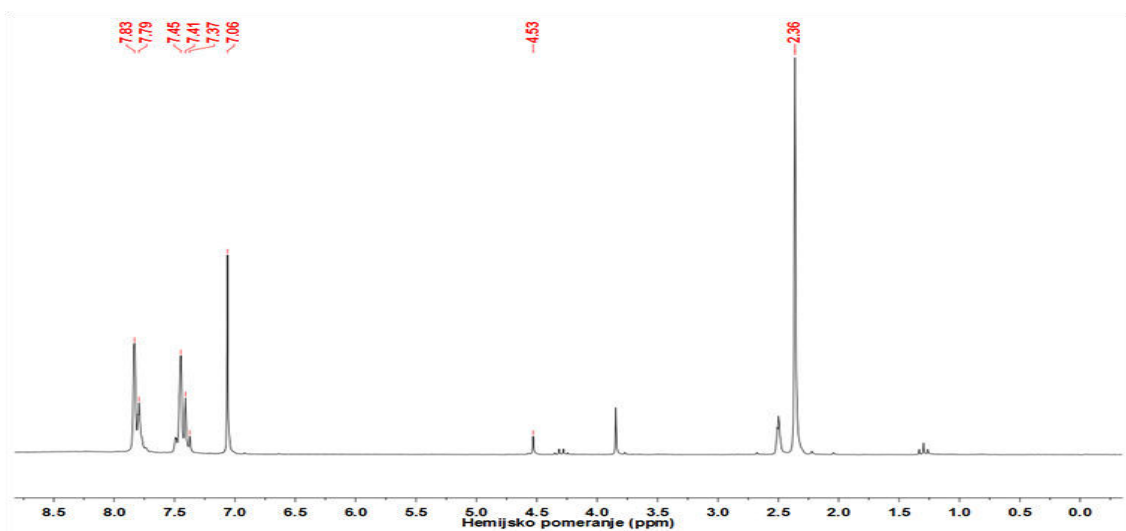
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-fenil-2,4-dioksobutanske kiseline (1)



<sup>1</sup>H NMR spektar 4-(2-metilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (2)

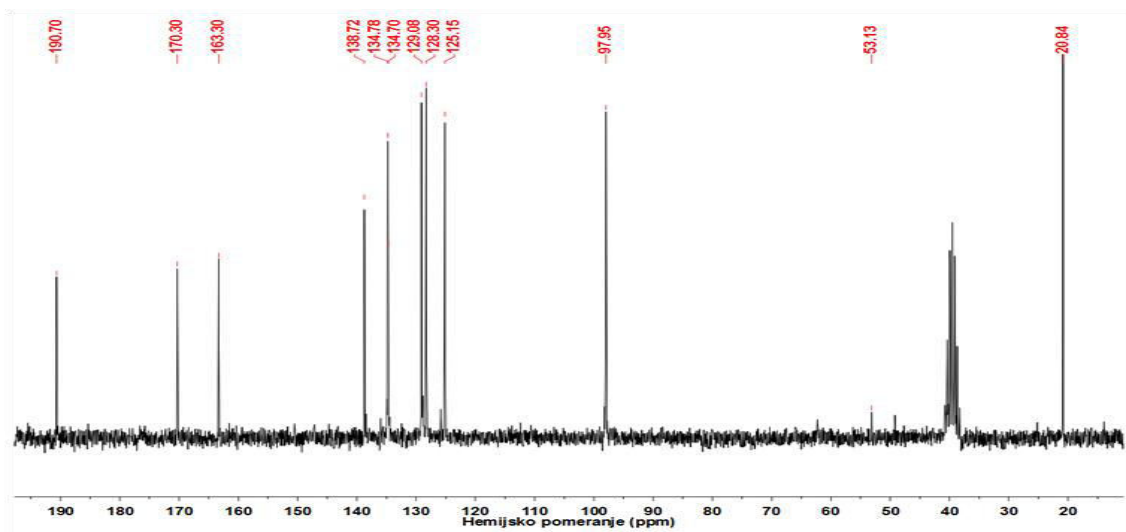


<sup>13</sup>C NMR spektar 4-(2-metilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (2)

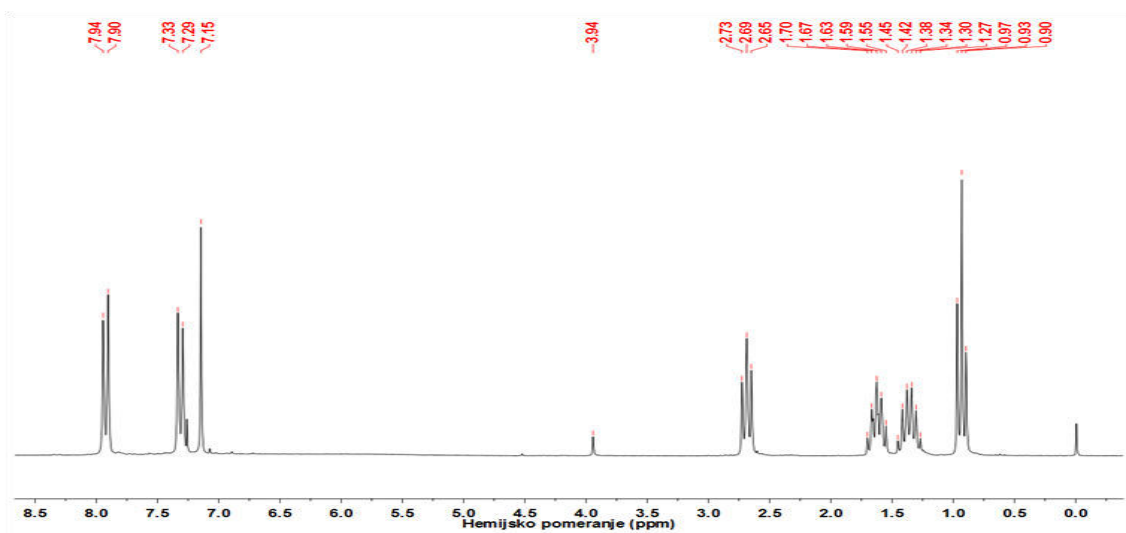


<sup>1</sup>H NMR spektar 4-(3-metilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (3)

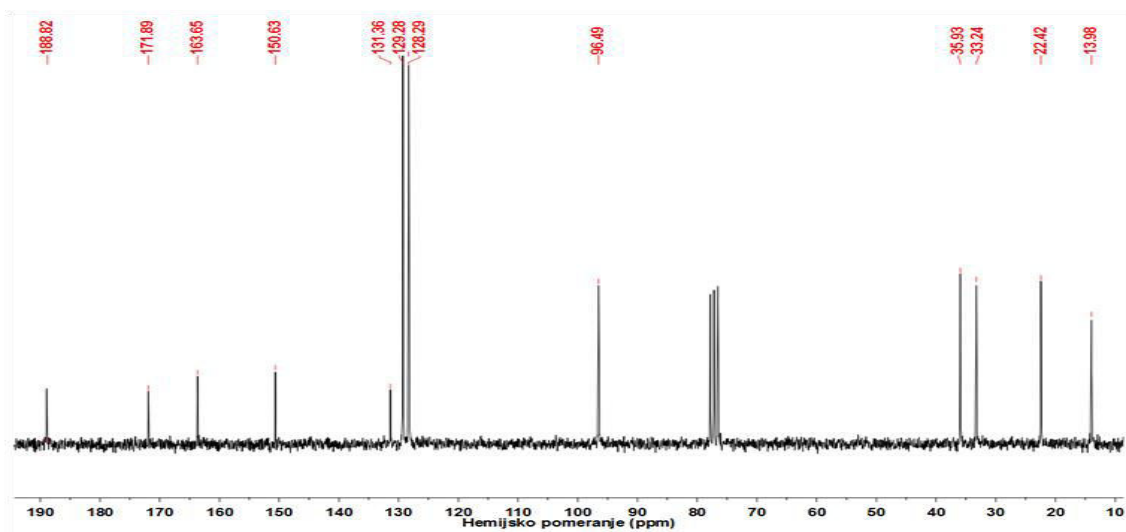




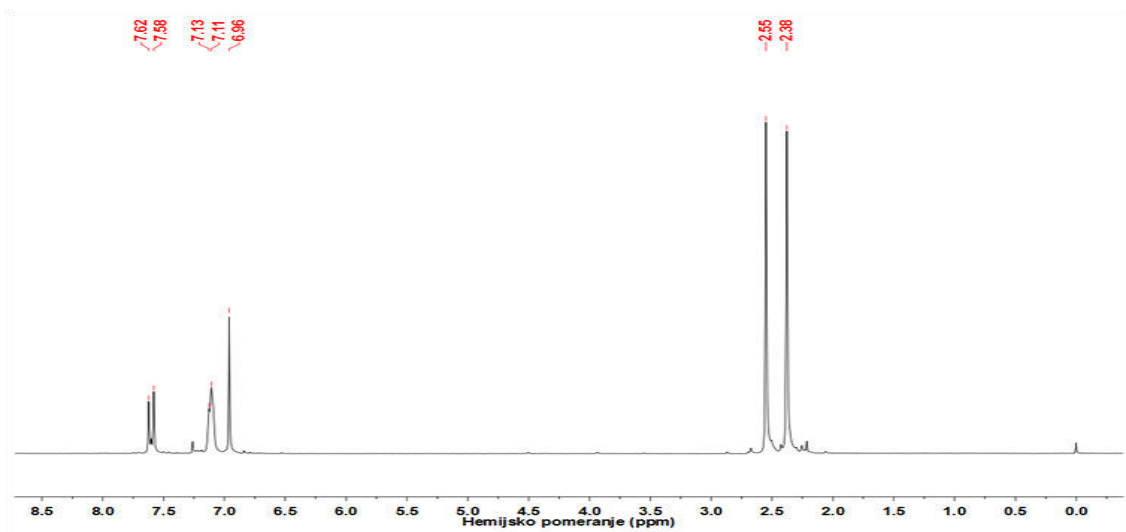
<sup>13</sup>C NMR spektar 4-(3-metilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (3)



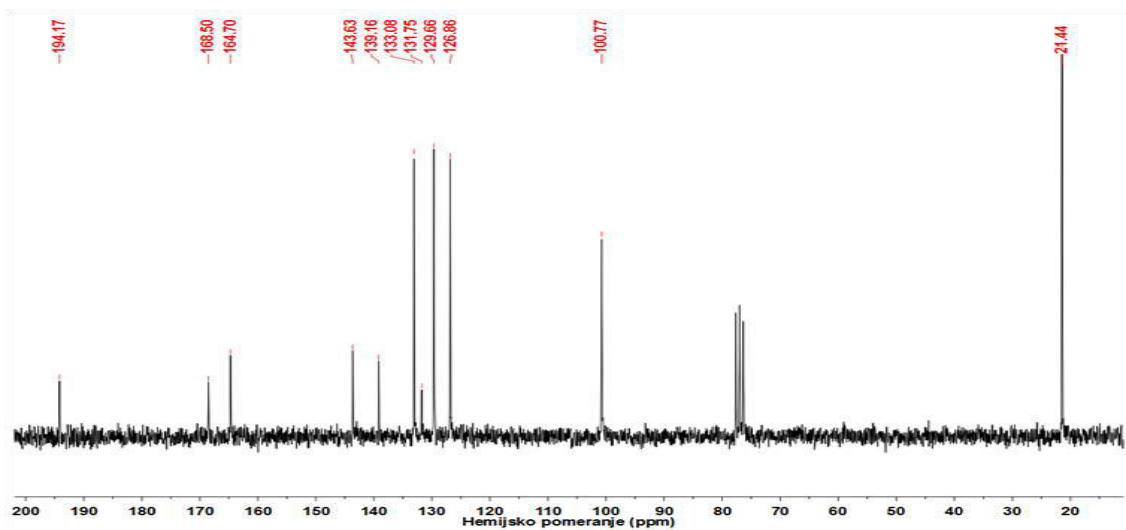
<sup>1</sup>H NMR spektar 4-(n-butilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (4)



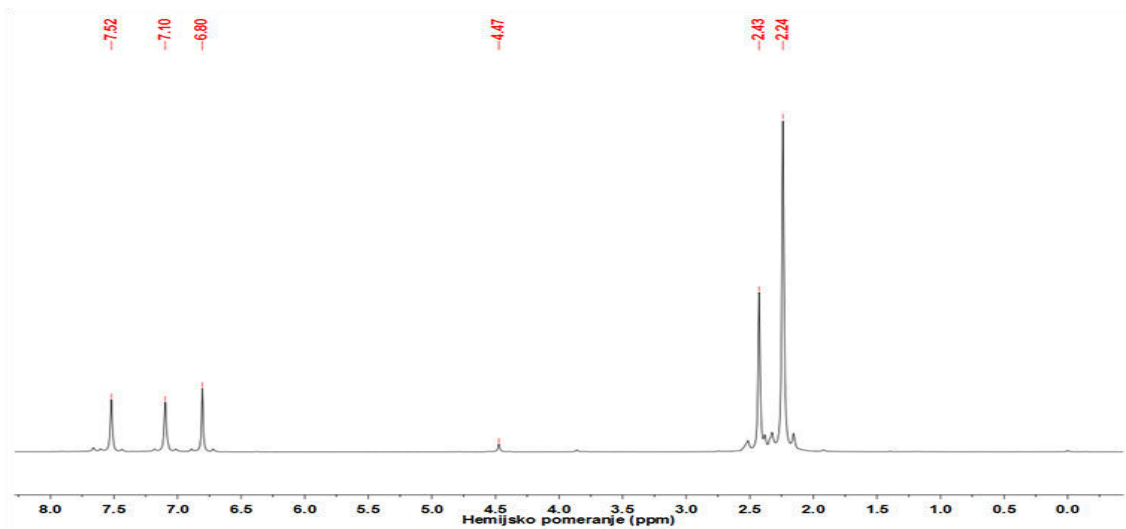
<sup>13</sup>C NMR spektar 4-(n-butilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (4)



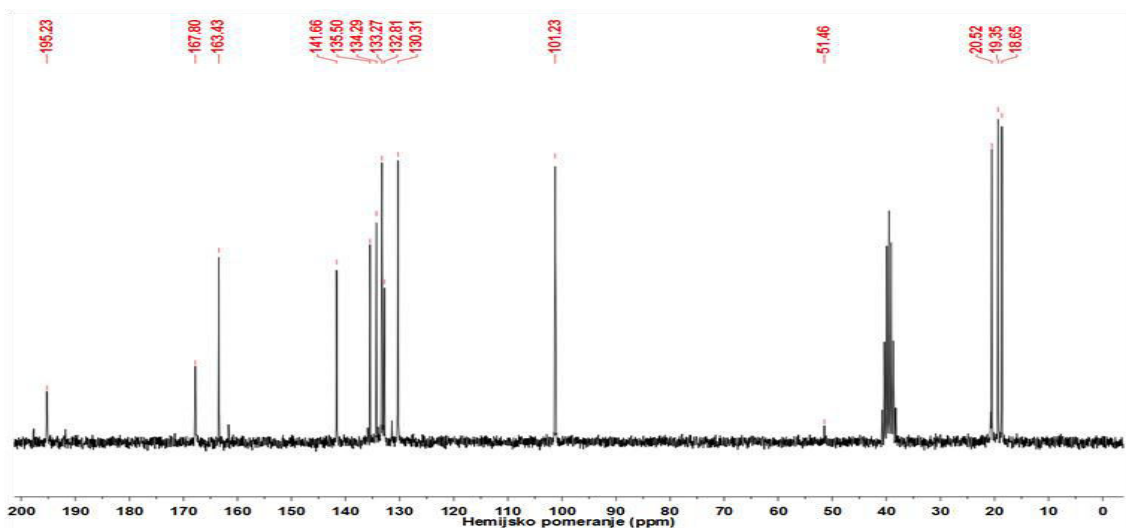
<sup>1</sup>H NMR spektar 4-(2,4-dimetilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (5)



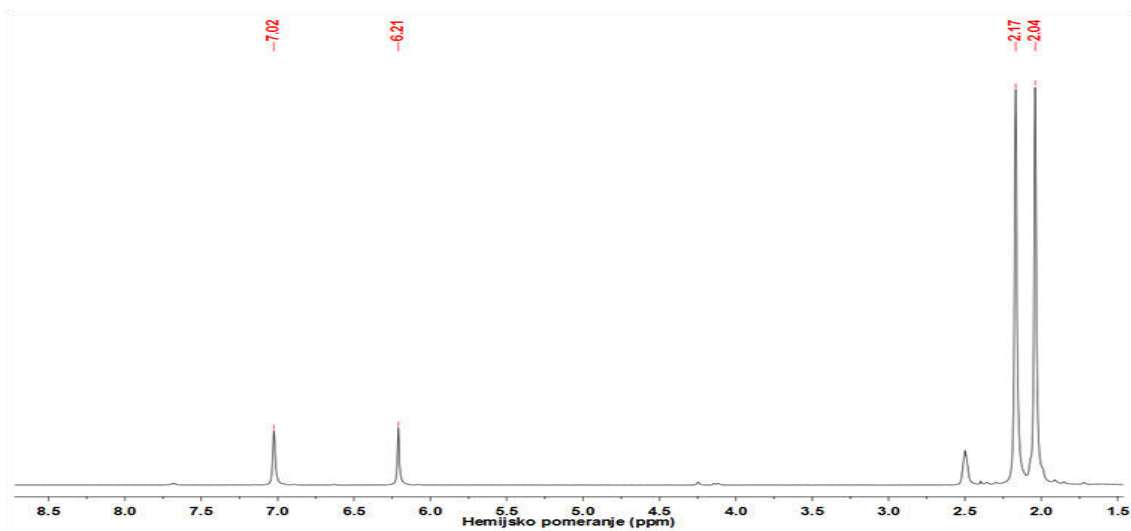
<sup>13</sup>C NMR spektar 4-(2,4-dimetilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (5)



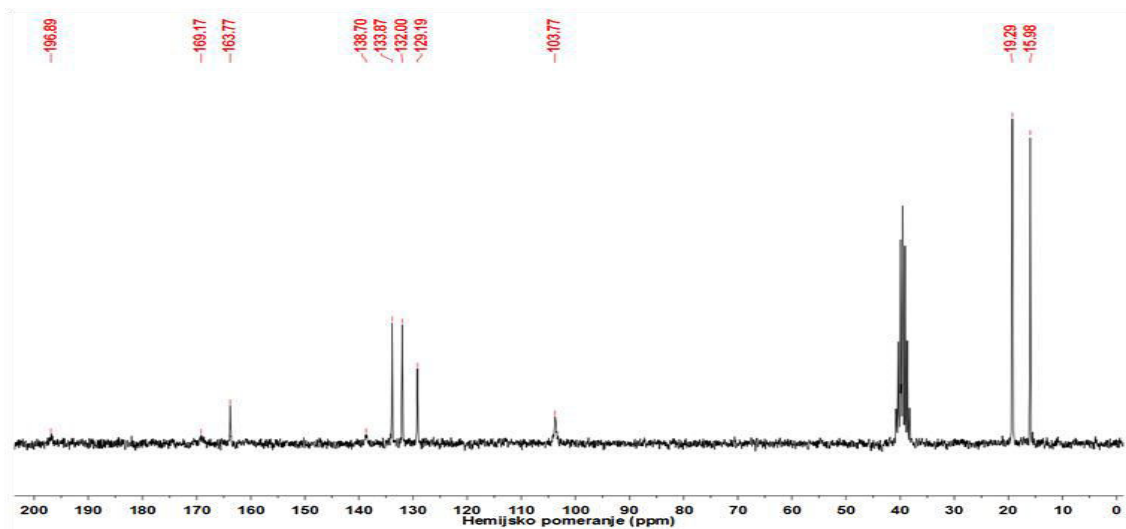
<sup>1</sup>H NMR spektar 4-(2,4,5-trimetilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (6)



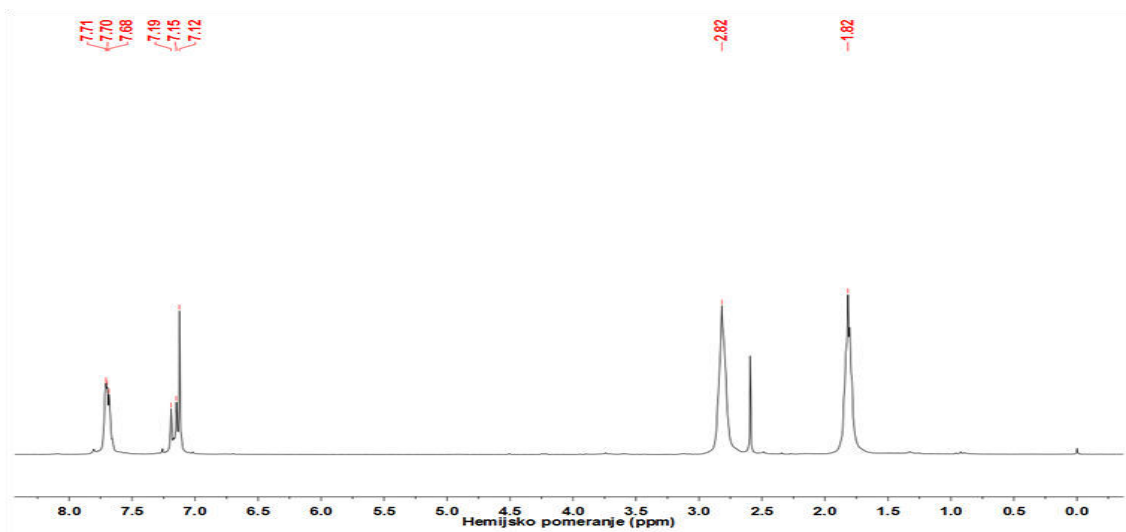
<sup>13</sup>C NMR spektar 4-(2,4,5-trimetilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (6)



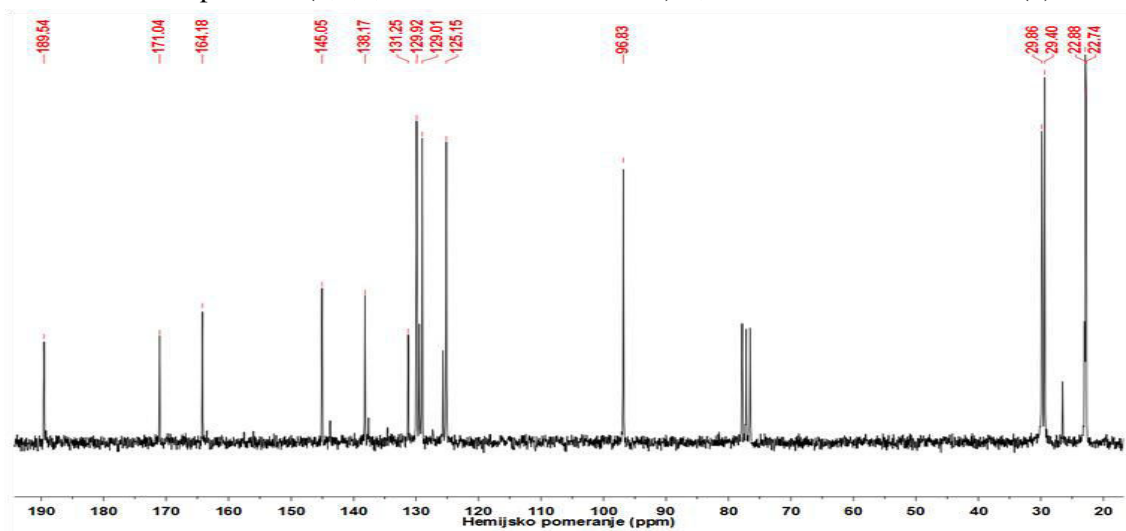
<sup>1</sup>H NMR spektar 4-(2,3,5,6-tetrametilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (7)



