

UNIVERZITET U BEOGRADU

HEMIJSKI FAKULTET

Nina S. Božinović

**RAZVOJ METODE ZA SINTEZU  
BIOLOŠKI AKTIVNIH AZEPINSKIH I  
TIEPINSKIH DERIVATA – DVOSTRUKO  
N- I S-ARILOVANJE KATALIZOVANO  
KOMPLEKSIMA PALADIJUMA**

doktorska disertacija

Beograd, 2017.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF CHEMISTRY

Nina S. Božinović

**DEVELOPMENT OF A NEW  
METHODOLOGY FOR THE SYNTHESIS  
OF BIOLOGICALLY ACTIVE AZEPINE  
AND THIEPINE DERIVATIVES –  
PALLADIUM CATALYZED DOUBLE *N*-  
AND *S*-ARYLATION**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2017.

Članovi komisije:

1. akademik Bogdan Šolaja (mentor)
2. dr Igor Opsenica, docent Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (mentor)
3. dr Dragana Milić, redovni profesor Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu
4. dr Jasmina Nikodinović-Runić, naučni savetnik Instituta za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo Univerziteta u Beogradu

---

Datum odbrane

## **Zahvalnica**

*Ova doktorska disertacija urađena je na Katedri za organsku hemiju Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, pod rukovodstvom akademika Bogdana Šolaje i dr Igora Opsenice.*

*Najiskrenije se zahvaljujem svom profesoru Bogdanu Šolaji na prenesenom znanju, korisnim savetima i podršci prilikom izrade i pisanja ovog rada.*

*Posebno se zahvaljujem svom mentoru dr Igoru Opsenici, na velikom doprinosu planiranju istraživanja, konstruktivnim sugestijama i konstantnom podstreku tokom svih godina koliko je trajala izrada disertacije.*

*Zahvaljujem se profesorki Dragani Milić što je prihvatila učešće u komisiji za ocenu i odbranu teze i pomogla mi korisnim savetima prilikom pisanja ovog rada.*

*Takođe, zahvaljujem se dr Jasmini Nikodinović-Runić i njenim saradnicima na Institutu za molekularnu genetiku i genetičko inženjerstvo, što su određivanjem biološke aktivnosti upotpunili ovu tezu. Dr Jasmini Nikodinović-Runić se posebno zahvaljujem na pomoći prilikom pisanja biološkog dela rada.*

*Naročito se zahvaljujem dr Slađani Kostić-Rajačić i dr Ireni Novaković na izradi i pomoći prilikom analize rezultata bioloških testova.*

*Dr Mariu Zlatoviću zahvaljujem se na računarskom modelovanju.*

*Ogromnu zahvalnost dugujem profesoru Velu Teševiću i dr Ivanu Vučkoviću na tumačenju spektara prilikom određivanja strukture jedinjenja. Zahvaljujem se dr Nini Todorović, dr Milki Jadranin, dr Snežani Trifunović, dr Dejanu Gođevcu, dr Ljubodragu Vujisiću, Marini Todosijević, Dejanu Vučetiću, Bobanu Anđelkoviću, Mirjani Cvetković, Marijani Živković, Gordani Krstić, Jovani Stanković i Ivani Sofrenić na urađenim spektralnim analizama i beskrajnom strpljenju i ljubaznosti.*

*Iskreno se zahvaljujem dr Dejanu Opsenici što mi je brojnim savetima i diskusijama pružio dragocenu pomoć.*

*Dr Ivani Aljančić zahvaljujem se na prijatnoj saradnji u laboratoriji 432.*

*Dragoj Miri zahvaljujem se na druženju i pomoći tokom organizacije i izvođenja eksperimentalnih vežbi.*

*Veliku zahvalnost dugujem kolegama, a pre svega prijateljima, Milici, Jeleni, Životi, Nataši, Vuku, Miklošu, Jovani, Mariji, Katarini, Vladimiru, Jeleni, Mariji i Valentini za saradnju, druženje i uvek veselu atmosferu u laboratorijama 432, 468 i 524.*

*Mom prijatelju Petru hvala na podršci, strpljenju i iskrenom prijateljstvu.*

*Hvala mojoj porodici za svu ljubav i podršku.*

*Ovu doktorsku tezu posvećujem  
svom nastavniku Predragu Milisavljeviću*

**Naslov:**

**Razvoj metode za sintezu biološki aktivnih azepinskih i tiepinskih derivata – dvostruko *N*- i *S*-arilovanje katalizovano kompleksima paladijuma**