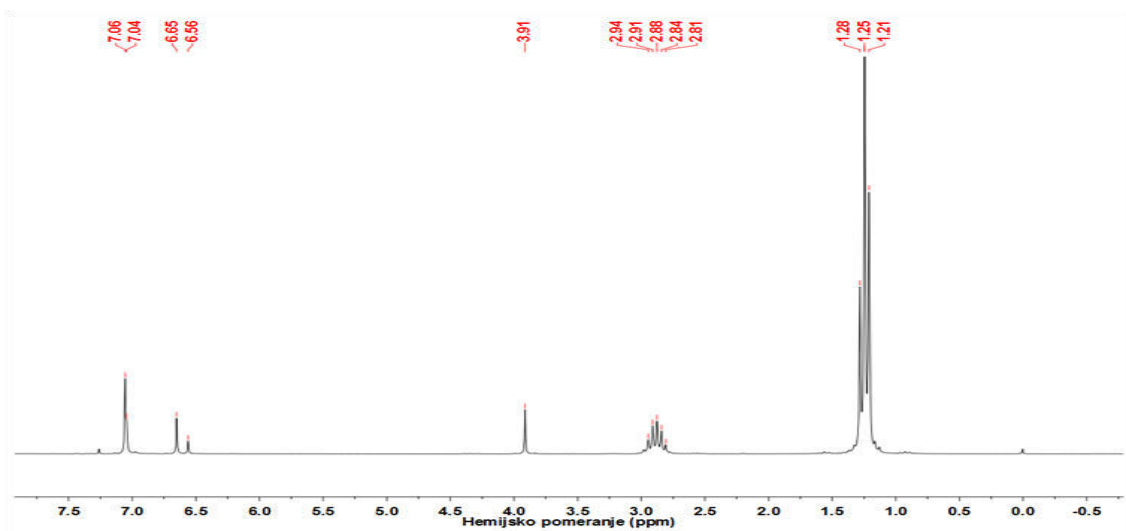
<sup>13</sup>C NMR spektar 4-(2,3,5,6-tetrametilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (7)



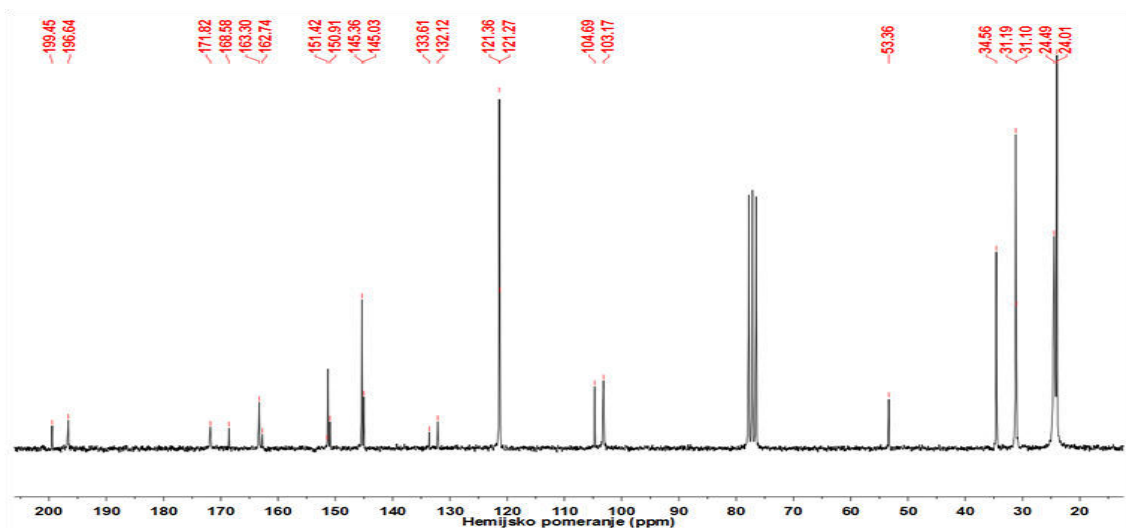
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-il)-2,4-dioksobutanske kiseline (8)



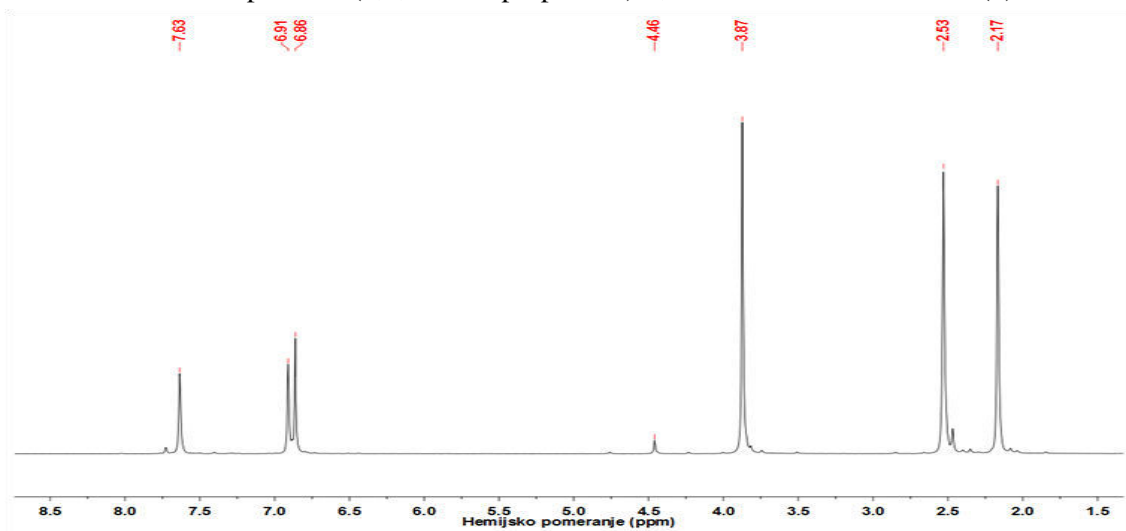
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-(5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-il)-2,4-dioksobutanske kiseline (8)



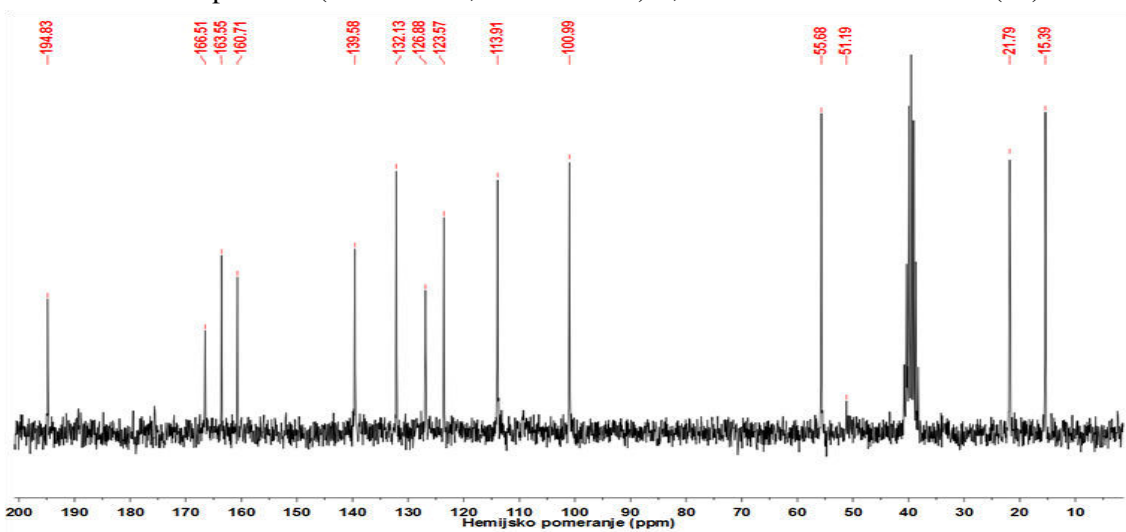
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-(2,4,6-tri-izopropilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (9)



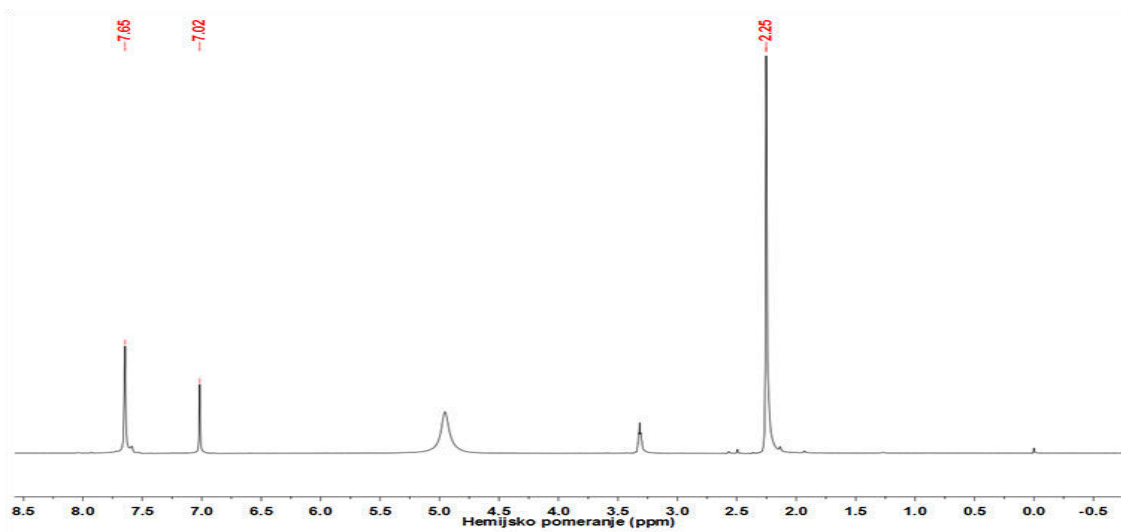
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-(2,4,6-tri-izopropilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (9)



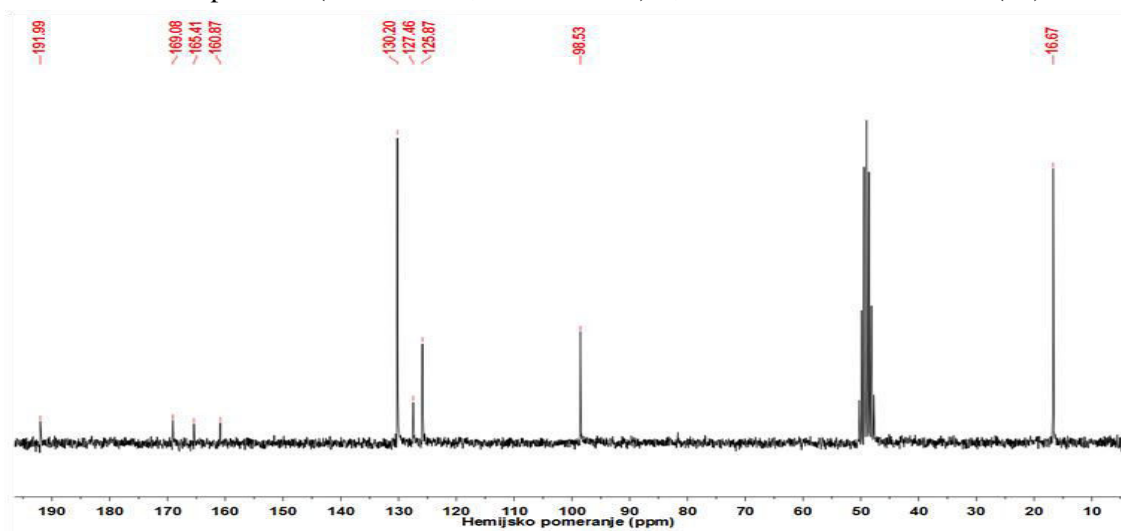
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-(4-metoksi-2,5-dimetilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (10)



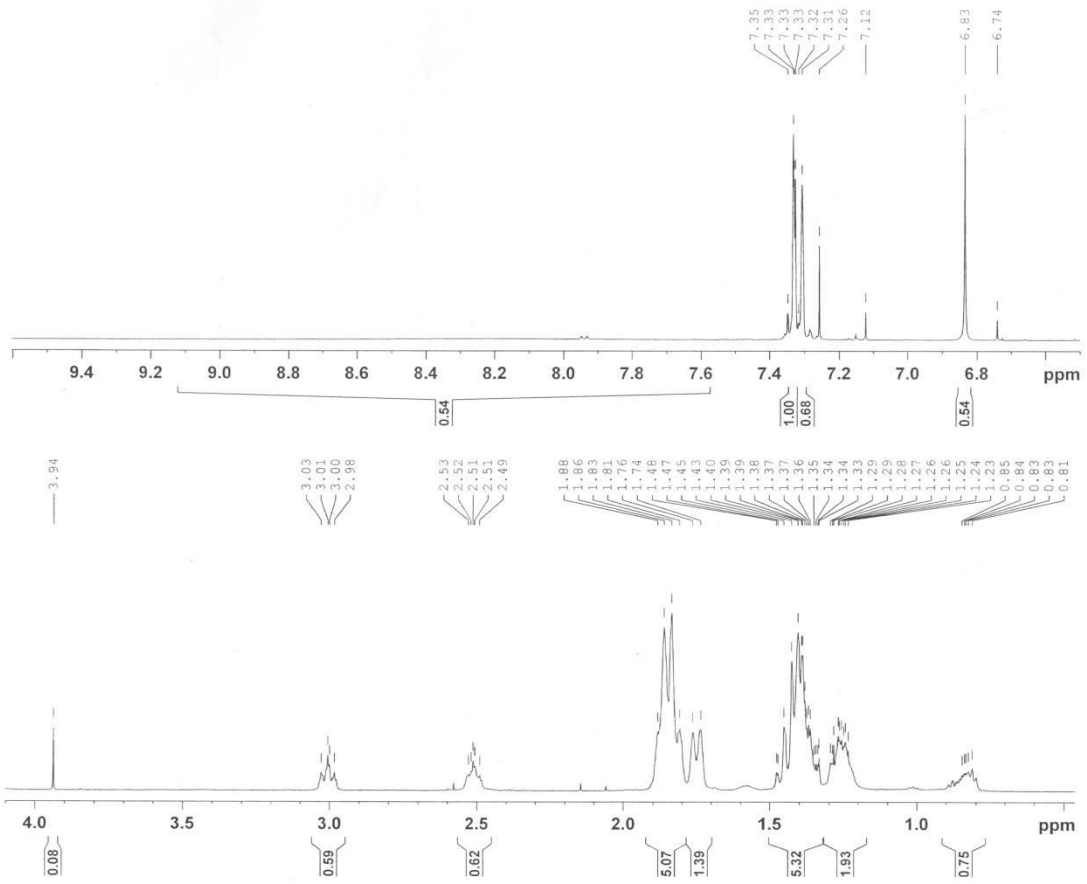
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-(4-metoksi-2,5-dimetilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (10)



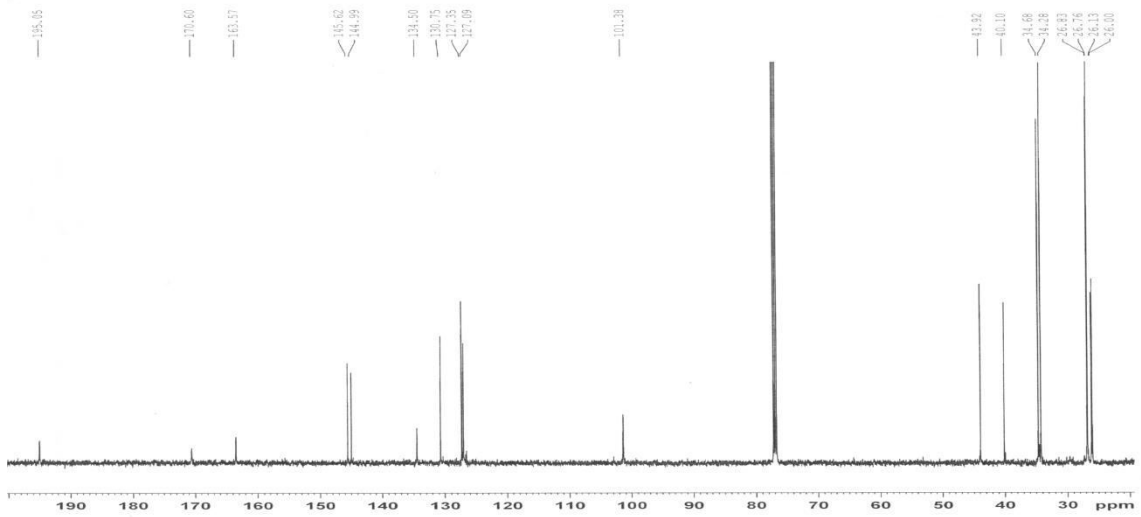
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-(4-hidroksi-3,5-dimetilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (**11**)



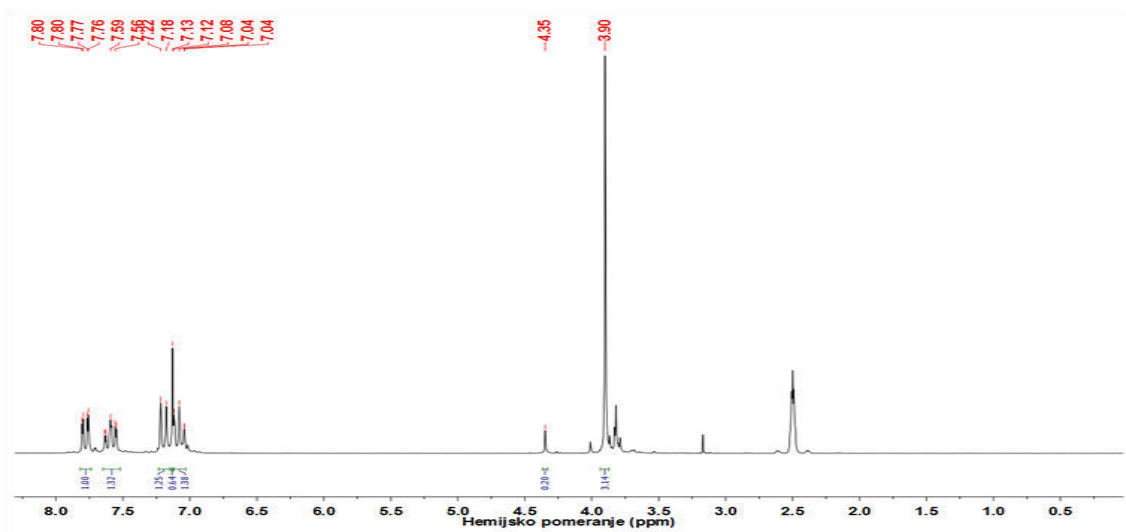
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-(4-hidroksi-3,5-dimetilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (**11**)



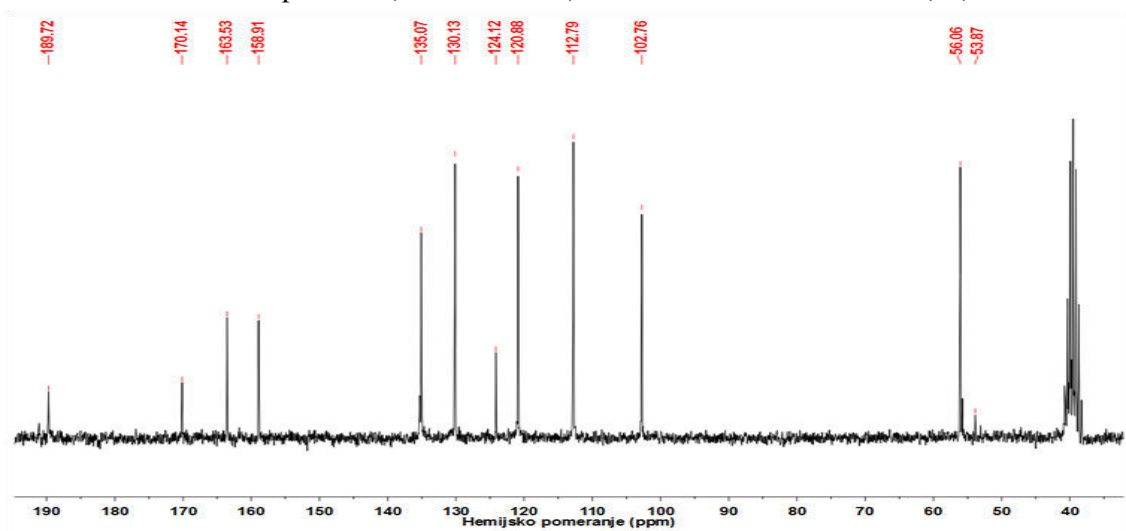
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-(2,5-di-cikloheksilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (**12**)



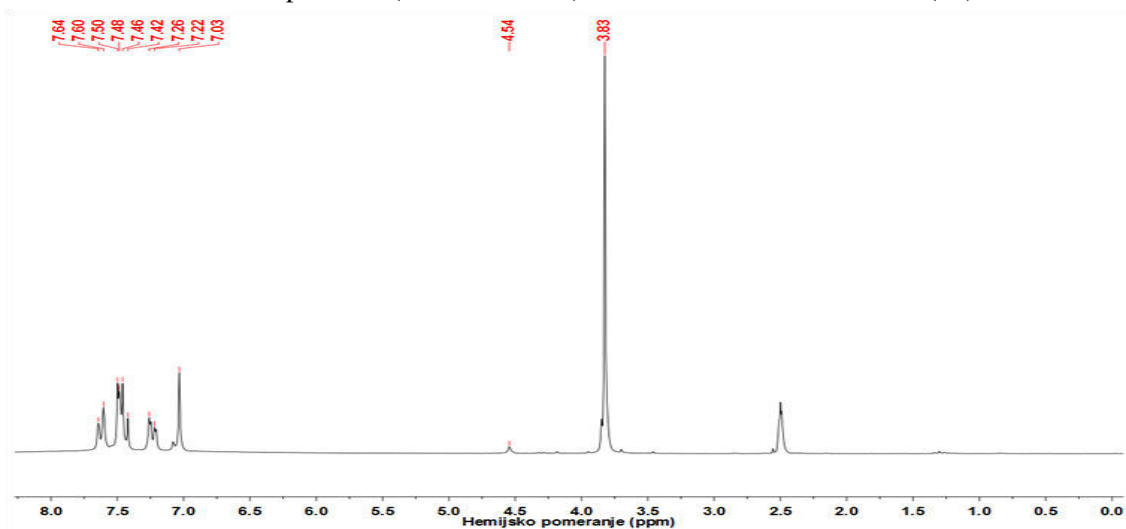
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-(2,5-di-cikloheksilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (**12**)



<sup>1</sup>H NMR spektr 4-(2-metoksifenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (**13**)

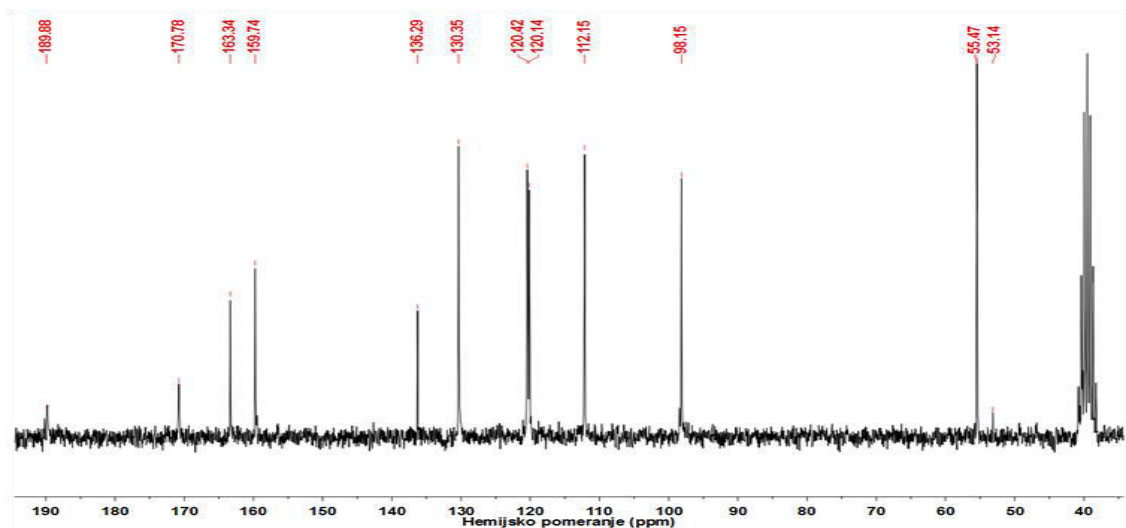


<sup>13</sup>C NMR spektr 4-(2-metoksifenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (**13**)

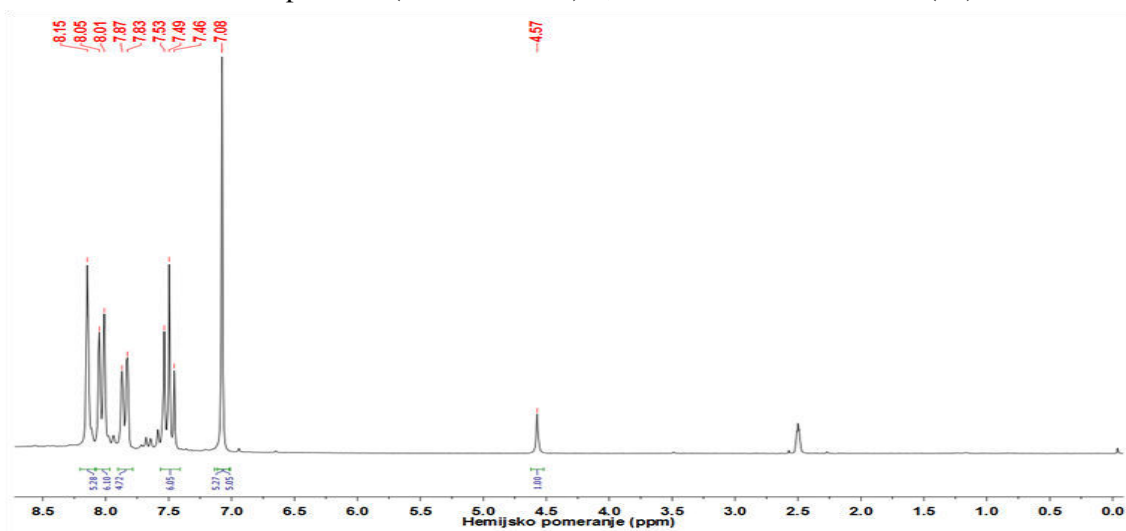


<sup>1</sup>H NMR spektr 4-(3-metoksifenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (**14**)

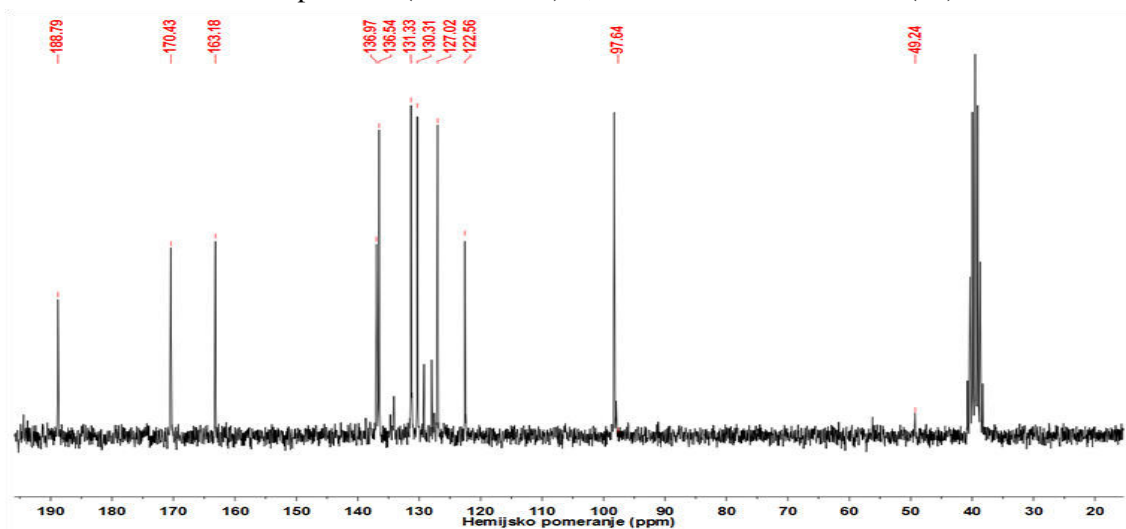




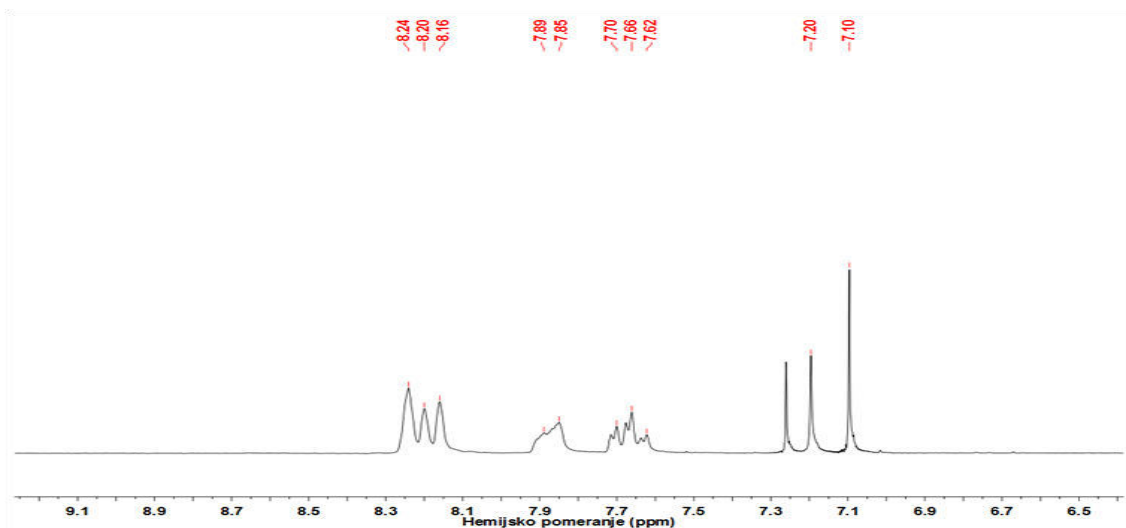
<sup>13</sup>C NMR spektar 4-(3-metoksifenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (14)



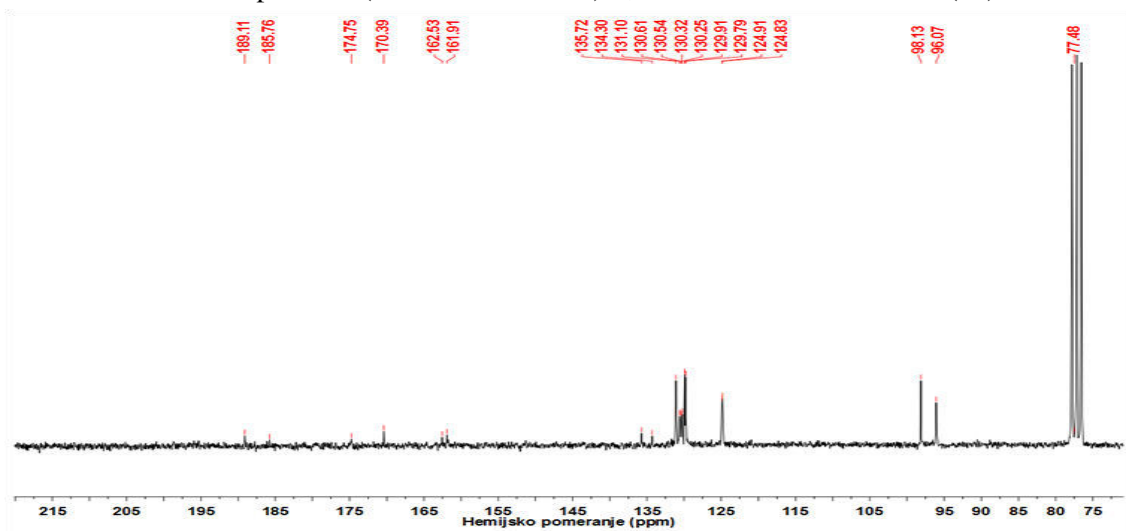
<sup>1</sup>H NMR spektar 4-(3-bromfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (15)



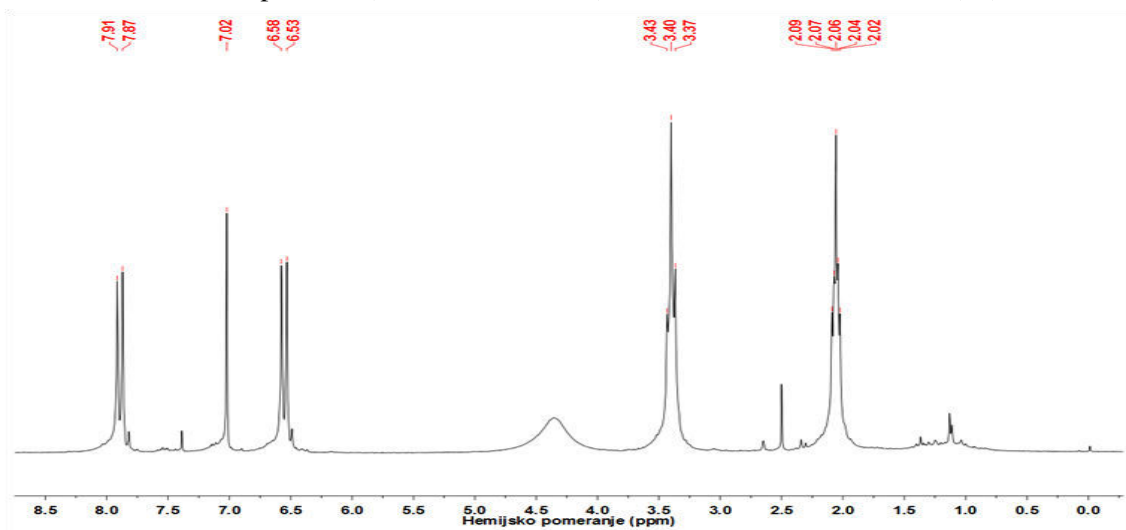
<sup>13</sup>C NMR spektar 4-(3-bromfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (15)



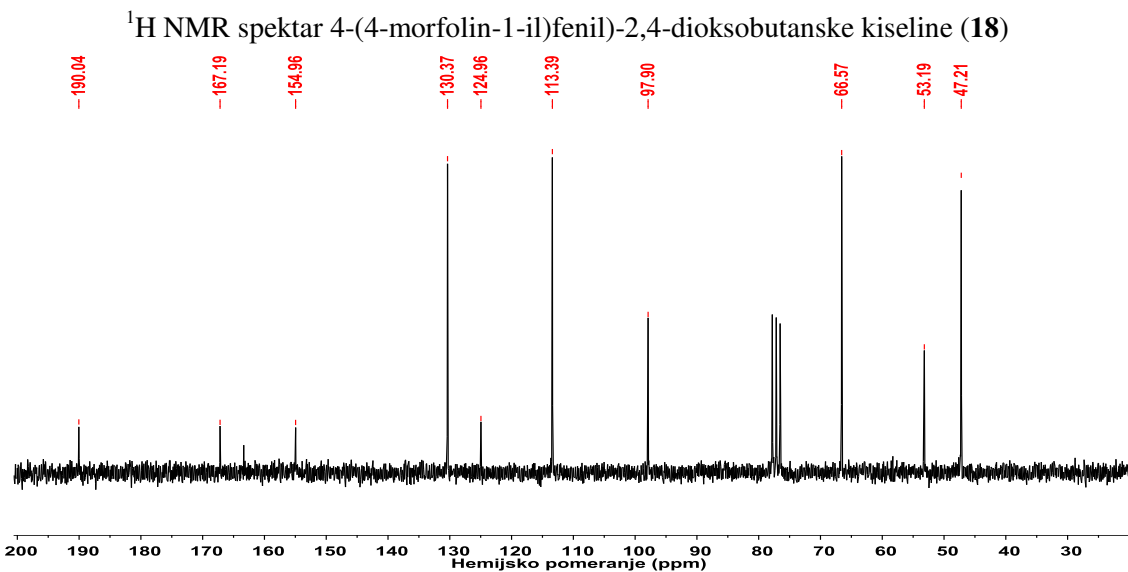
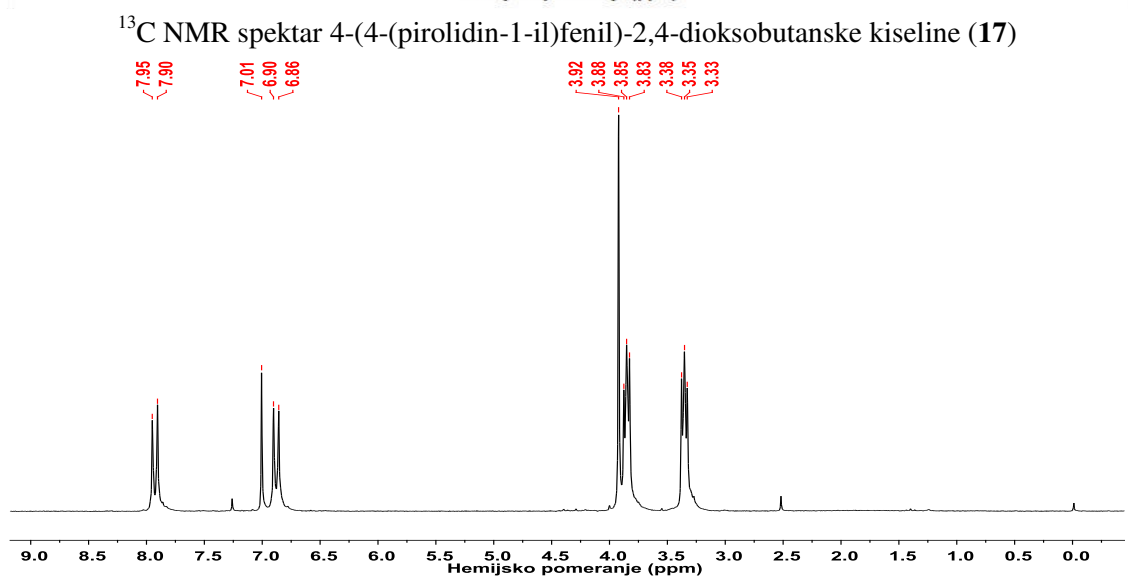
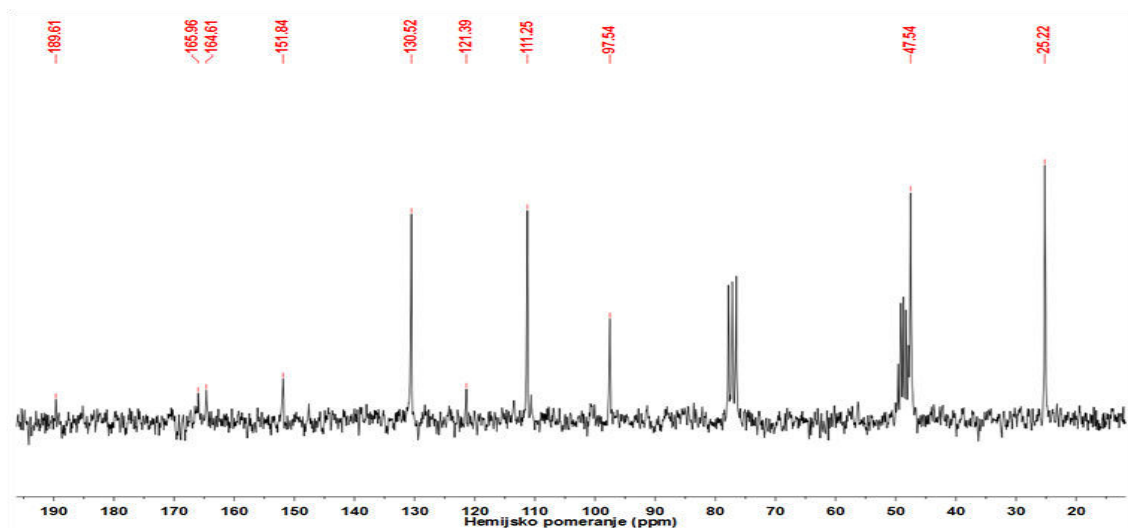
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-(3-trifluormetilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (**16**)



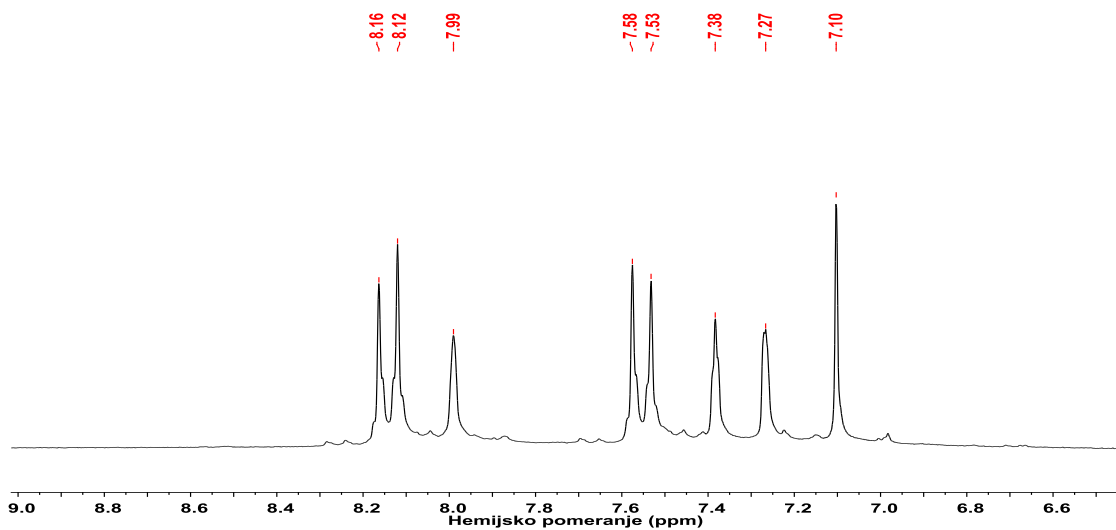
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-(3-trifluormetilfenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (**16**)



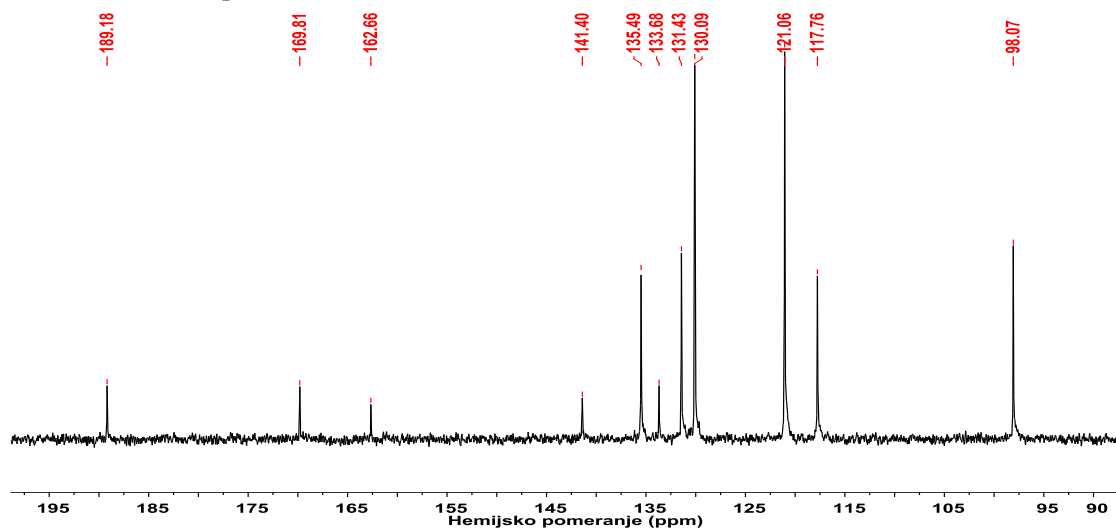
$^1\text{H}$  NMR spektar 4-(4-(pirolidin-1-il)fenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (**17**)



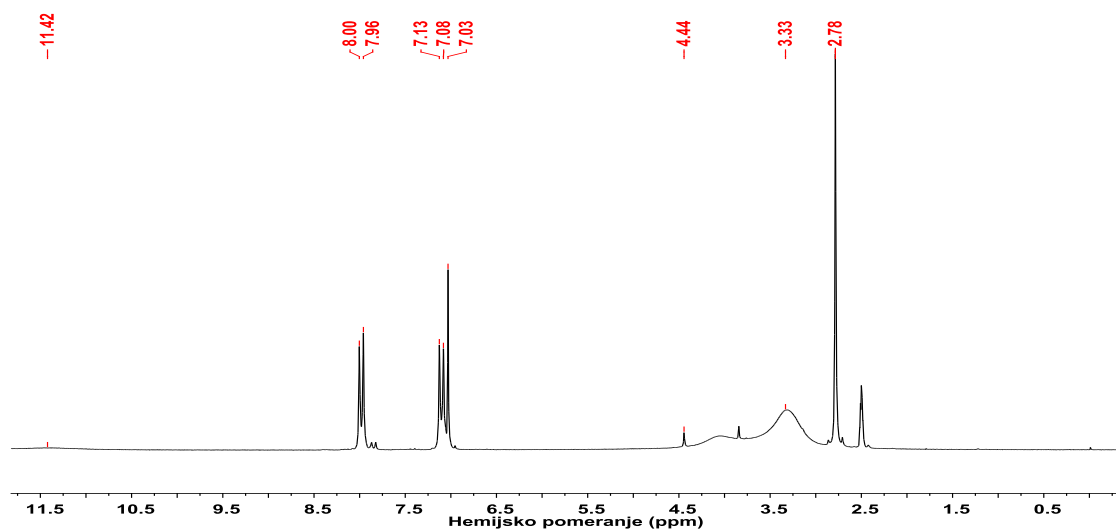
$^1\text{H}$  NMR spektr 4-(4-(morfolin-1-il)fenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (**18**)



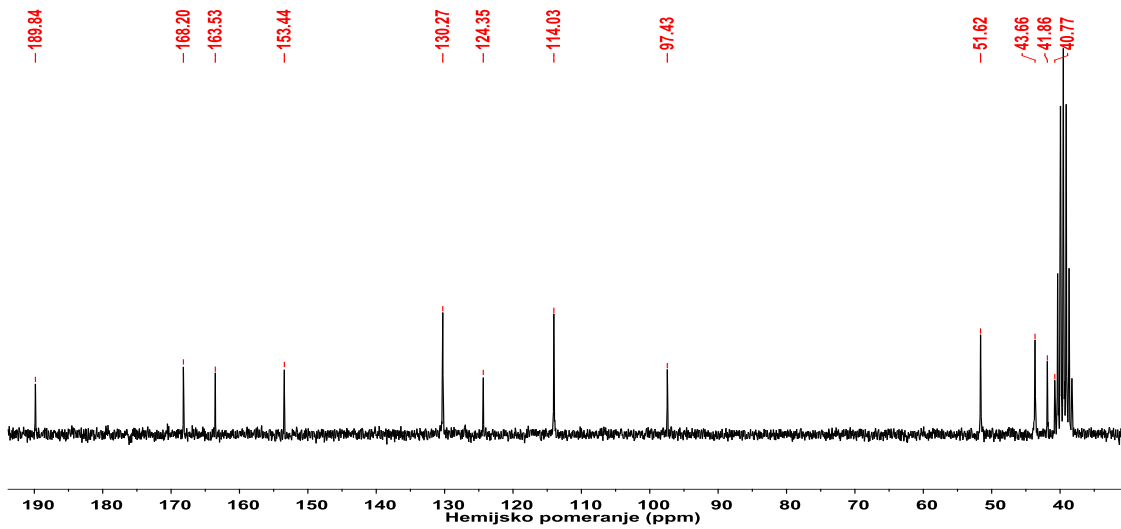
<sup>1</sup>H NMR spektar 4-(4-(1*H*-imidazol-1-il)fenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (**19**)



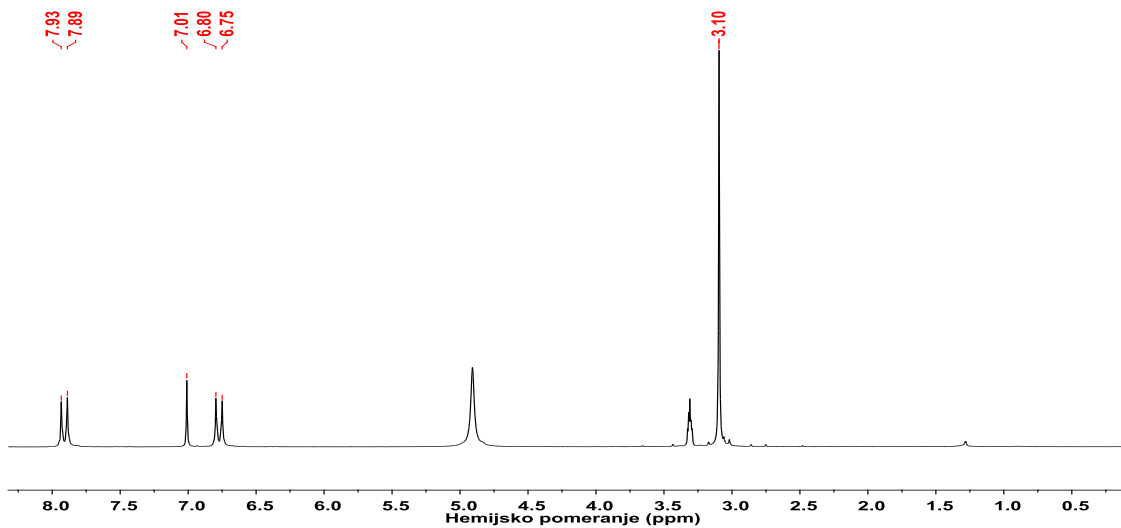
<sup>13</sup>C NMR spektar 4-(4-(1*H*-imidazol-1-il)fenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (**19**)