**Rezime:**

Razvijena je nova metoda za sintezu azepinskih i tiepinskih derivata, zasnovana na dvostrukom *N*- i *S*-arilovanju katalizovanom kompleksima paladijuma. Izborom odgovarajućeg liganda, standardizovani su reakcioni uslovi za sintezu *N*- i *S*-tricikličnih sistema u jednom koraku, polazeći iz odgovarajućih *Z*-stilbena. Optimizovani reakcioni uslovi primenjeni su u sintezi novih azepina i tiepina. Daljim strukturnim modifikacijama osnovnog tiepinskog sistema, sintetisani su novi tiepinski derivati. Određena je antibakterijska i antifungalna aktivnost sintetisanih jedinjenja. Ispitana je njihova toksičnost, a urađeni su i preliminarni eksperimenti s ciljem određivanja mehanizma antifungalnog dejstva tiepinskih molekula. Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja antifungalne aktivnosti i toksičnosti, može se zaključiti da bi testirani tiepini mogli biti osnova za razvoj novih antifungalnih terapeutika.

**Ključne reči:** *N*-arilovanje / *S*-arilovanje / paladijum / azepin / tiepin / antibakterijska aktivnost / antifungalna aktivnost

**Naučna oblast:** Prirodne nauke

**Uža naučna oblast:** Organska hemija, medicinska hemija

**UDK broj:** 547

**Title:****Development of a new methodology for the synthesis of biologically active azepine and thiepine derivatives – palladium-catalyzed double *N*- and *S*-arylation****Abstract:**

Novel methodology for the synthesis of azepine and thiepine compounds, based on the palladium-catalyzed double *N*- and *S*-arylation reaction is reported. Reaction conditions for the preparation of *N*- and *S*-tricyclic products in one step from the appropriate stilbenes were standardized by choosing appropriate ligands. This optimized methodology was successfully applied for the synthesis of new azepine and thiepine derivatives. Structural modifications of the initial *S*-tricyclic core afforded a novel series of thiepine derivatives. The synthesized compounds were evaluated for their antibacterial and antifungal activities. The assessment of toxicity (lethality and teratogenicity) and preliminary tests of possible mechanism of action on the fungal cell of selected thiepines were performed. Results obtained from biological activity and toxicity screenings encourage further structure optimizations.

**Keywords:** *N*-arylation / *S*- arylation / palladium / azepine / thiepine / antibacterial activity / antifungal activity

**Scientific field:** Life sciences

**Scientific discipline:** Organic chemistry, medicinal chemistry

**UDK number:** 547

## Skraćenice

Ac	acetil
ADP	adenozin-difosfat
Ar	aril
ATP	adenozin-trifosfat
bpy	2,2'-bipiridin
Bz	benzoil
CoA	koenzim A
Cy	cikloheksil
d	dublet
dba	dibenzilidenaceton
DBDMH	1,3-dibrom-5,5-dimetilhidantoin
dd	dublet dubleta
DME	1,2-dimetoksietan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetil-sulfoksid
DNK	dezoksiribonukleinska kiselina
dppf	1,1'-bis(difenilfosfino)ferocen
Et	etil
<i>i</i> -Pr	izopropil
LDA	litijum-diizopropilamid
LiHMDS	litijum-heksametilidisilazid
m	multiplet
Me	metil
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NBS	<i>N</i> -bromsukcinimid
NMP	<i>N</i> -metilpirolidin
Ph	fenil
PPA	polifosforna kiselina

PPi	pirofosfat
RNK	ribonukleinska kiselina
s	singlet
s.t.	sobna temperatura
t	triplet
<i>t</i> -Bu	<i>tert</i> -butil
Tf	trifilil (trifluormetansulfonil)
TFA	trifluorsirćetna kiselina
THF	tetrahidrofuran
TMS	trimetilsilil
UDP	uridin-difosfat
UTP	uridin-5'-trifosfat