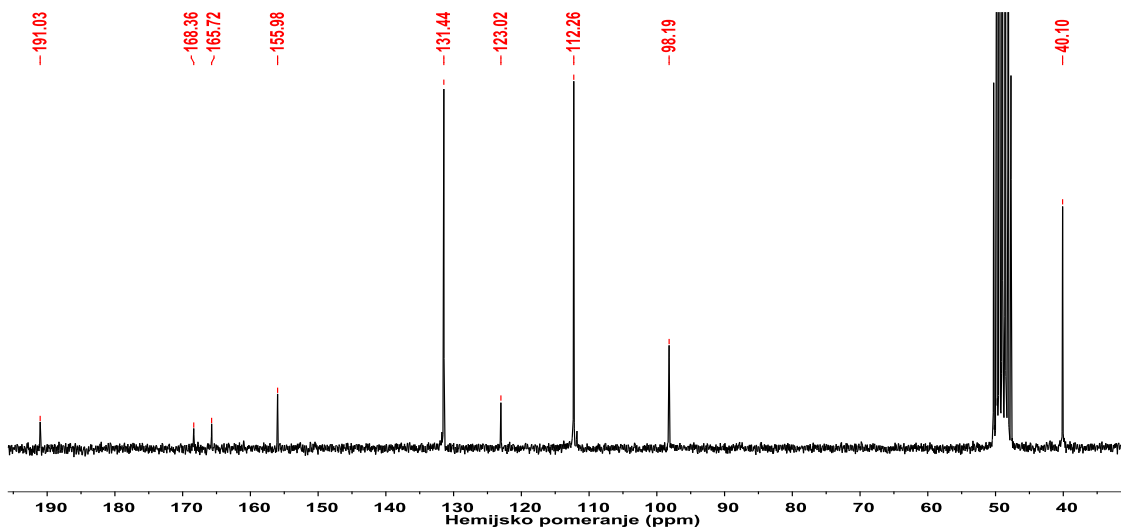
<sup>1</sup>H NMR spektar 4-(4-(1*H*-imidazol-1-il)fenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (**20**)



<sup>13</sup>C NMR spektar 4-(4-metilpiperazin-1-il)fenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (20)

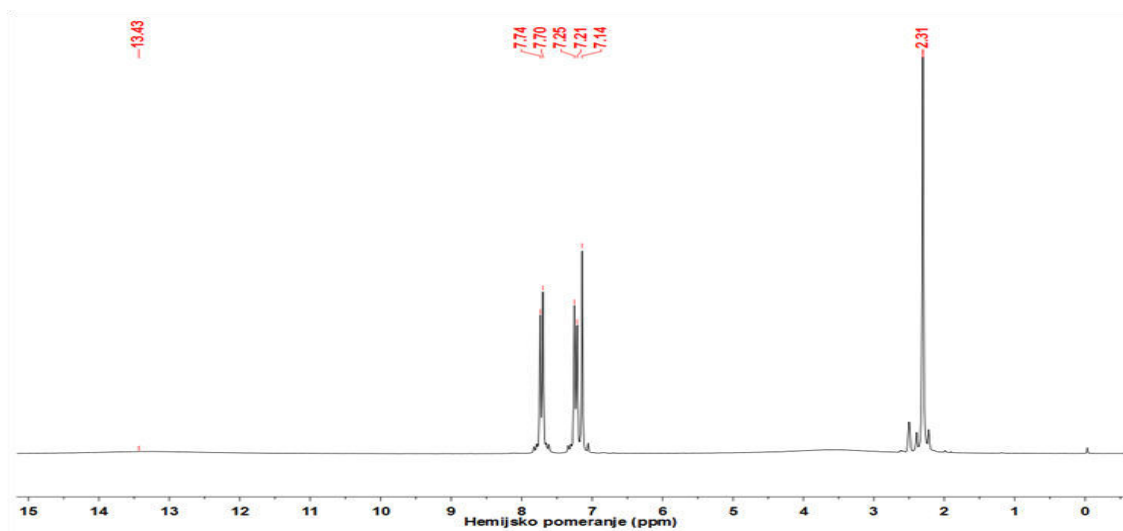


<sup>1</sup>H NMR spektar 4-(4-(dimetilamino)fenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (21)

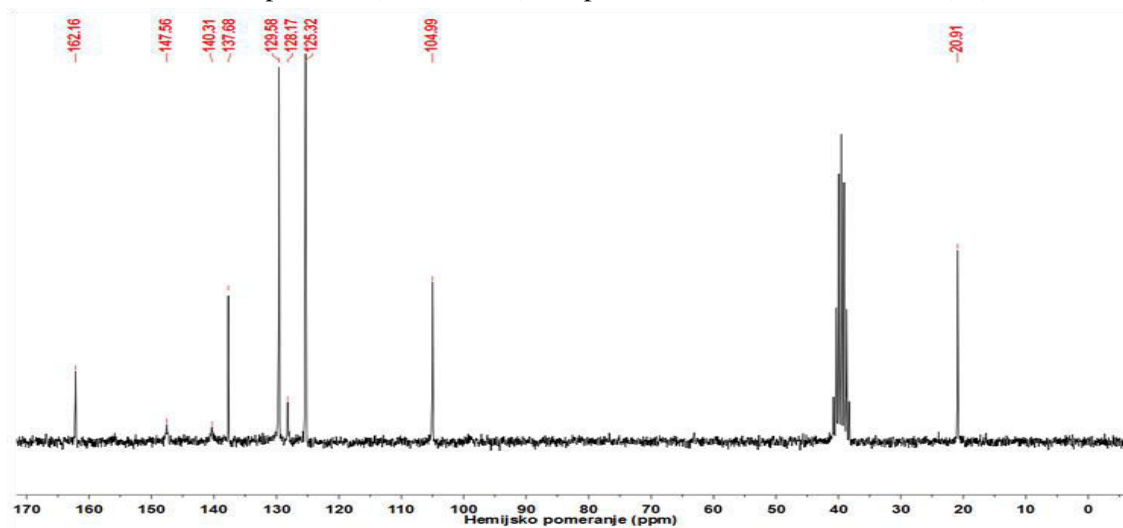


<sup>13</sup>C NMR spektar 4-(4-(dimetilamino)fenil)-2,4-dioksobutanske kiseline (21)

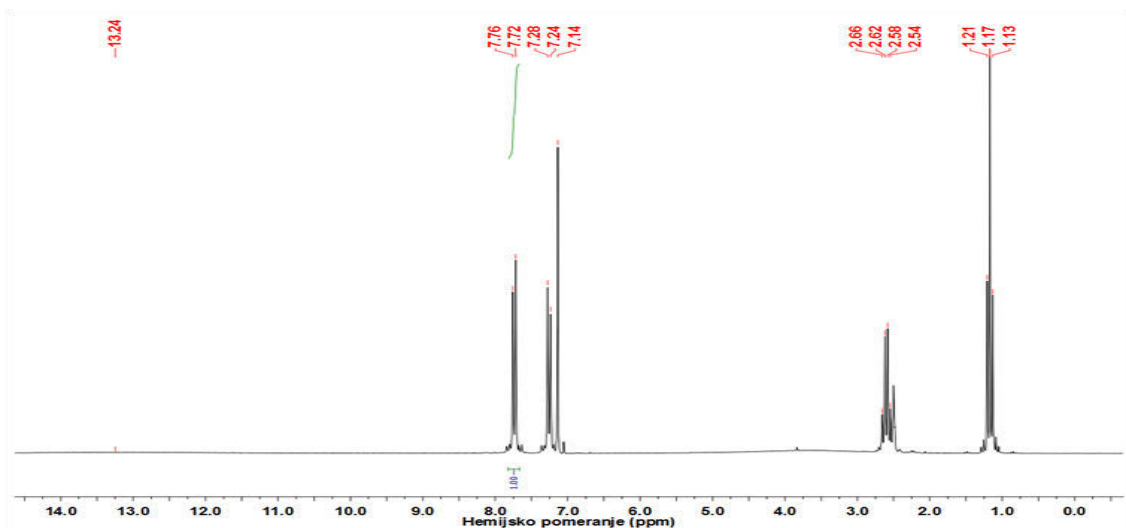
### Prilog 3. NMR spektri APK



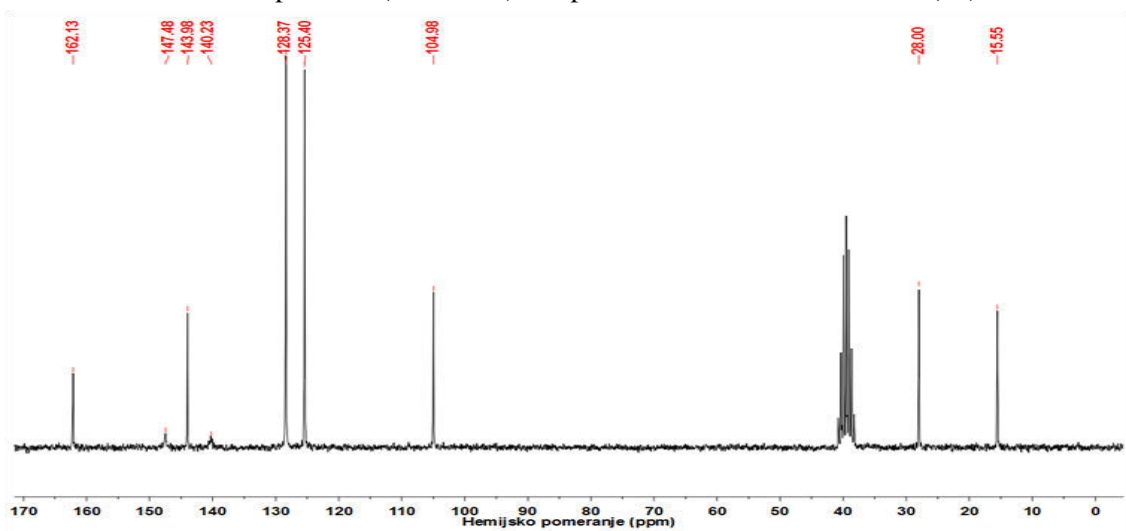
<sup>1</sup>H NMR spektar 5-(4-metilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (**25**)



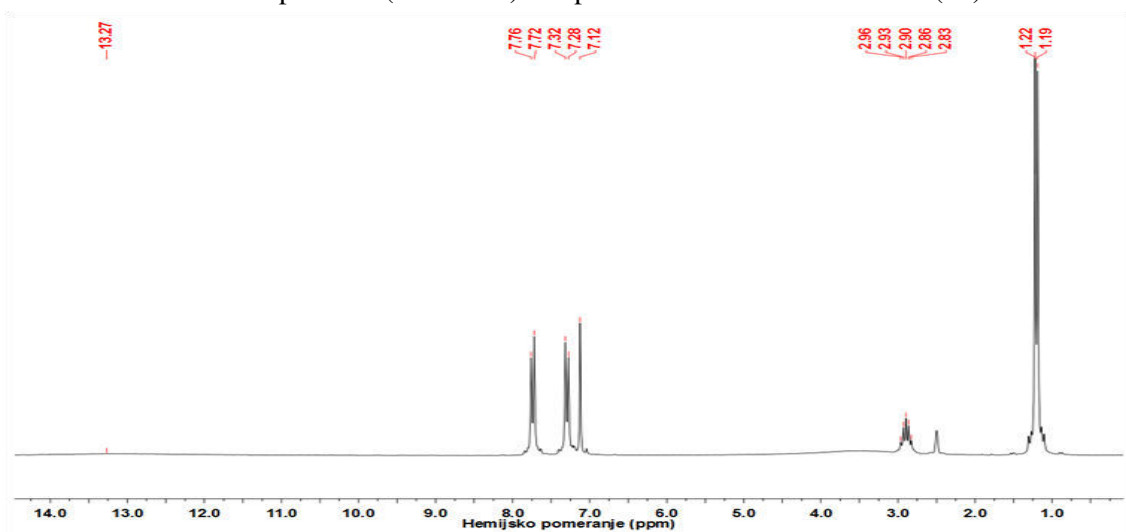
<sup>13</sup>C NMR spektar 5-(4-metilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (**25**)



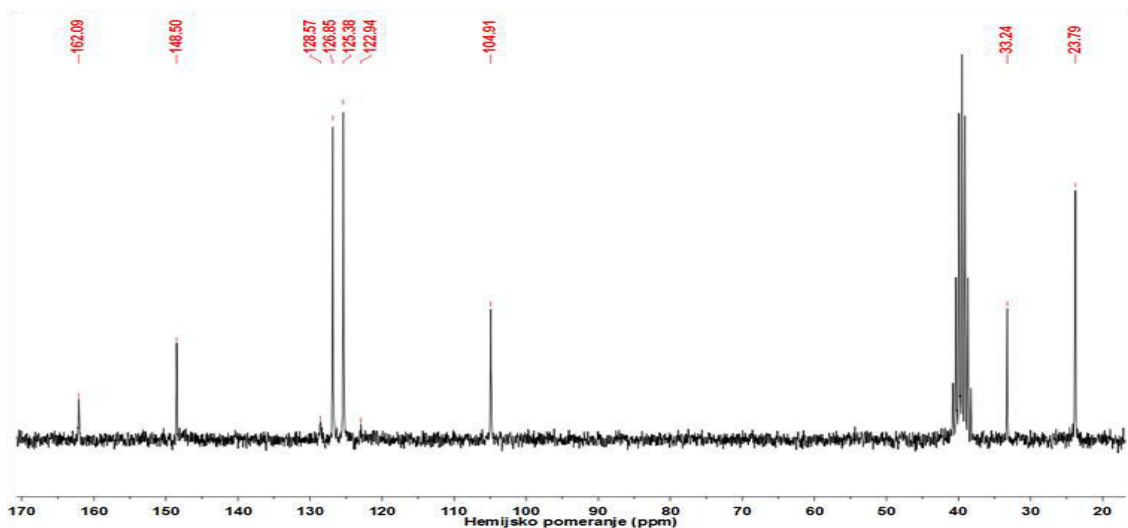
<sup>1</sup>H NMR spektar 5-(4-etilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (26)



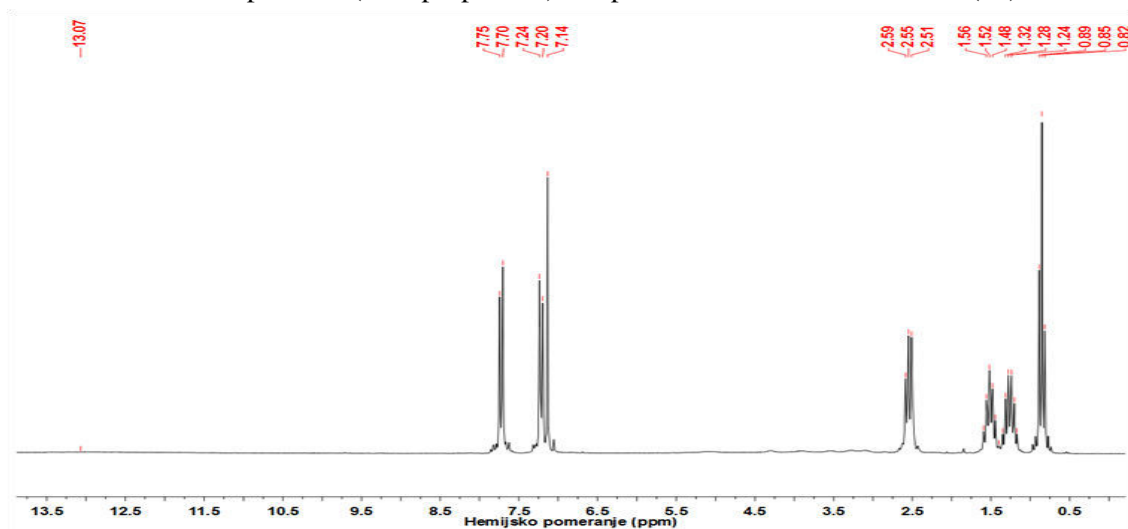
<sup>13</sup>C NMR spektar 5-(4-etilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (26)



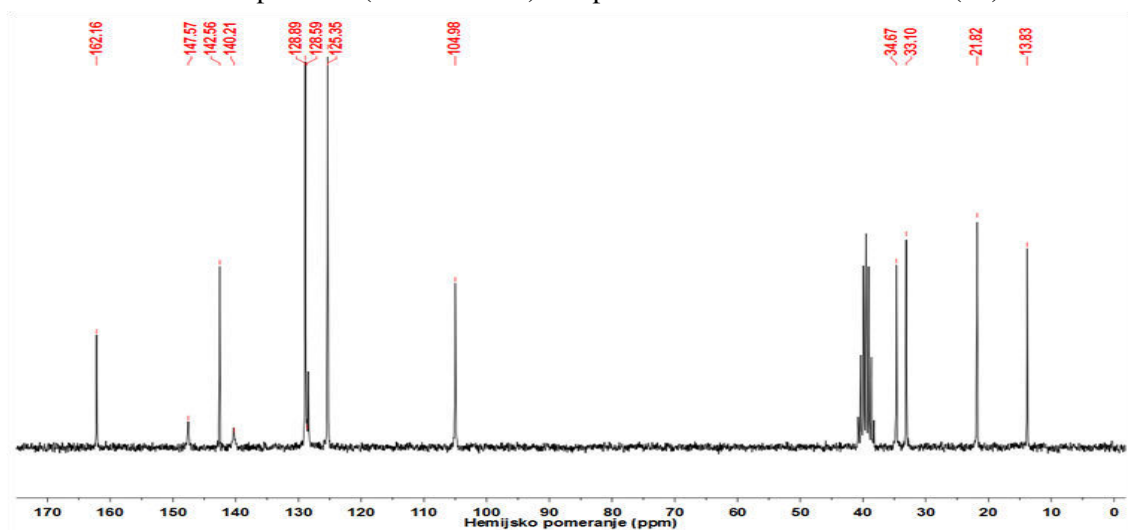
<sup>1</sup>H NMR spektar 5-(4-izopropilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (27)



$^{13}\text{C}$  NMR spektr 5-(4-izopropilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (**27**)

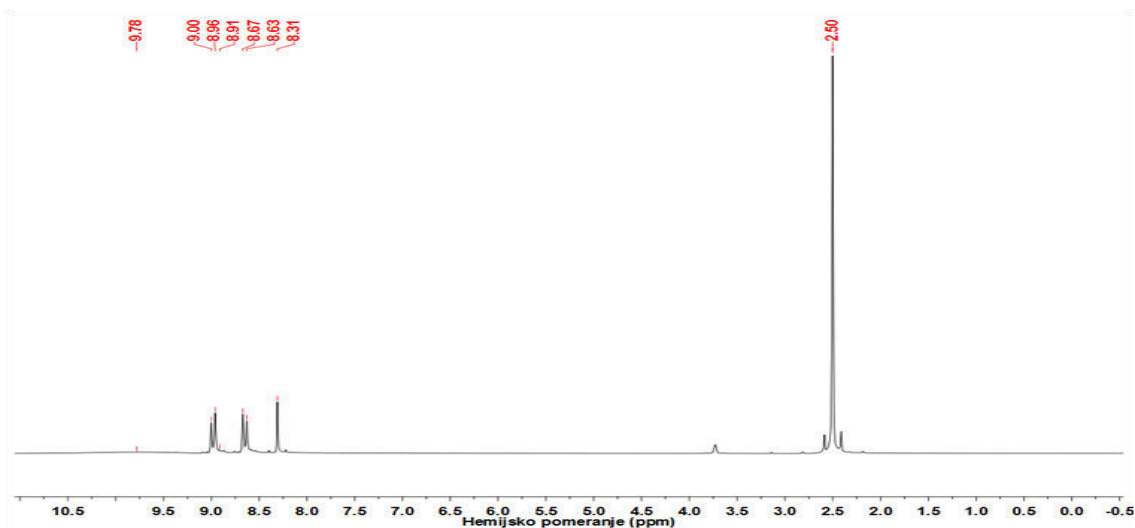


$^1\text{H}$  NMR spektr 5-(4-*n*-butilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (**28**)

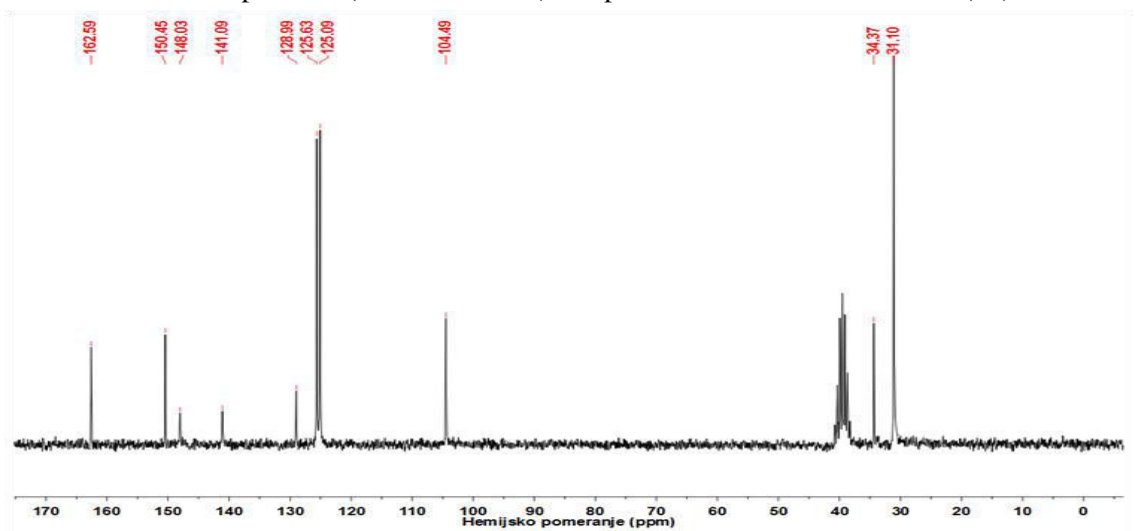


$^{13}\text{C}$  NMR spektr 5-(4-*n*-butilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (**28**)

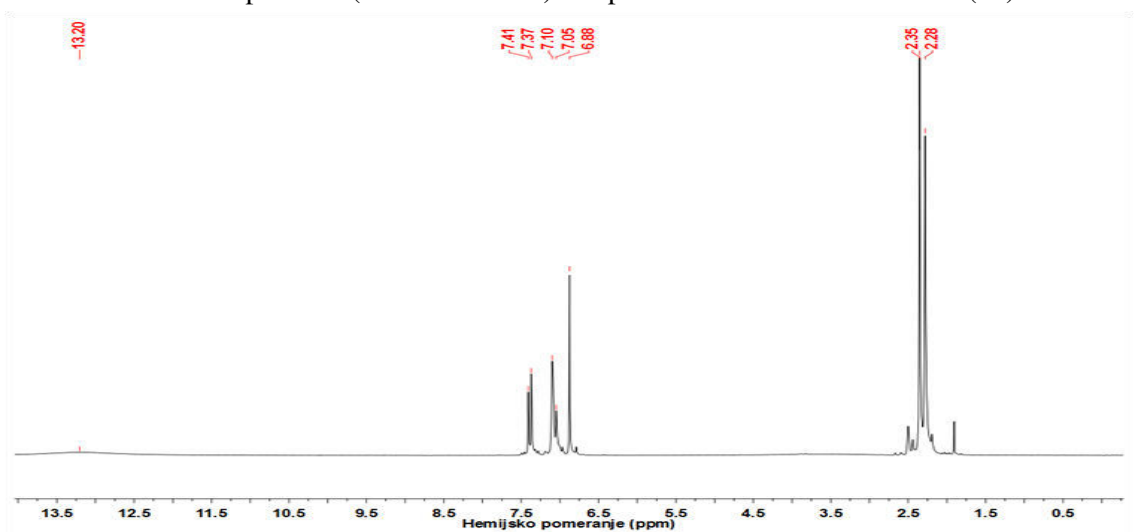




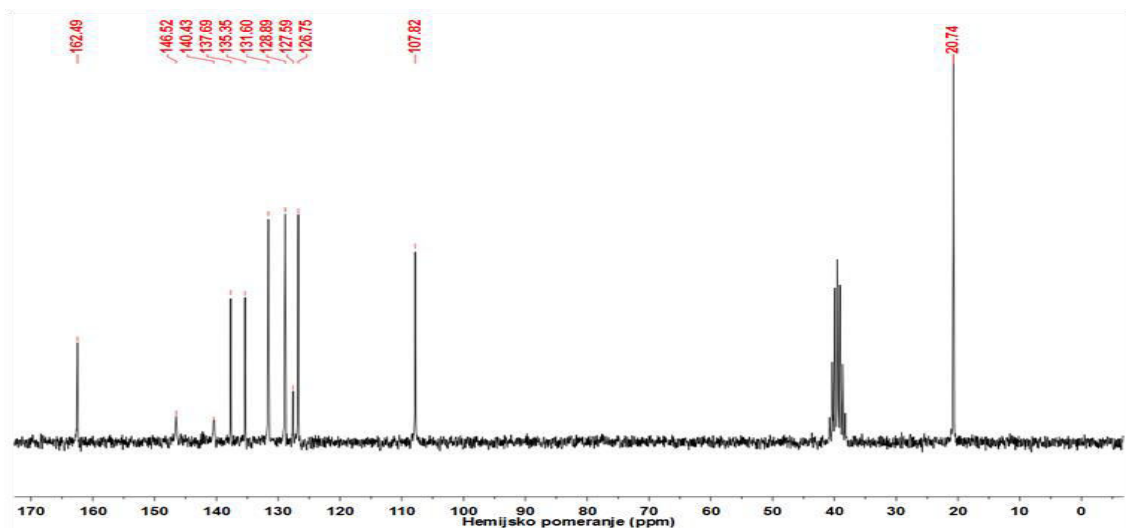
<sup>1</sup>H NMR spektar 5-(4-*tert*-butilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (**29**)



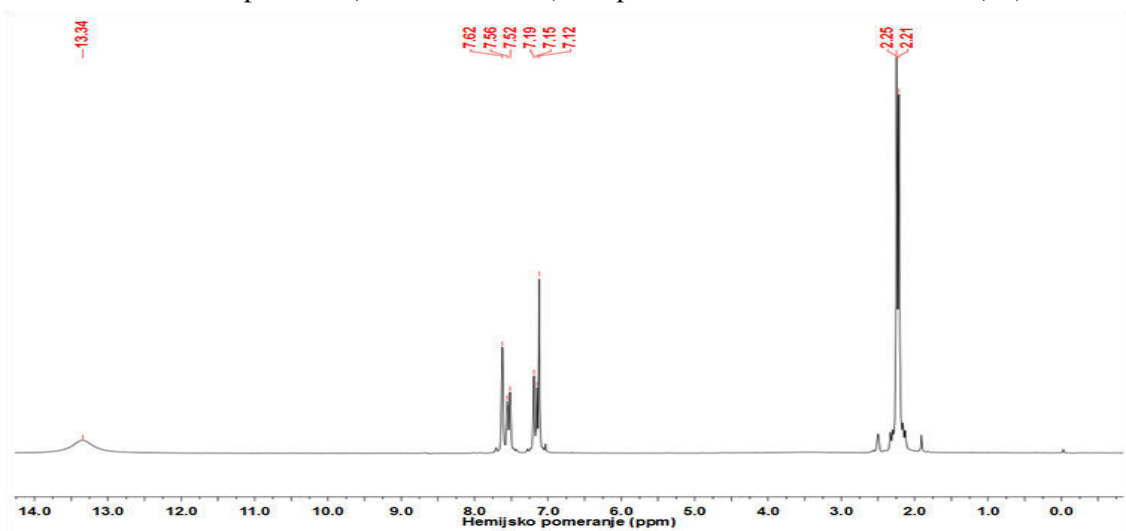
<sup>13</sup>C NMR spektar 5-(4-*tert*-butilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (**29**)



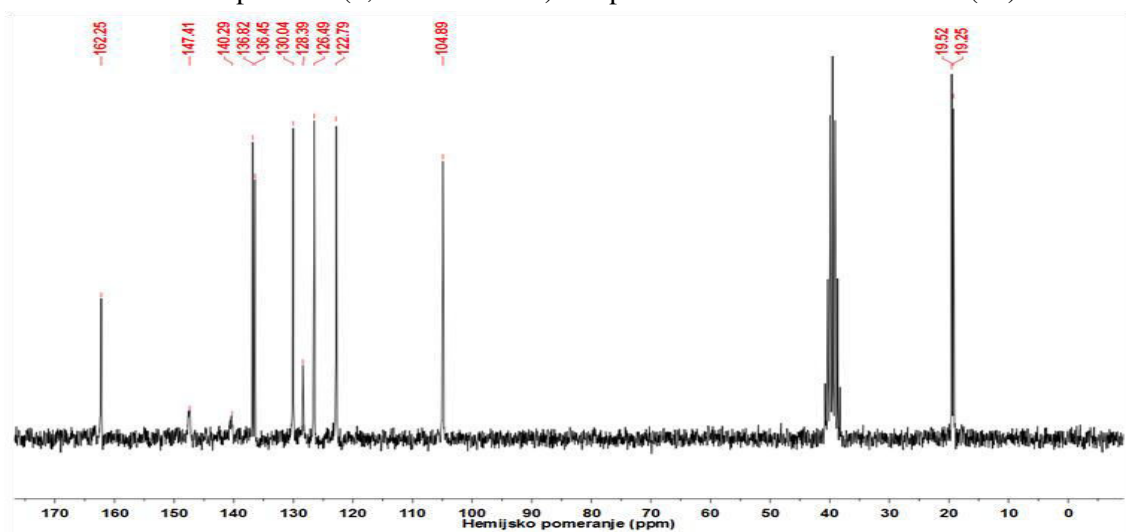
<sup>1</sup>H NMR spektar 5-(2,4-di-metilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (**30**)



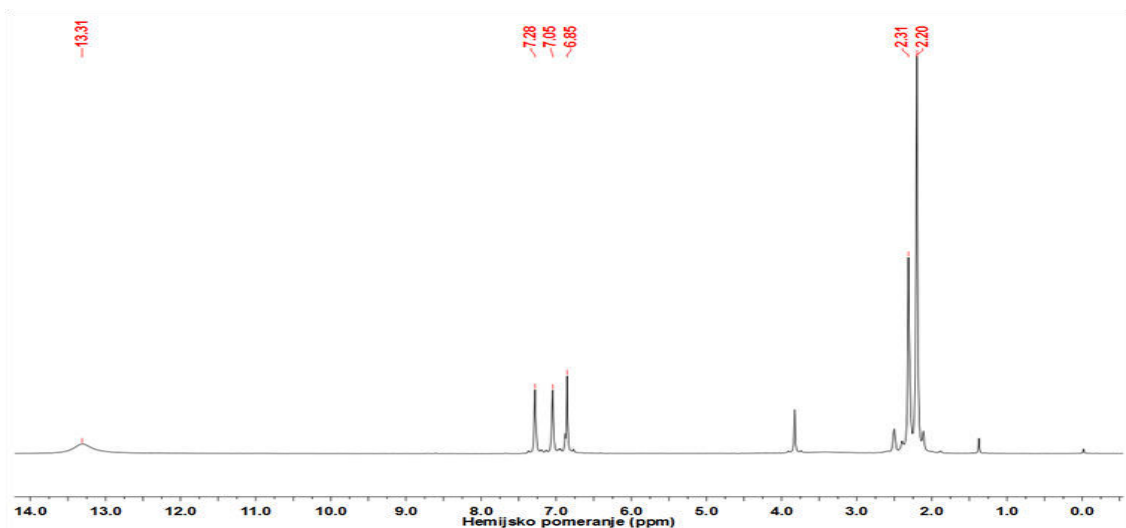
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 5-(2,4-di-metilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (30)



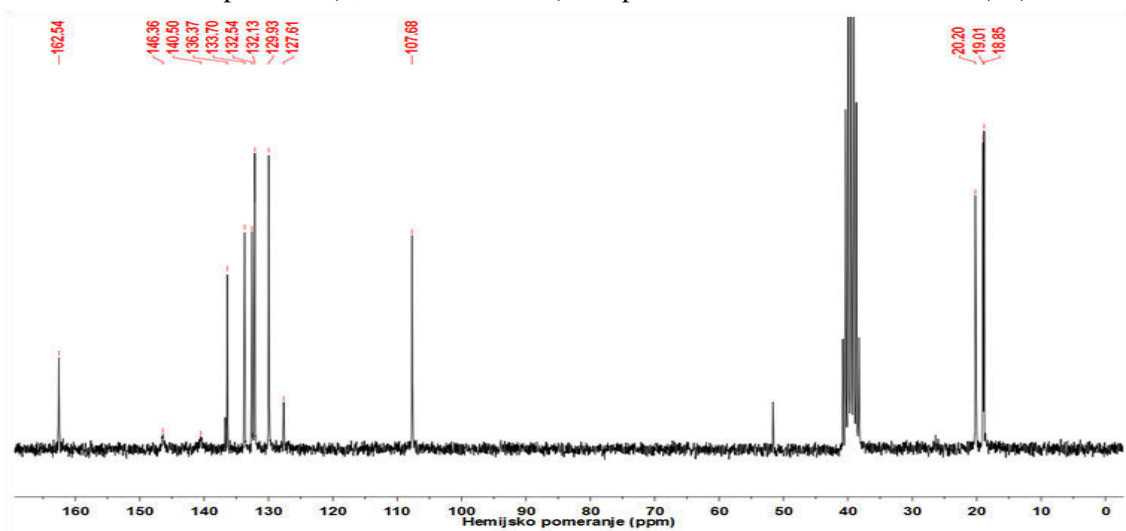
$^1\text{H}$  NMR spektar 5-(3,4-di-metilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (31)



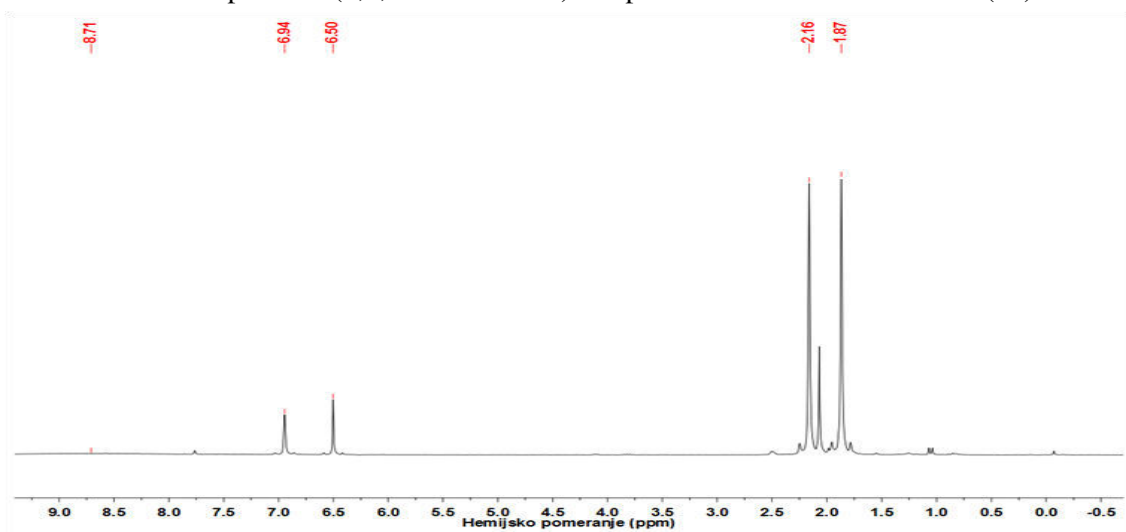
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 5-(3,4-di-metilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (31)



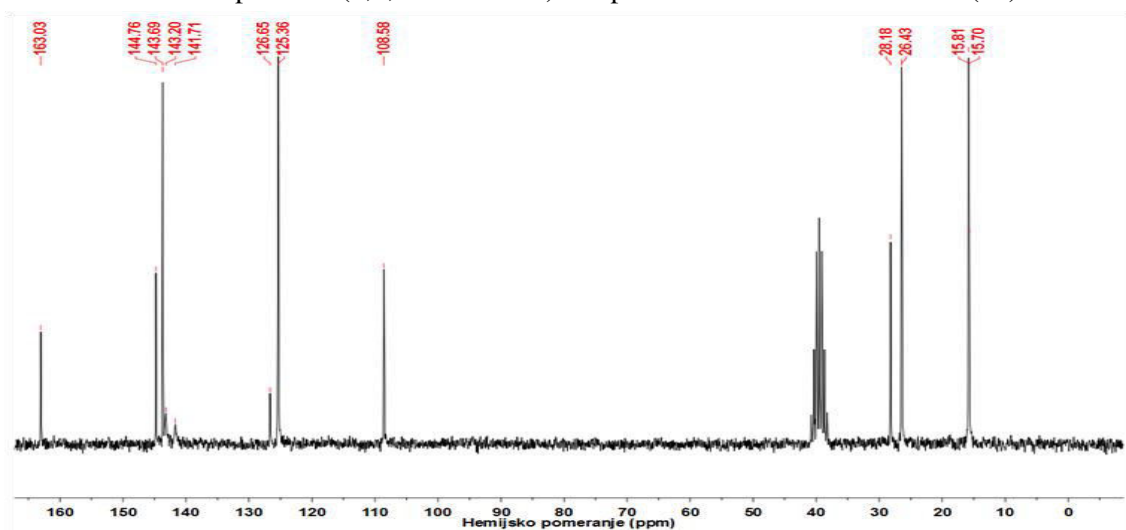
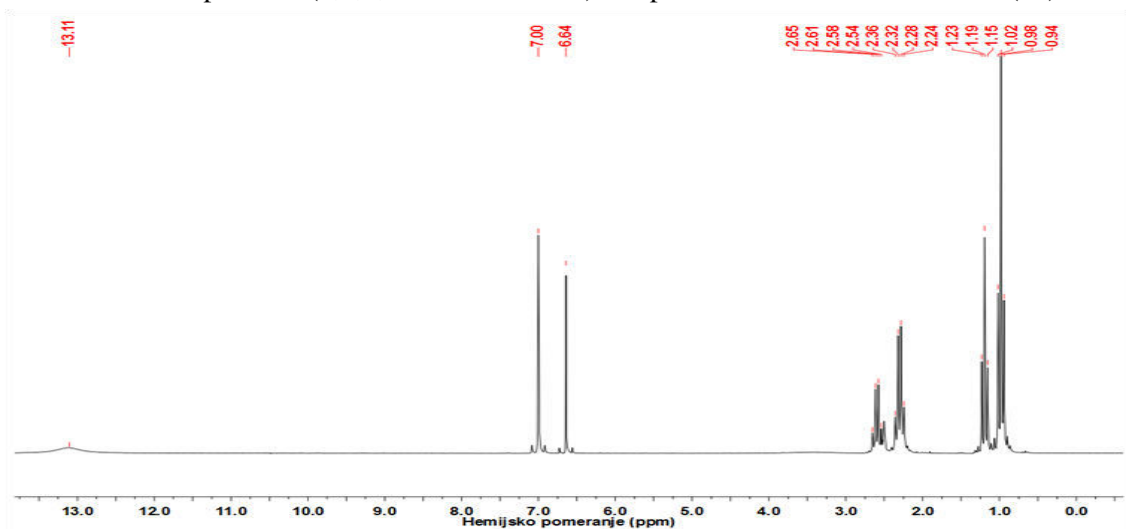
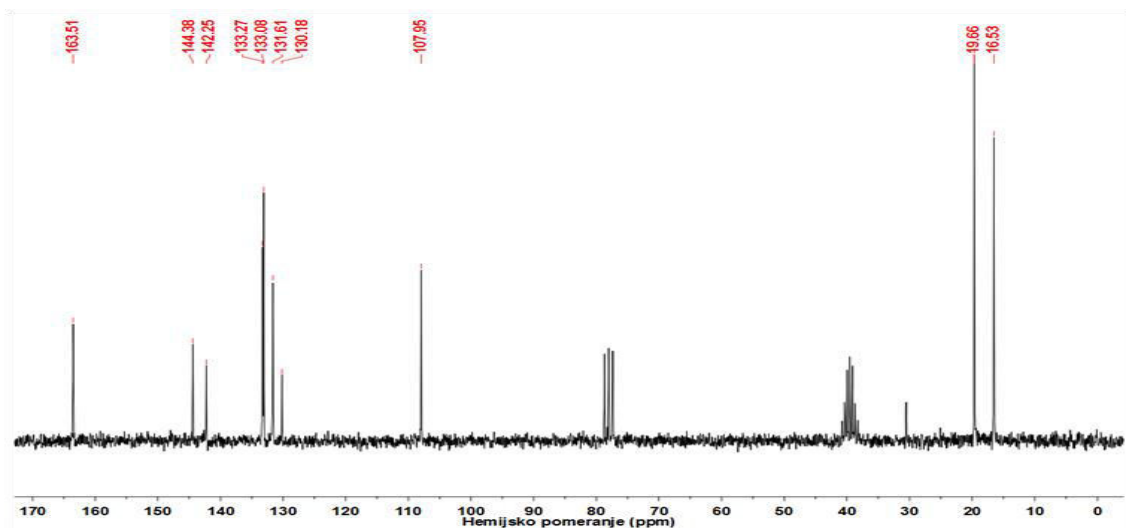
<sup>1</sup>H NMR spektar 5-(2,4,5-tri-metilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (32)

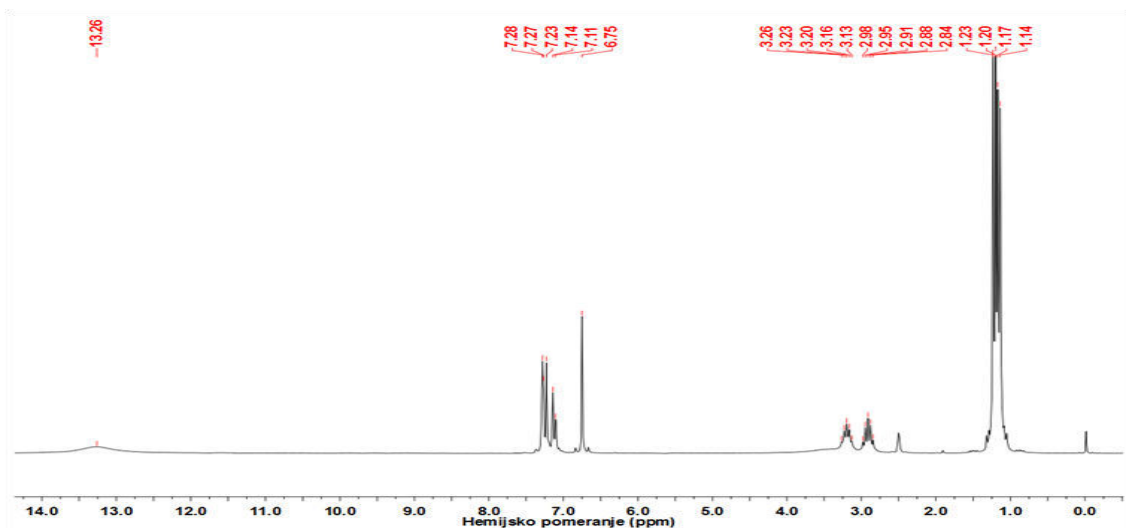


<sup>13</sup>C NMR spektar 5-(2,4,5-tri-metilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (32)

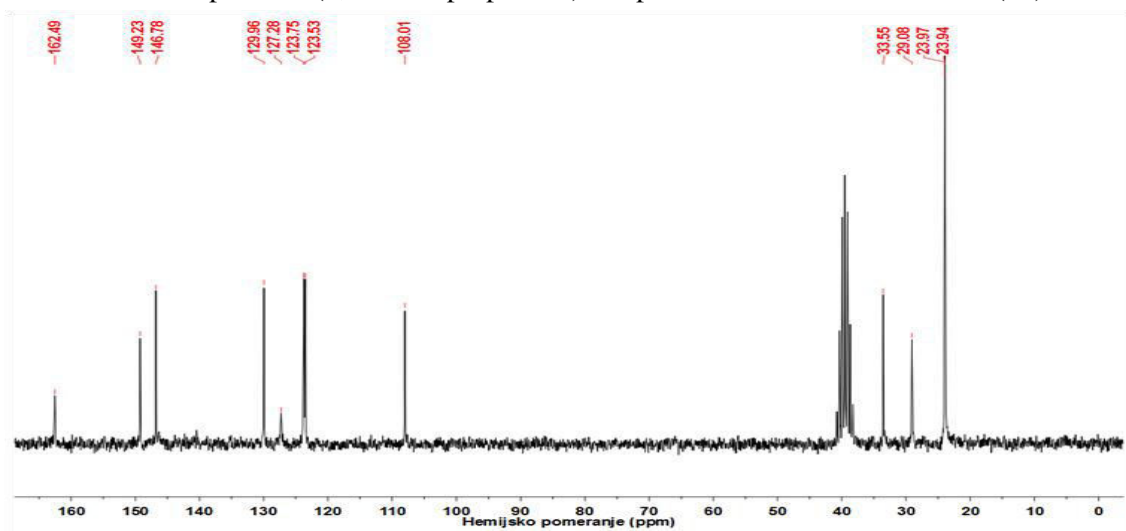


<sup>1</sup>H NMR spektar 5-(2,3,5,6-tetra-metilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (33)

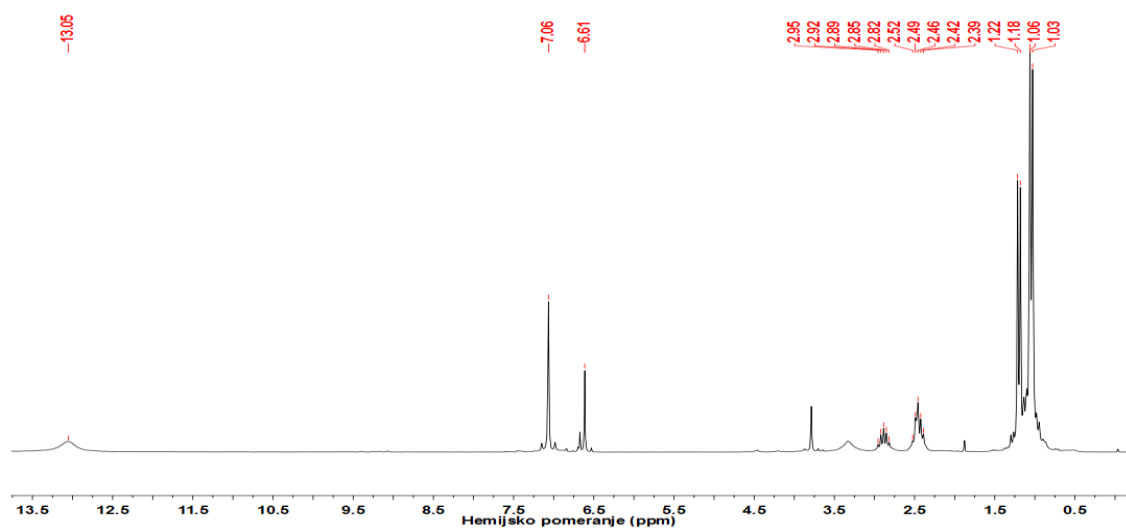




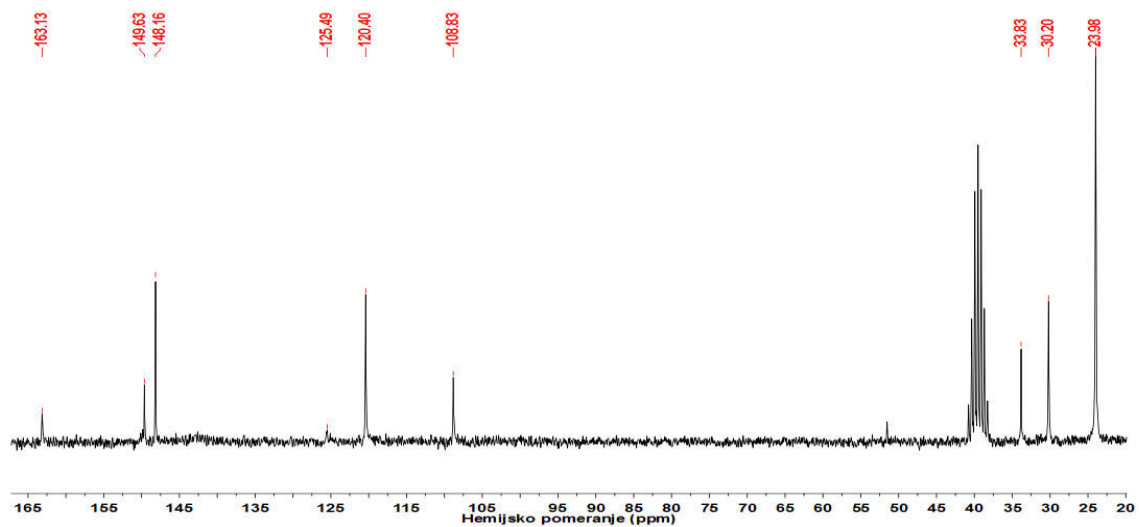
$^1\text{H}$  NMR spektar 5-(2,4-di-*izo*-propilfenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (**35**)



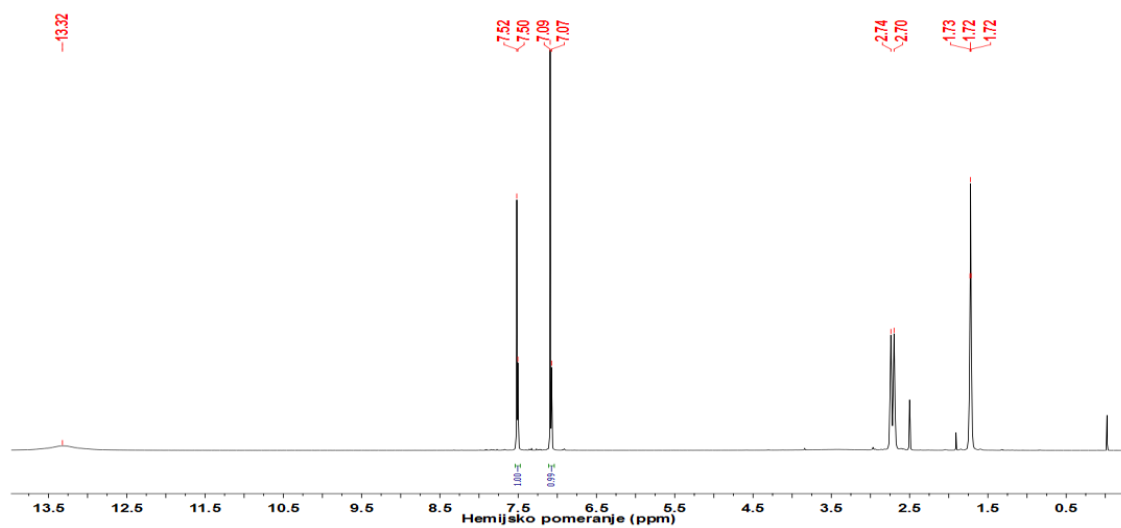
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 5-(2,4-di-*izo*-propilfenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (**35**)



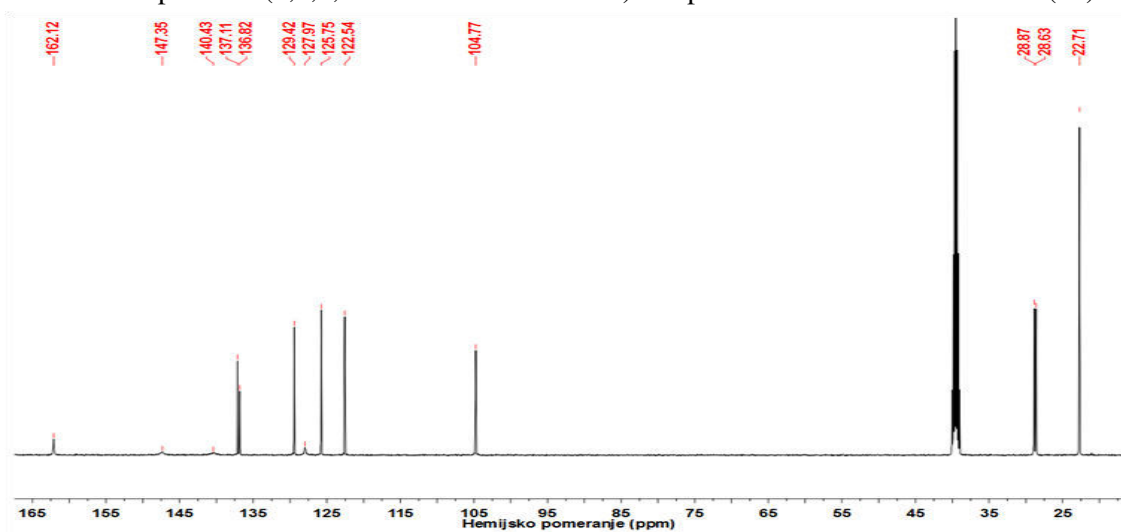
$^1\text{H}$  NMR spektar 5-(2,4,6-tri-*izo*-propilfenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (**36**)



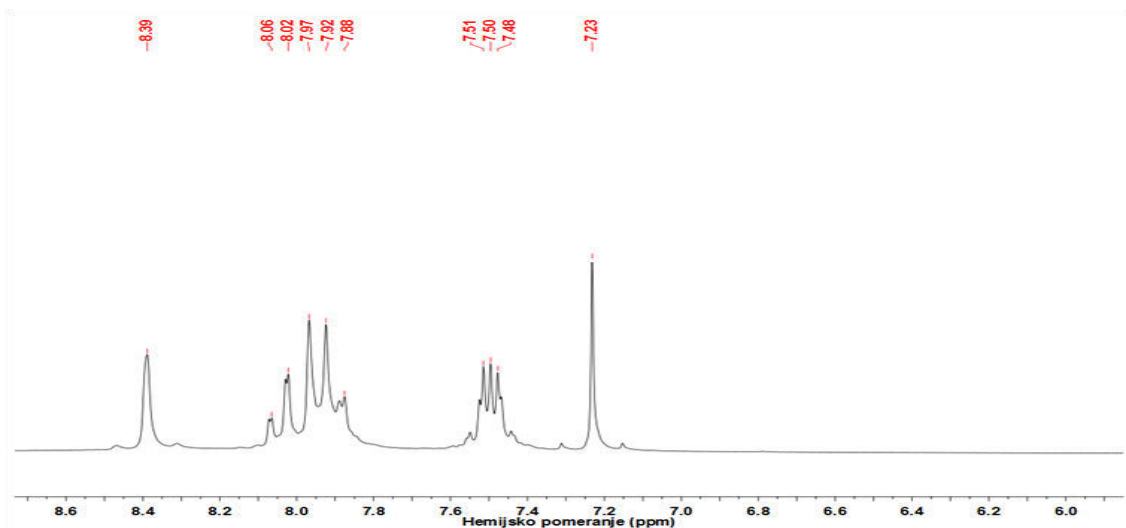
<sup>13</sup>C NMR spektar 5-(2,4,6-tri-*izo*-propilfenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (36)



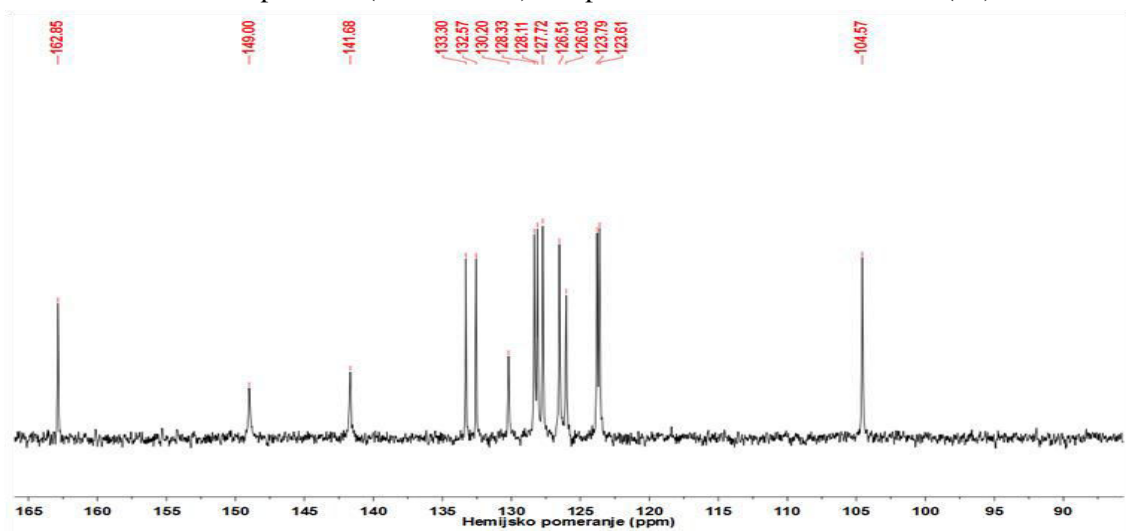
<sup>1</sup>H NMR spektar 5-(5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-il)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (37)



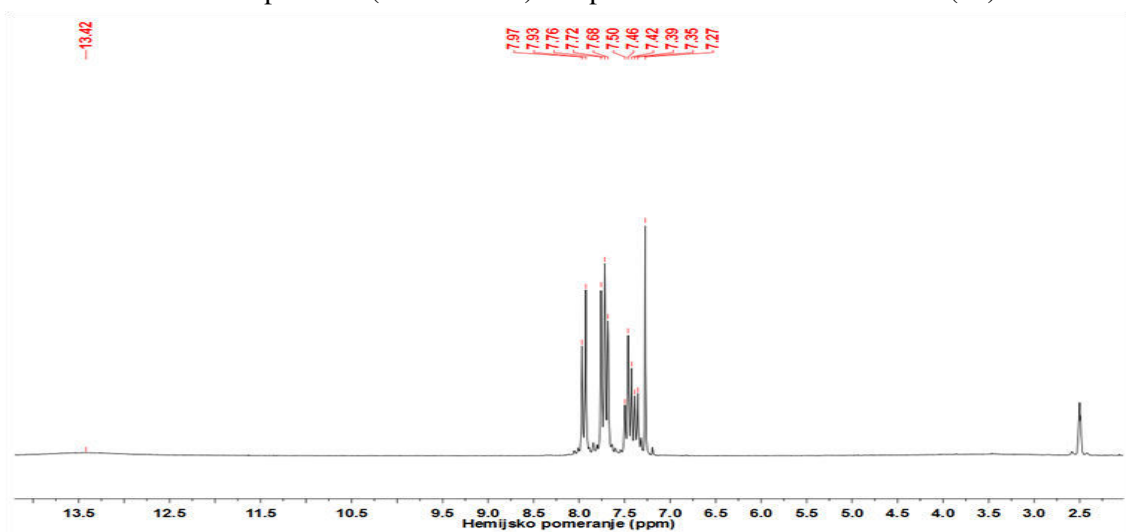
<sup>13</sup>C NMR spektar 5-(5,6,7,8-tetrahidronaftalen-2-il)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (37)



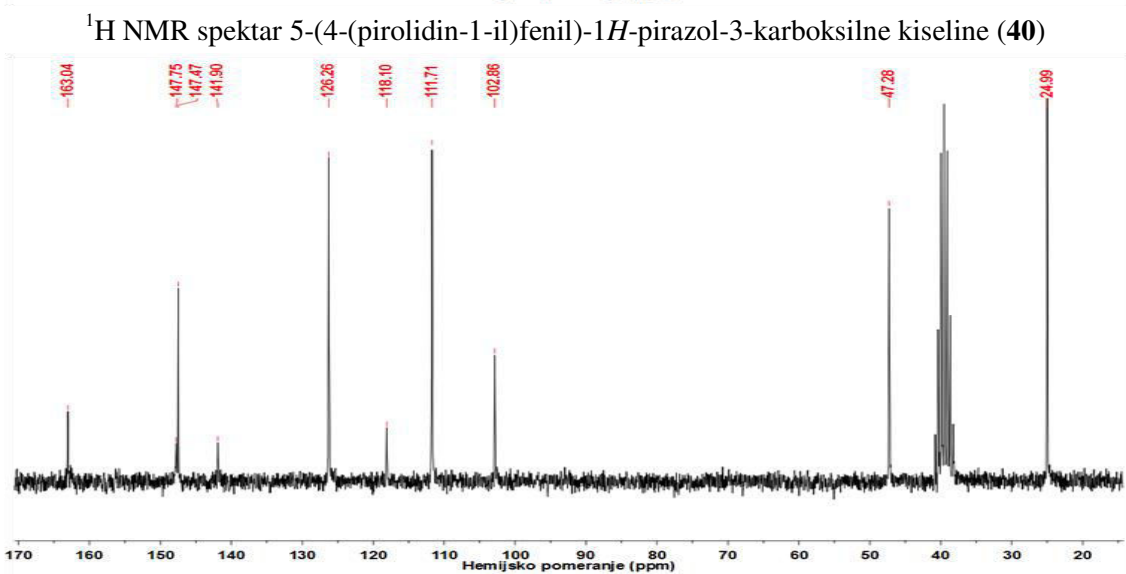
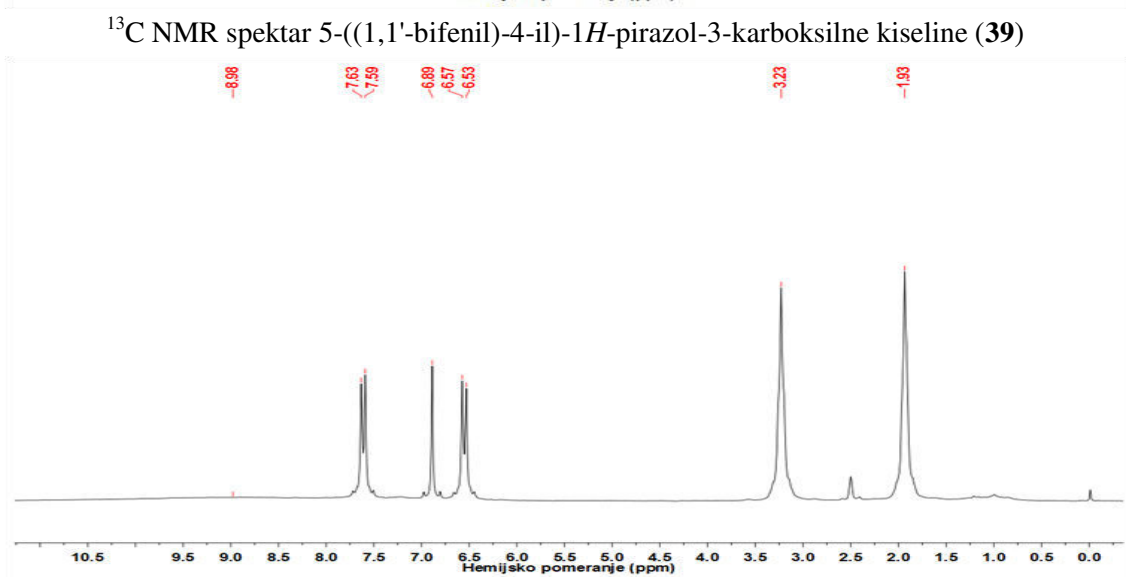
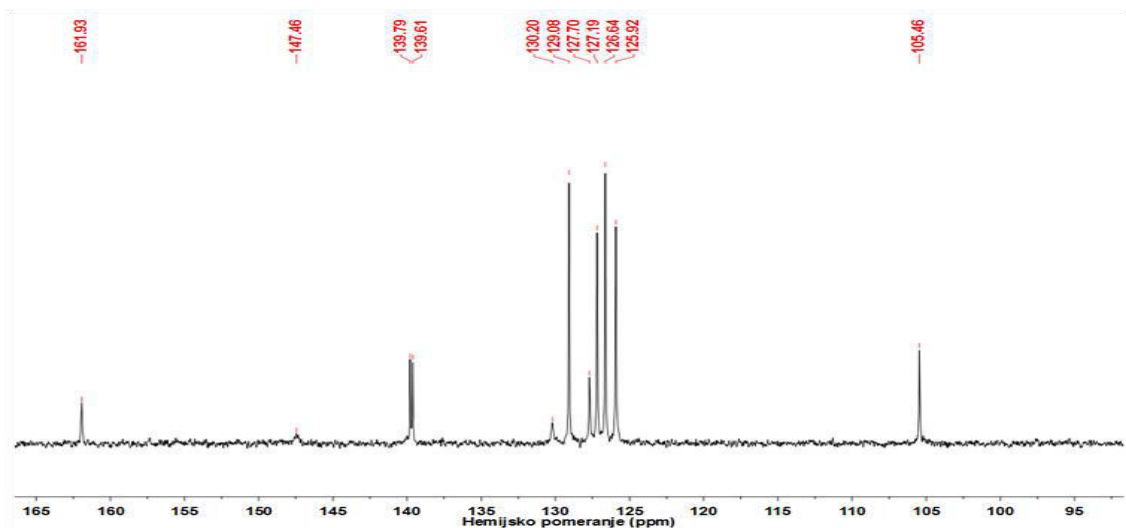
<sup>1</sup>H NMR spektar 5-(naftalen-2-il)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (38)



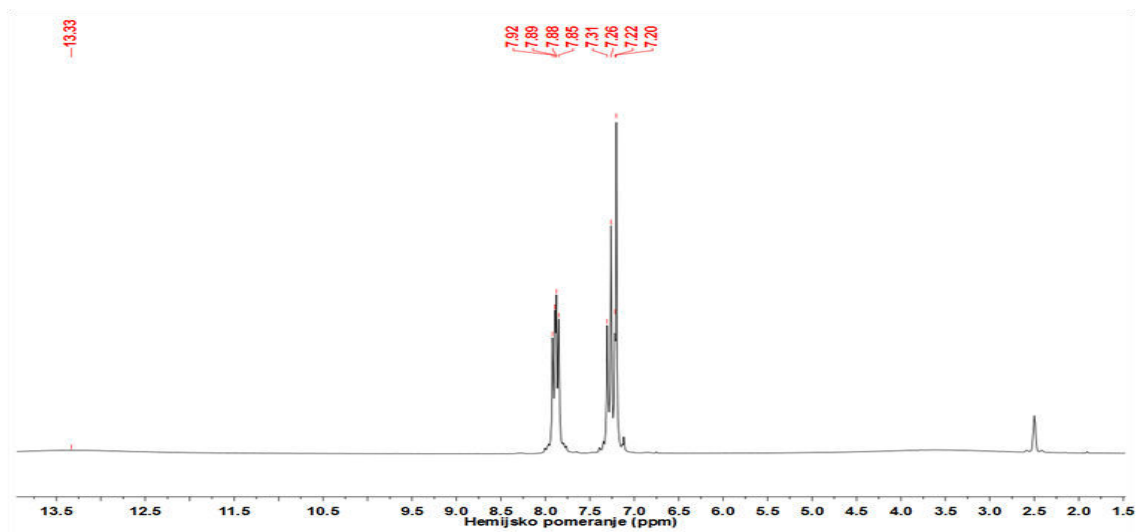
<sup>13</sup>C NMR spektar 5-(naftalen-2-il)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (38)



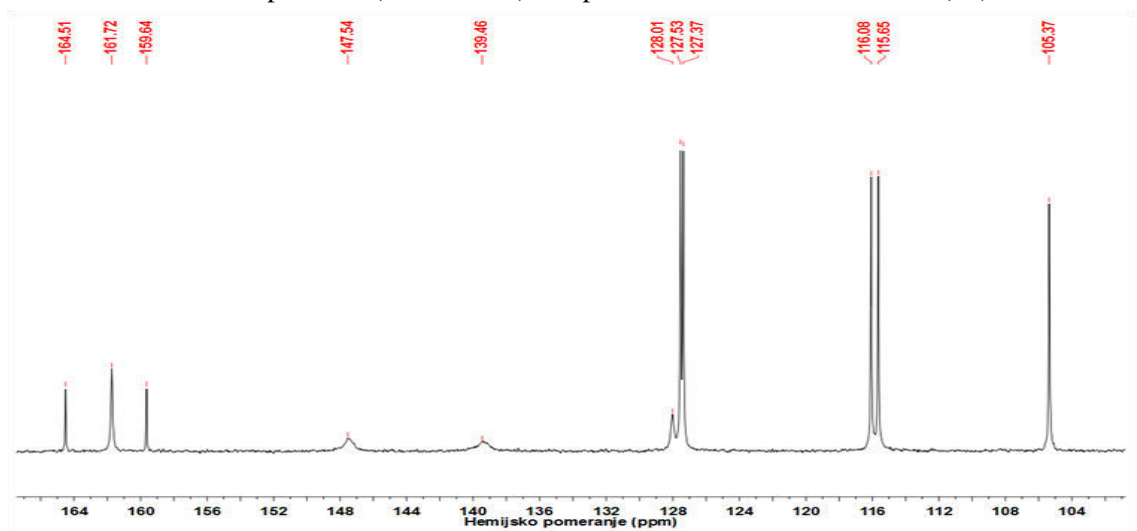
<sup>1</sup>H NMR spektar 5-((1,1'-bifenil)-4-il)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (39)



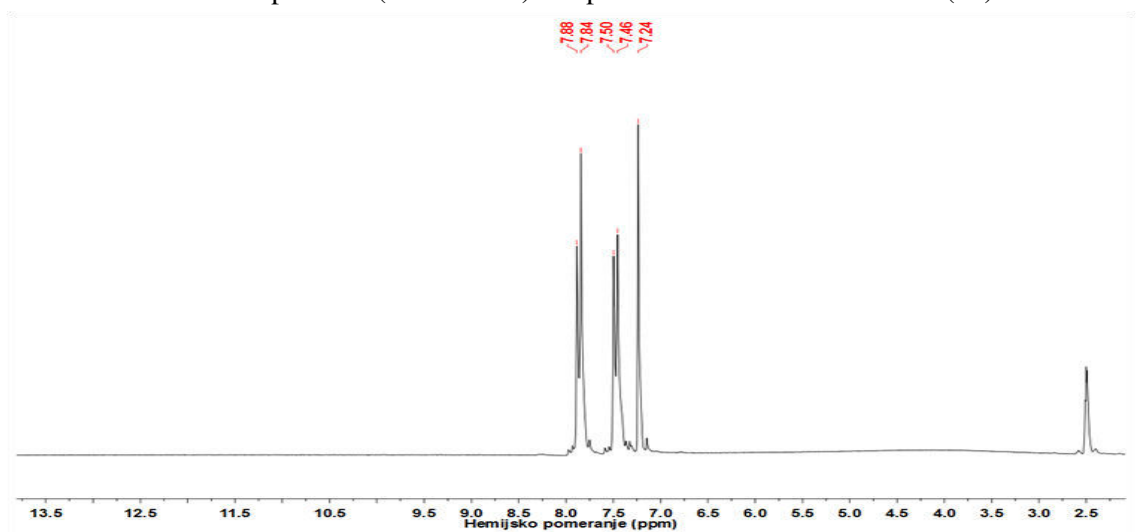




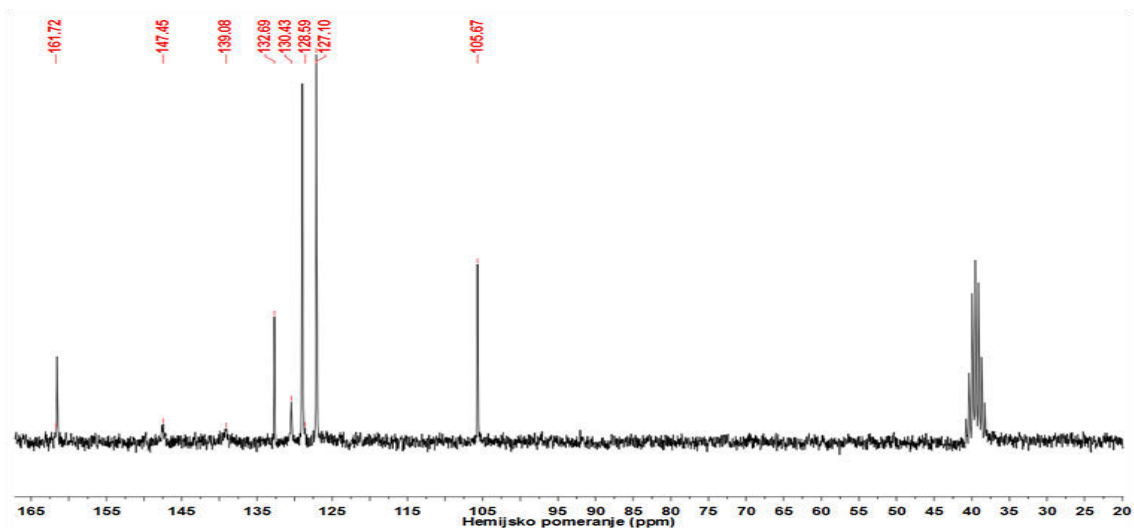
<sup>1</sup>H NMR spektar 5-(4-fluorfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (**41**)



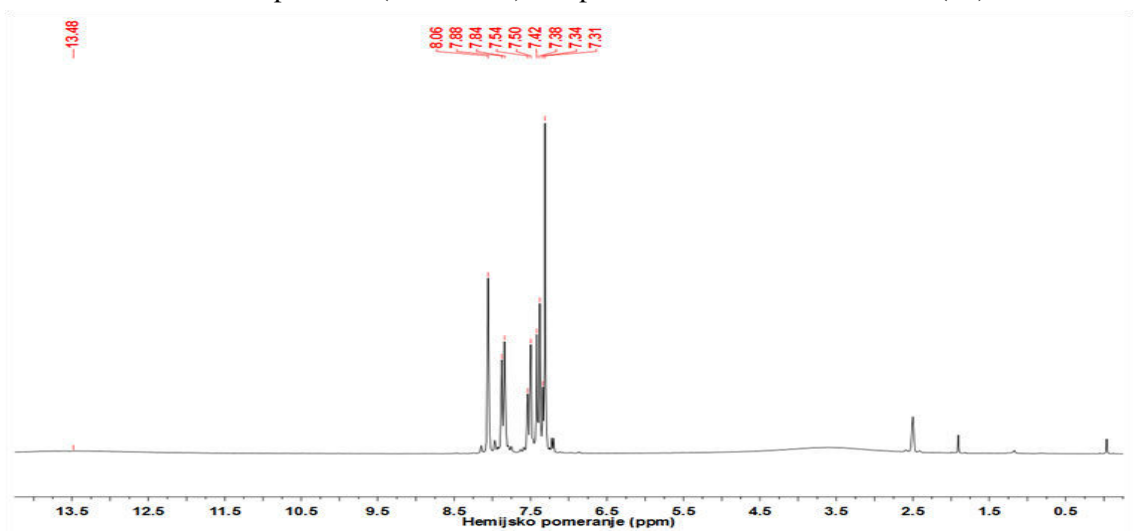
<sup>13</sup>C NMR spektar 5-(4-fluorfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (**41**)



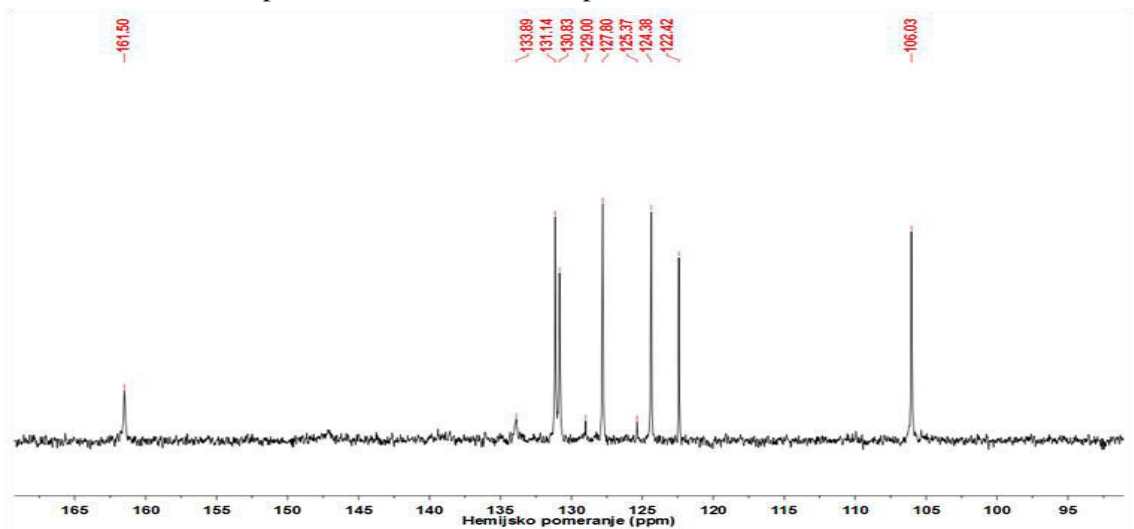
<sup>1</sup>H NMR spektar 5-(4-hlorfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (**42**)



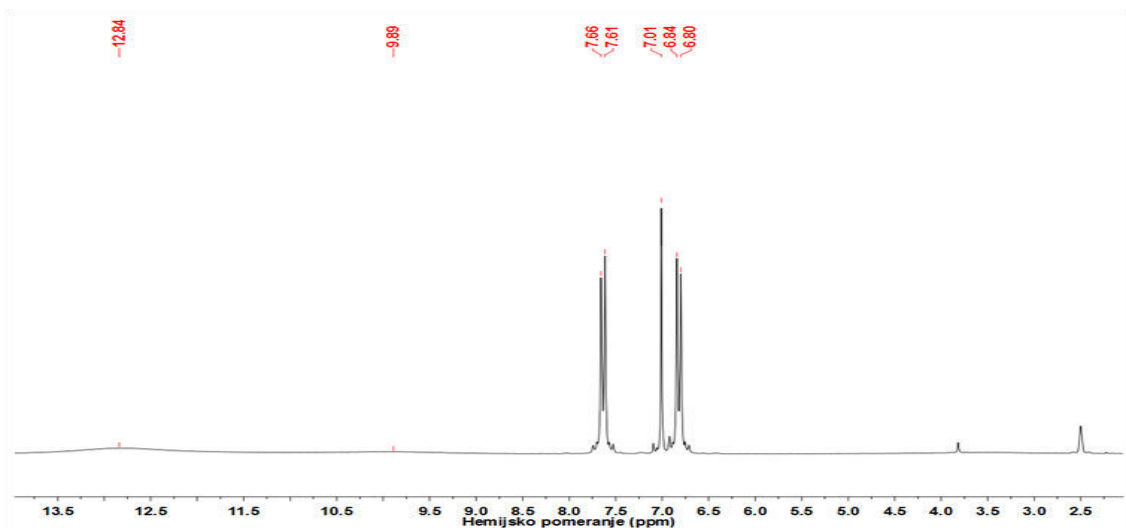
$^{13}\text{C}$  NMR spektr 5-(4-hlorfenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (**42**)



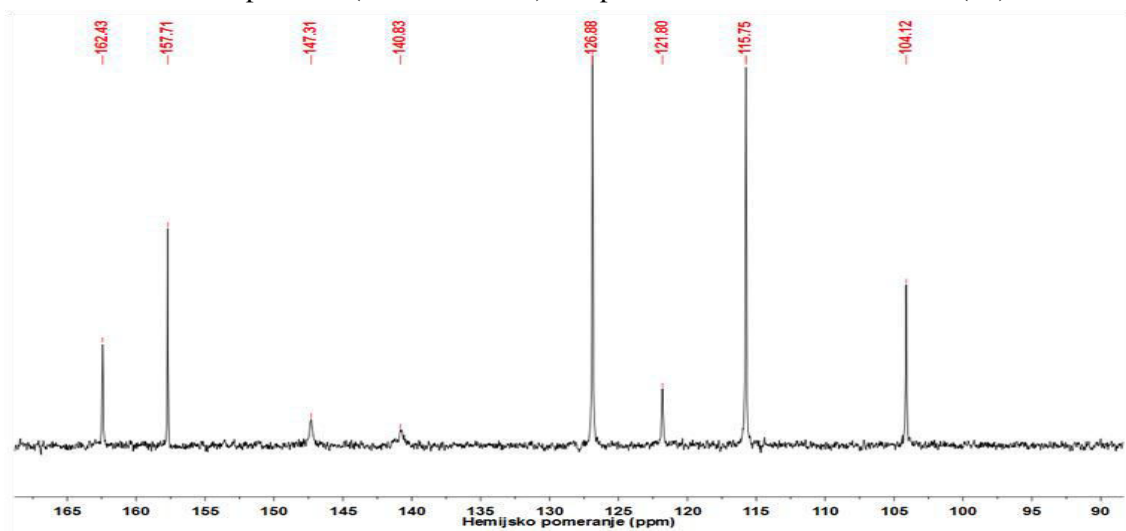
$^1\text{H}$  NMR spektr 5-(3-bromfenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (**43**)



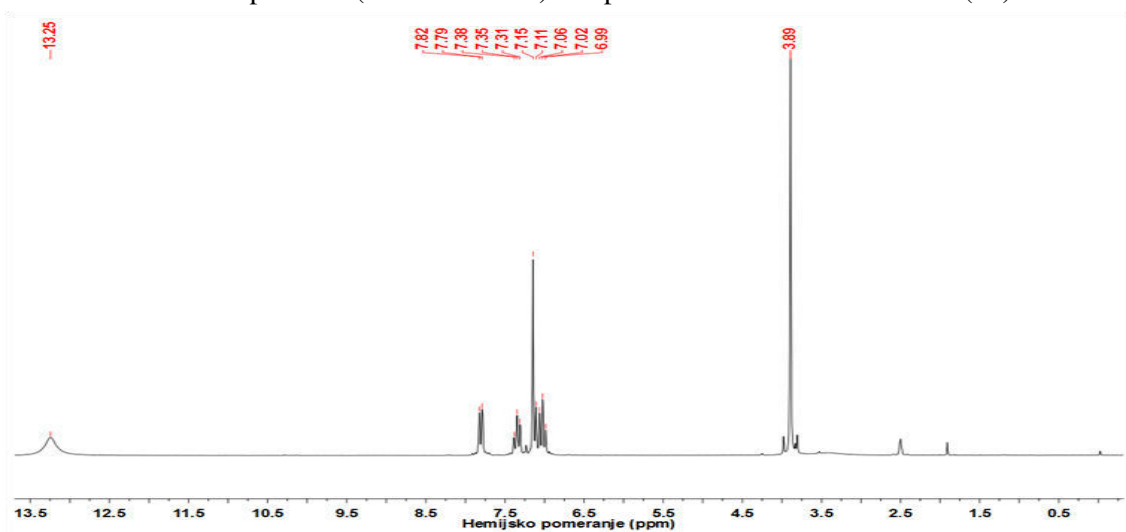
$^{13}\text{C}$  NMR spektr 5-(3-bromfenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (**43**)



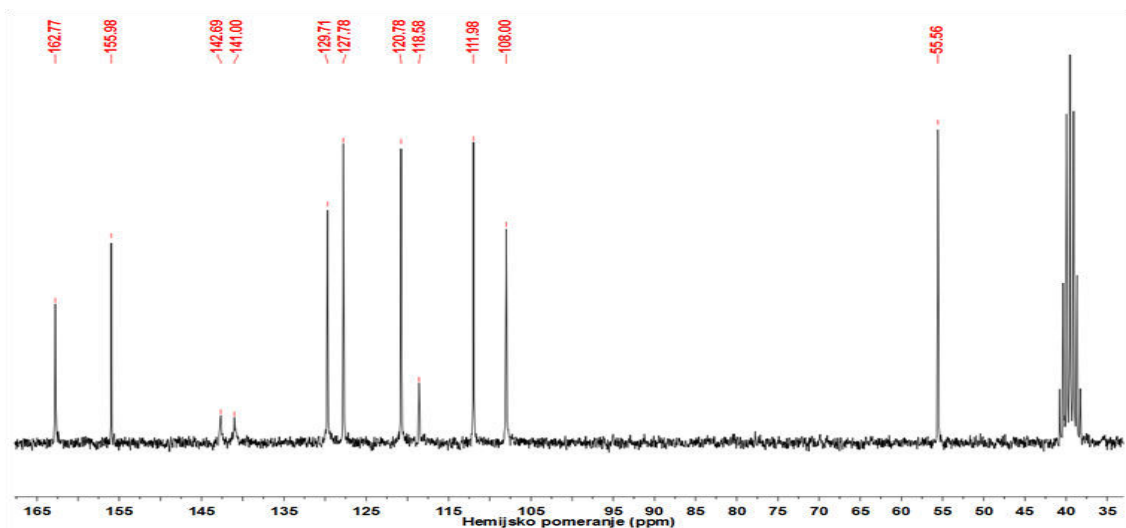
<sup>1</sup>H NMR spektar 5-(4-hidroksifenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (**44**)



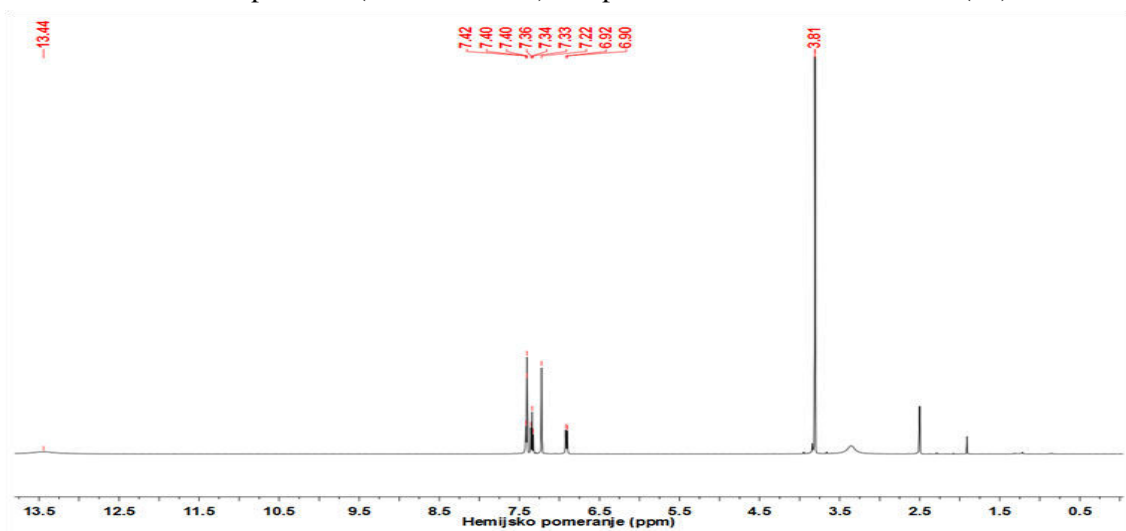
<sup>13</sup>C NMR spektar 5-(4-hidroksifenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (**44**)



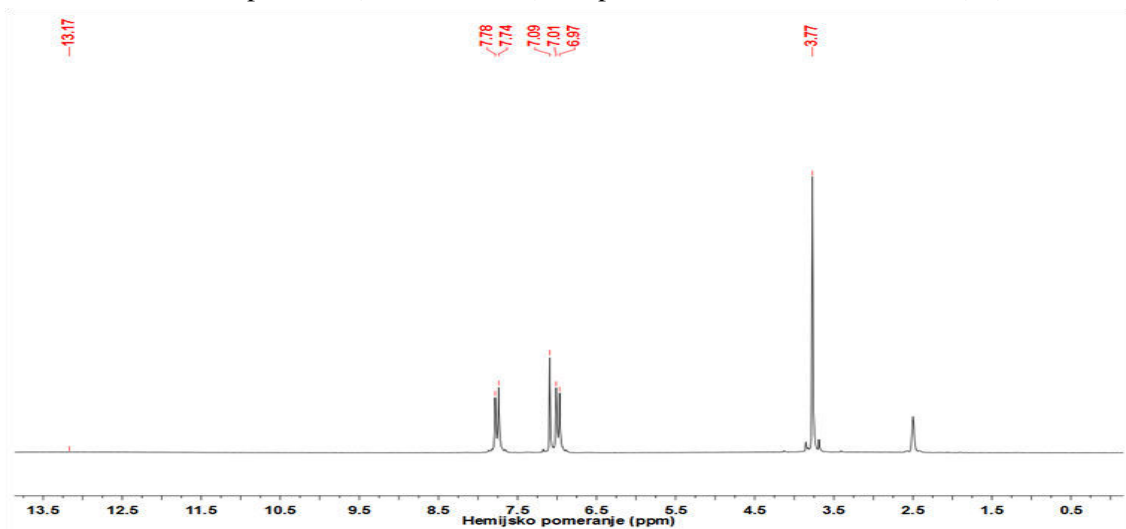
<sup>1</sup>H NMR spektar 5-(2-metoksifenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (**45**)



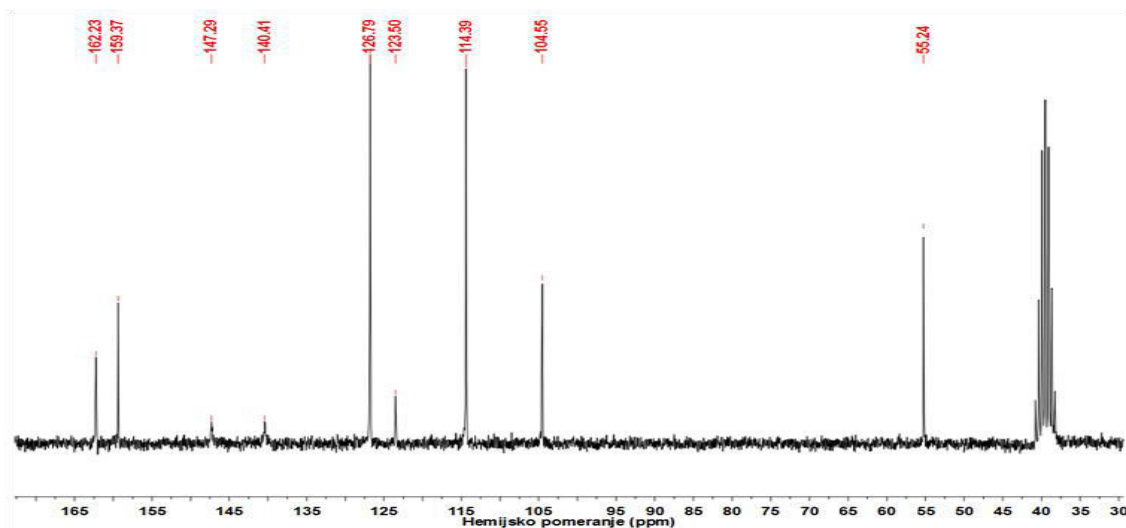
$^{13}\text{C}$  NMR spektar 5-(2-metoksifenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (**45**)



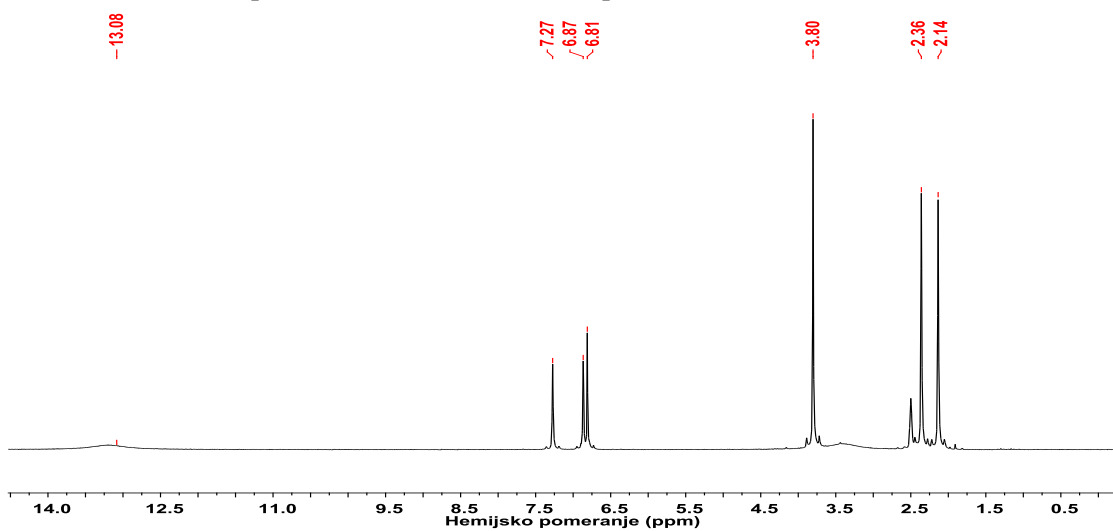
$^1\text{H}$  NMR spektar 5-(3-metoksifenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (**46**)



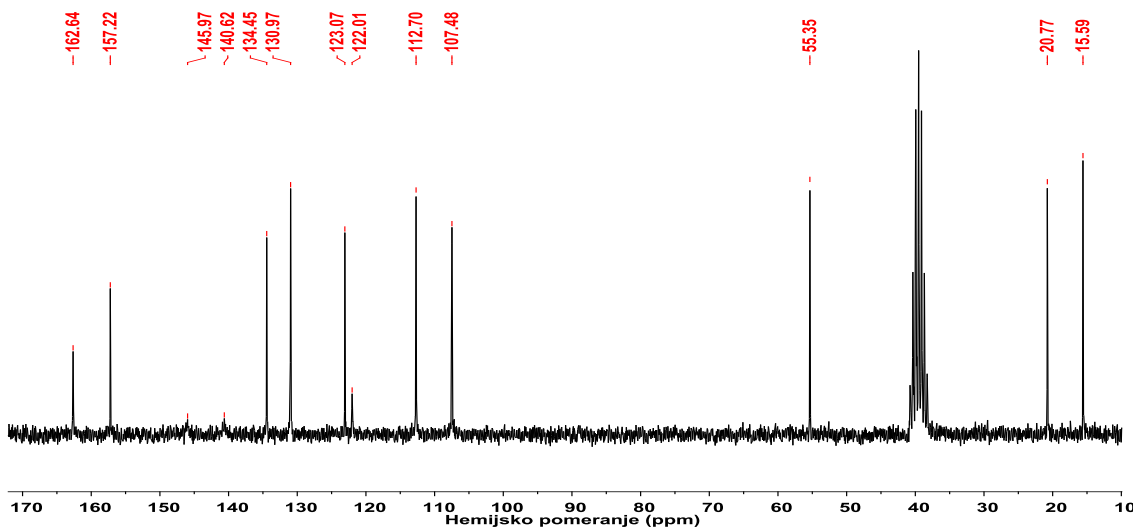
$^1\text{H}$  NMR spektar 5-(4-metoksifenil)-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (**47**)



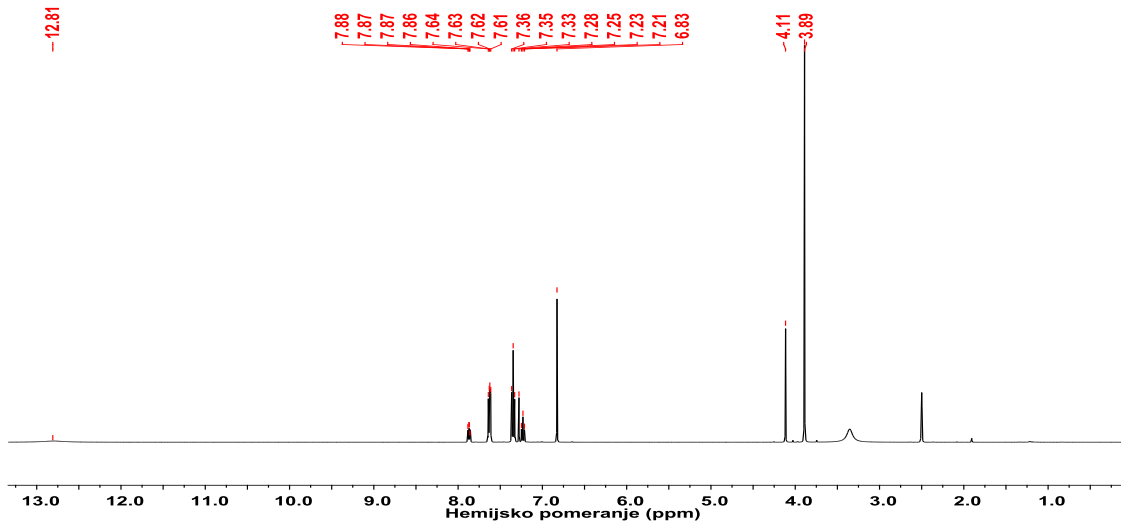
<sup>13</sup>C NMR spektar 5-(4-metoksifenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (47)



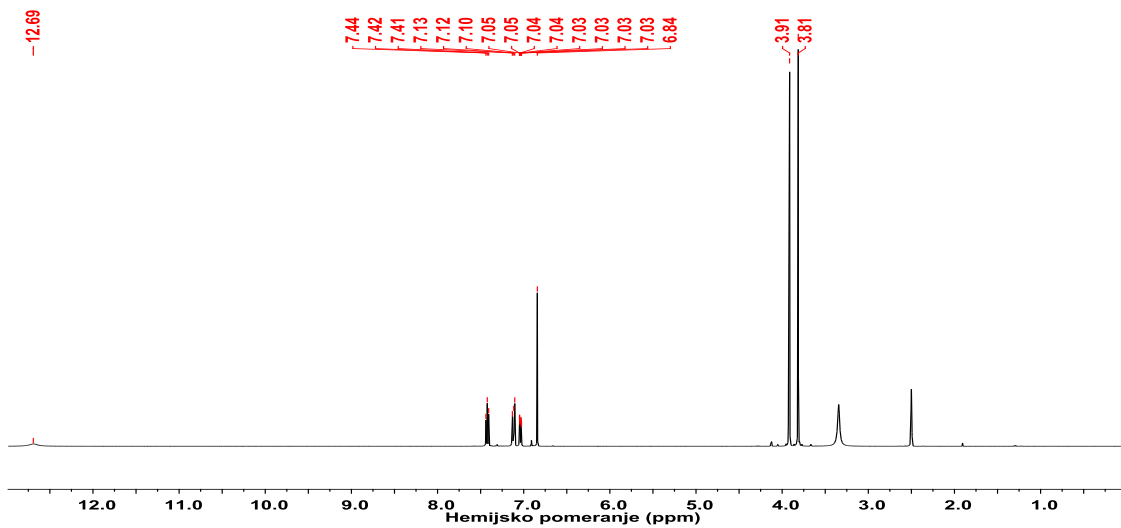
<sup>1</sup>H NMR spektar 5-(4-metoksi-2,5-di-metilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (48)



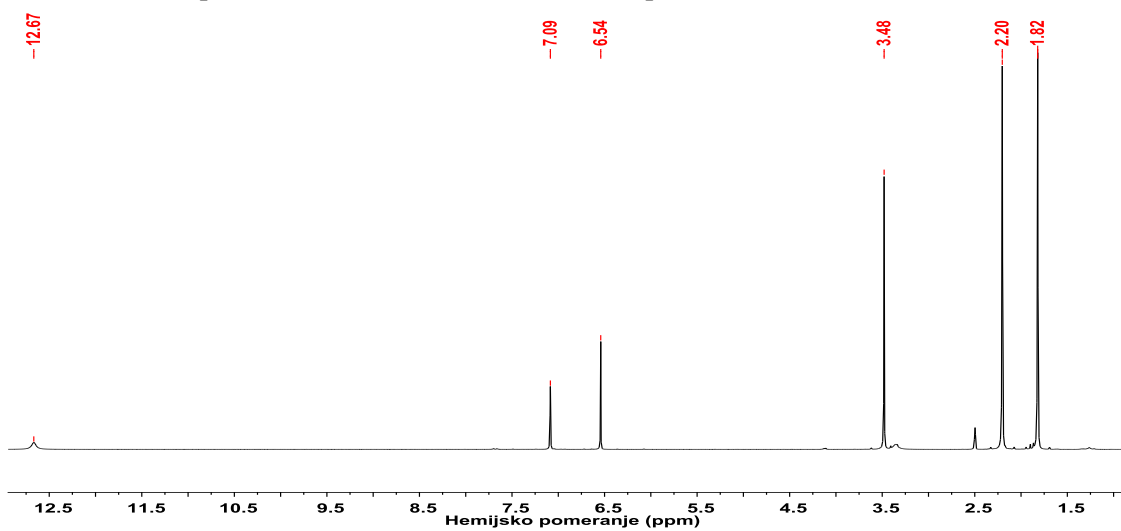
<sup>13</sup>C NMR spektar 5-(4-metoksi-2,5-di-metilfenil)-1H-pirazol-3-karboksilne kiseline (48)



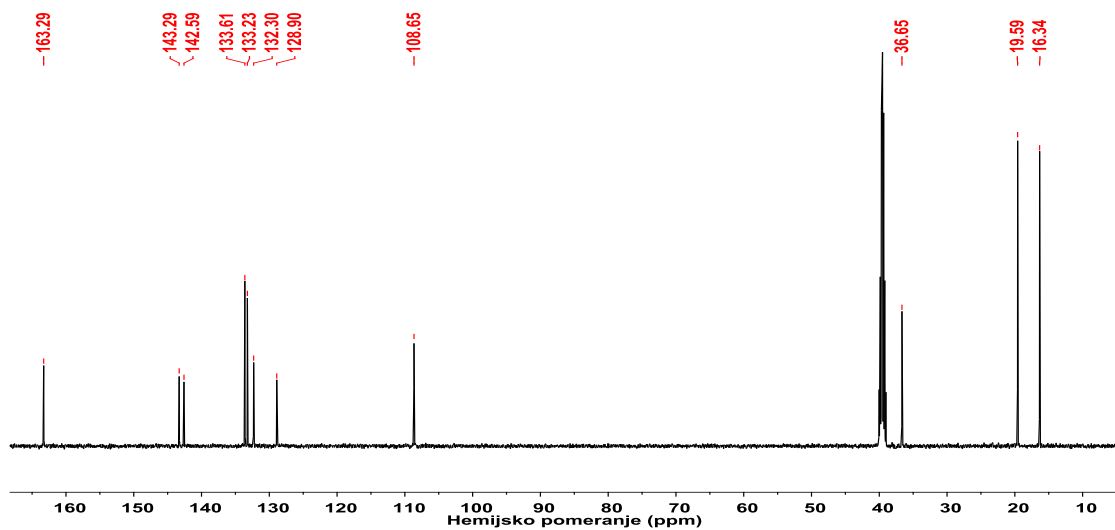
$^1\text{H}$  NMR spektar 5-(4-fluorfenil)-1-metil-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (**49**)



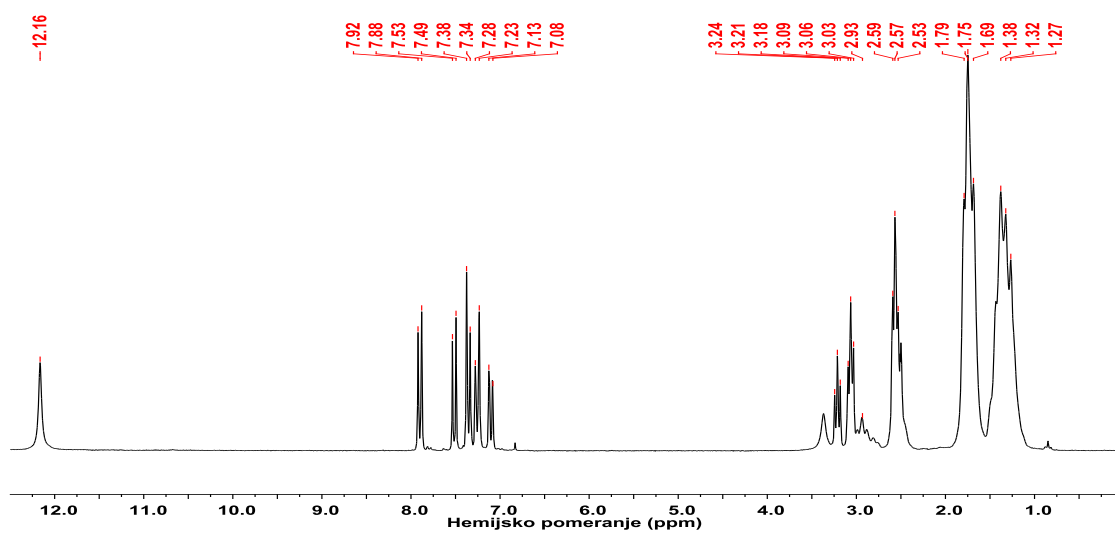
$^1\text{H}$  NMR spektar 5-(3-metoksifenil)-1-metil-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (**50**)

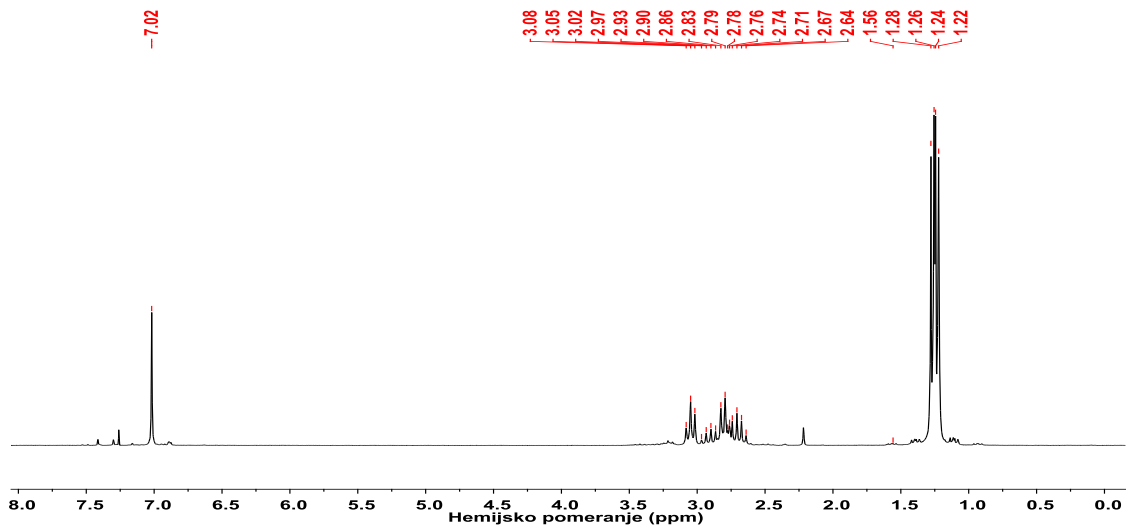


$^1\text{H}$  NMR spektar 5-(2,3,5,6-tetrametilfenil)-1-metil-1*H*-pirazol-3-karboksilne kiseline (**51**)

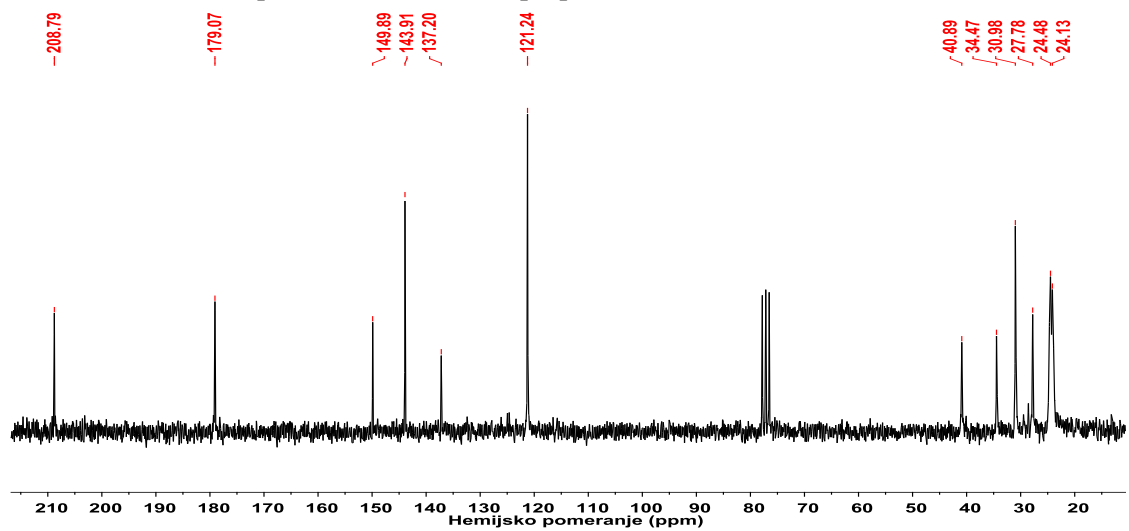


**Prilog 4.** Slike NMR spektara aroilpropanskih kiselina i acetofenona (**1a-5a**)

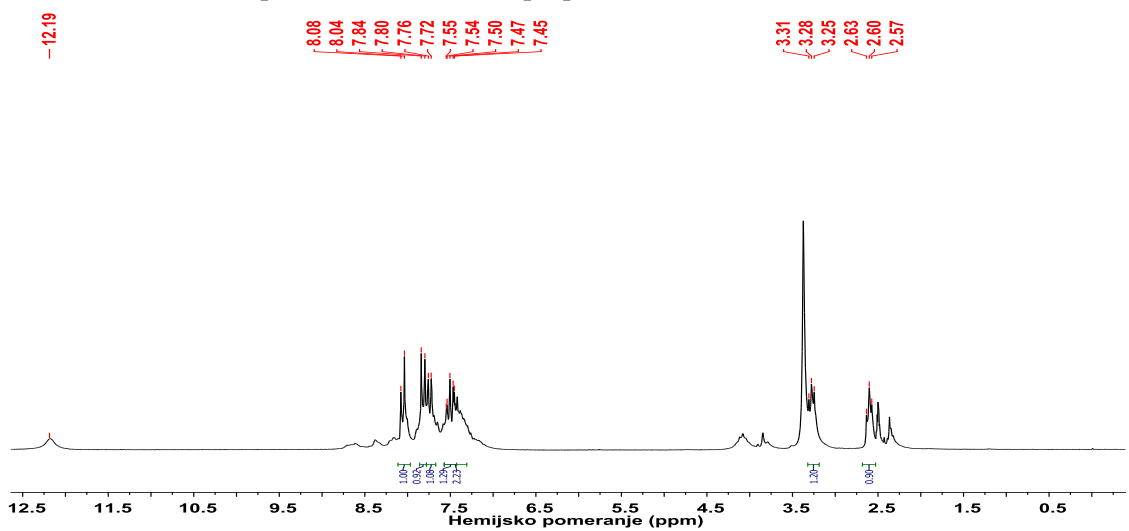




$^1\text{H}$  NMR spektar 4-(2,4,6-tri-*izo*-propilfenil)-4-oksobutanske kiseline (**2a**)

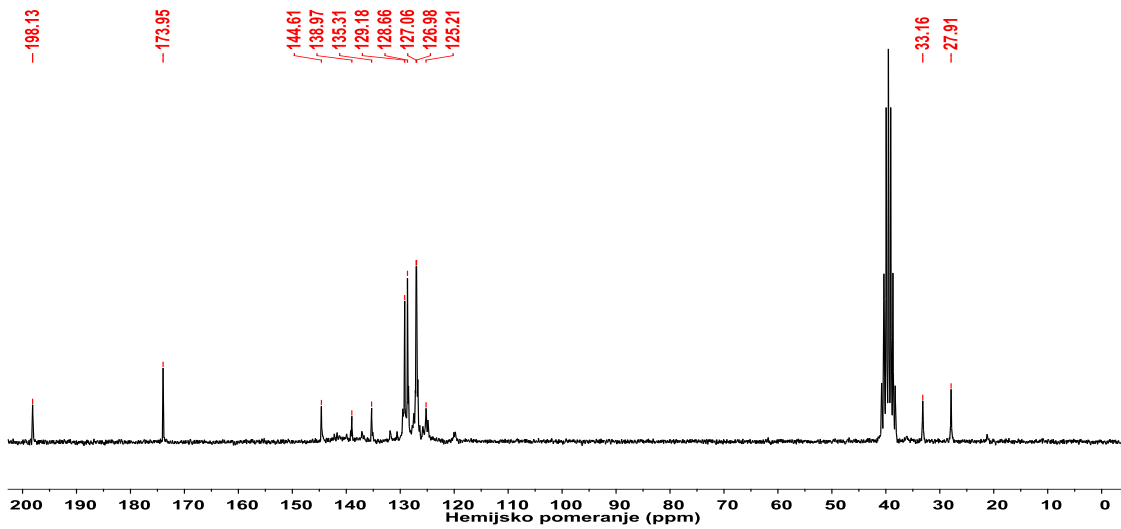


$^{13}\text{C}$  NMR spektar 4-(2,4,6-tri-*izo*-propilfenil)-4-oksobutanske kiseline (**2a**)

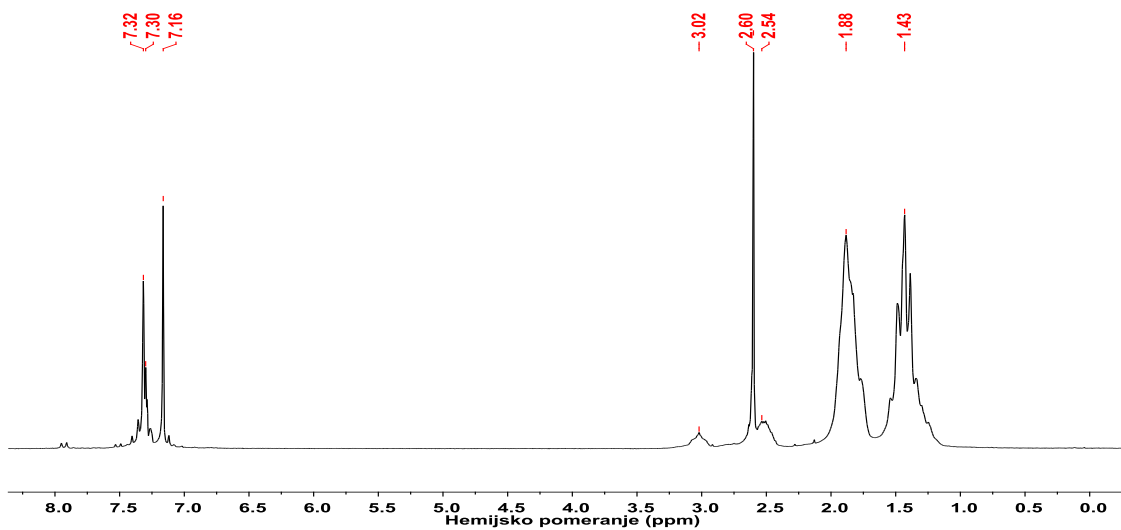


$^1\text{H}$  NMR spektar 4-((1,1'-bifenil)-4-il)-4-oksobutanske kiseline (**3a**)

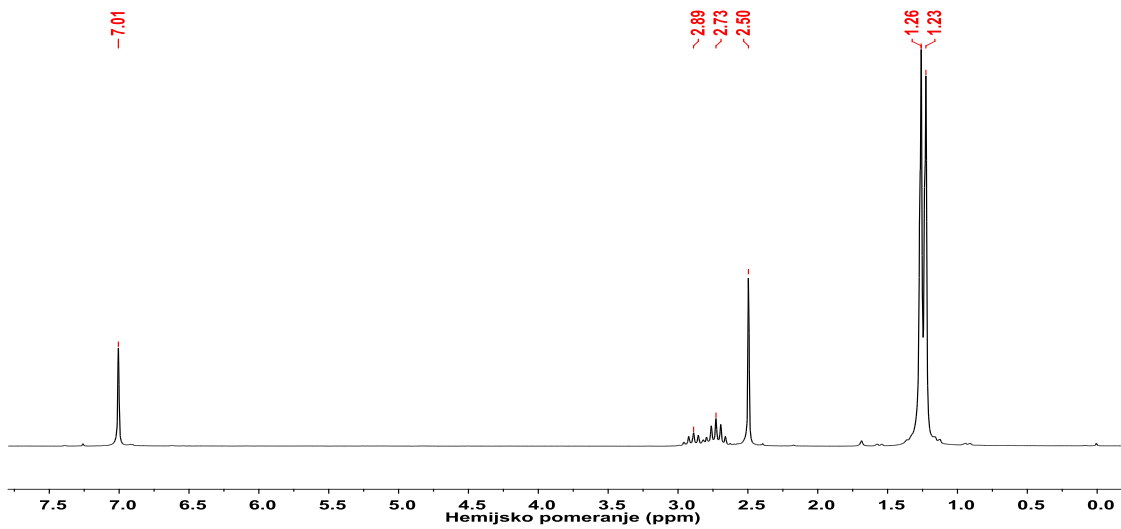




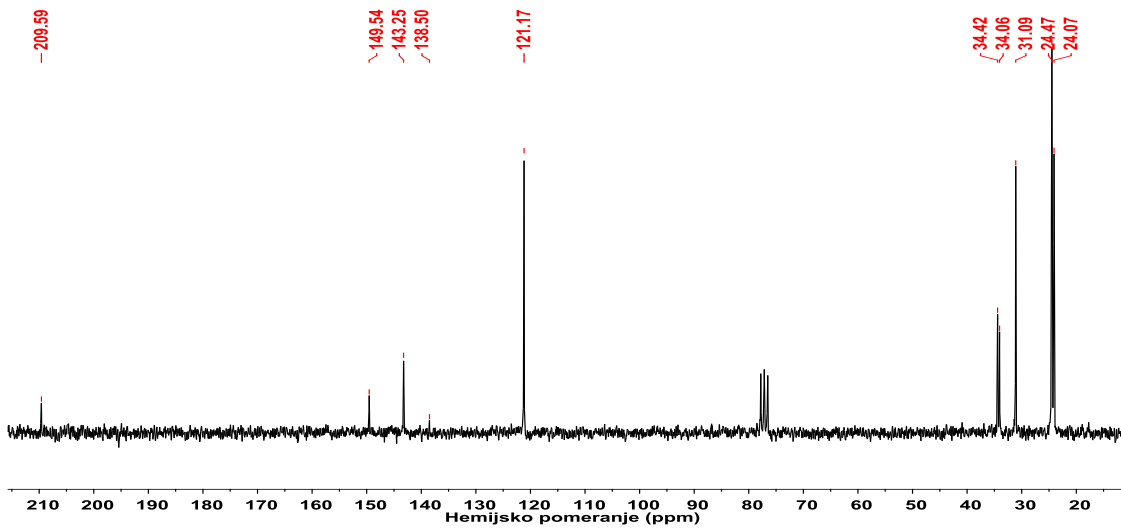
<sup>13</sup>C NMR spektar 4-((1,1'-bifenil)-4-il)-4-oksobutanske kiseline (**3a**)



<sup>1</sup>H NMR spektar 1-(2,5-di-cikloheksilfenil)etanona (**4a**)



<sup>1</sup>H NMR spektar 1-(2,4,6-tri-*izo*-propilfenil)etanona (5a)



<sup>13</sup>C NMR spektar 1-(2,4,6-tri-*izo*-propilfenil)etanona (5a)

## Biografija

Ilija Cvijetić rođen je 14. decembra 1985. godine u Sremskoj Mitrovici, gde je završio osnovnu i srednju školu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu upisao je 2004. godine, a diplomirao septembra 2008. na Katedri za Analitičku hemiju sa prosečnom ocenom 9,17 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Školske 2008/09. godine upisao je doktorske studije na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Godine 2008. primljen je kao istraživač-pripravnik zaposlen na Hemijskom fakultetu, na projektu „Sinteza, karakterizacija i biološka aktivnost organskih i koordinacionih jedinjenja i njihova primena u (bio)nanotehnologiji”, projekat broj 142010, finansiran od strane Ministarstva za nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije. Godine 2009. angažovan je kao istraživač-pripravnik na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, d.o.o., a od 2011. godine radi kao istraživač-saradnik u istoj ustanovi. Trenutno je angažovan na projektu „Racionalni dizajn i sinteza biološki aktivnih i koordinacionih jedinjenja i funkcionalnih materijala, relevantnih u (bio)nanotehnologiji” projekat broj 172035 Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Učestvovao je i na projektu: “High-Performance Computing Infrastructure for South East Europe’s Research Communities” finansiranom od strane Evropske Komisije (FP7, Grant No. 261499).

Od 2011. godine honorarno je angažovan u izvođenju nastave na Katedri za Analitičku hemiju, kao saradnik na vežbama u okviru kurseva: Analitička hemija 2 i Analitička hemija 3 u okviru studijskog programa Hemija, Instrumentalna analitička hemija u okviru studijskih programa Hemija životne sredine i Nastava hemije, Analitička hemija 2 u okviru studijskog programa Biohemija, Odabrane oblasti analitičke hemije - izborni predmet na četvrtoj godini studija Hemijskog fakulteta.

Koautor je osam radova publikovanih u međunarodnim časopisima: pet objavljenih u vrhunskom časopisu međunarodnog značaja (M21), dva rada iz kategorije istaknutih međunarodnih časopisa (M22) i jedan u međunarodnom časopisu (M 23). Osim toga, koautor je i 20 saopštenja na međunarodnim skupovima i skupovima od nacionalnog značaja.

Oženjen je i otac je dvoje dece.

**Prilog 5.**

## **Izjava o autorstvu**

Potpisani Ilija N. Cvijetić

broj upisa /

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom:

Hemijska i biološka karakterizacija novosintetisanih derivata 4-aril-2,4-dioksobutanskih kiselina i molekulska modelovanje u cilju racionalizacije biološke aktivnosti i fizičko-hemijskih osobina

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 02.09.2016.

*Ilija N. Cvijetić*

Prilog 6.

## Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: Ilija Cvijetić

Broj upisa: /

Studijski program: Hemija

Naslov rada: Hemijska i biološka karakterizacija novosintetisanih derivata 4-aril-2,4-dioksobutanskih kiselina i molekulska modelovanje u cilju racionalizacije biološke aktivnosti i fizičko-hemijskih osobina

Mentor: dr. Tatjana Ž. Verbić

Potpisani Ilija N. Cvijetić

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao/la za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu**.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

U Beogradu, 02.09.2016.

**Potpis doktoranda**



## Prilog 7.

### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

Hemijska i biološka karakterizacija novosintetisanih derivata 4-aril-2,4-dioksobutanskih kiselina i molekulske modelovanje u cilju racionalizacije biološke aktivnosti i fizičko-hemijskih osobina

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio/la.

1. Autorstvo

2. Autorstvo - nekomercijalno

3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade

4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima

5. Autorstvo – bez prerade

6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

U Beogradu, 02.09.2016.

**Potpis doktoranda**

*Yasmin Kriza*