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>2. OPŠTI DEO</b> .....	<b>3</b>
2.1. Antibakterijski lekovi .....	3
2.1.1. Mehanizmi antibakterijskog dejstva.....	4
2.1.1.1. Inhibicija ćelijskog metabolizma .....	5
2.1.1.2. Inhibicija biosinteze ćelijskog zida .....	7
2.1.1.3. Narušavanje strukture plazmamembrane .....	12
2.1.1.4. Ometanje sinteze proteina .....	13
2.1.1.5. Ometanje transkripcije i replikacije nukleinskih kiselina .....	15
2.1.2. Rezistencija na antibiotike .....	16
2.2. Antifungalni lekovi .....	17
2.2.1. Mehanizmi antifungalnog dejstva .....	17
2.2.1.1. Inhibicija sinteze i funkcije ergosterola .....	18
2.2.1.2. Narušavanje strukture ćelijskog zida .....	21
2.2.1.3. Inhibicija sinteze gljivičnih proteina .....	23
2.2.1.4. Inhibicija sinteze nukleinskih kiselina kod gljiva .....	24
2.2.1.5. Inhibicija sinteze gljivičnih mikrotubula .....	24
2.3. Azepini .....	25
2.3.1. Sinteza dibenzo[ <i>b,f</i> ]azepina .....	26
2.3.1.1. Dvostruko <i>N</i> -arilovanje katalizovano paladijumom.....	31
2.4. Tjepini .....	33
2.4.1. Sinteza dibenzo[ <i>b,f</i> ]tjepina.....	34
2.4.2. Građenje C-S veze arilovanjem katalizovanim paladijumom – put ka sintezi tiepina dvostrukim arilovanjem sumpora.....	36
<b>3. NAŠI RADOVI</b> .....	<b>38</b>
3.1. Novi azepinski derivati .....	38
3.1.1. Sinteza stilbenskih prekursora.....	39
3.1.2. Sinteza azepinskog prstena .....	42
3.1.3. Ispitivanje mehanizma i nukleofilna aromatična supstitucija .....	44
3.1.4. Antimikrobna aktivnost novih azepinskih derivata.....	47
3.2. Novi tiepinski derivati .....	49

3.2.1. Sinteza tiepinskog prstena.....	49
3.2.2. Dalje transformacije tiepinskih derivata .....	52
3.2.3. Antimikrobna aktivnost novih tiepinskih derivata .....	56
<b>4. EKSPERIMENTALNI DEO .....</b>	<b>61</b>
4.1. Sintetičke procedure .....	61
4.2. Ispitivanje biološke aktivnosti .....	95
4.2.1. Određivanje antimikrobne aktivnosti .....	95
4.2.2. Određivanje toksičnosti prema embrionima zebra-ribica .....	98
<b>5. ZAKLJUČAK .....</b>	<b>100</b>
<b>6. SUMMARY .....</b>	<b>103</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>106</b>

## 1. UVOD

Od kako je Ehrlich pre oko sto godina oformio koncept hemoterapeutskog agensa, istorija otkrića i istraživanja biološki aktivnih jedinjenja predstavlja niz velikih naučnih dostignuća, ali i sticaja srećnih okolnosti, što se možda najbolje može videti u oblasti istraživanja antibiotika (penicilin). Uspešnim lečenjem bakterijskih infekcija, antibiotici su nam pružili zdravstveni standard čijim bi se gubitkom medicina vratila na početak dvadesetog veka. Oni su jedinstveni po tome što selektivno deluju protiv bakterija, a ne oštećuju u većoj meri ćelije i tkiva domaćina. Neracionalna upotreba ovih lekova u medicini i poljoprivredi predstavljala je toksični šok za bakterije, koje su odgovorile razvojem rezistencije. Do sada je identifikovana rezistencija na gotovo svaki od postojećih antibakterijskih lekova. U poslednjih trideset godina, značajno se povećao i broj slučajeva fungalnih infekcija, posebno kod imunokompromitovanih pacijenata i hospitalizovanih pacijenata sa drugim ozbiljnim oboljenjima, što je dovelo do povećanja smrtnosti ovih bolesnika. Fungalne infekcije se teško leče, jer postoji veoma mali broj efikasnih antifungalnih lekova, a sve je učestalija rezistencija na postojeće lekove. Takođe, postojeći antifungalni lekovi imaju brojna neželjena dejstva. Na listi Svetskog ekonomskog foruma, koja predviđa deset najvećih globalnih rizika, na drugom mestu nalazi se širenje zaraznih bolesti. Jasno je da je neophodno neprestano pronalaženje novih terapijskih opcija za lečenje bakterijskih i gljivičnih infekcija.

Tokom godina, proces pronalaženja lekova se menjao, ali je cilj ostao isti – efikasniji i bezbedniji lekovi protiv opasnih i smrtonosnih bolesti. Do jedinjenja korisnih za medicinu, može se doći na dva načina: identifikacijom i izolovanjem jedinjenja sa biološkom aktivnošću iz prirode i sintezom malih molekula koji poseduju biološku aktivnost. U savremenom pristupu otkrića lekova dominira hemija, ograničena i pomognuta racionalnim pristupom zasnovanim na poznavanju bioloških procesa. Impresivna sposobnost paladijuma da katalizuje formiranje C-C i C-heteroatom veza omogućila je izvođenje transformacija koje bi bilo nemoguće izvesti tradicionalnim pristupom ili bi zahtevale veći broj sintetičkih koraka. Za sintezu biološki aktivnih jedinjenja, posebno je značajna reakcija formiranja C-N veze, jer mnoga aktivna jedinjenja, uključujući i veliki broj lekova odobrenih u kliničkoj praksi, sadrže azot.

U okviru ove disertacije, razvijena je nova metoda za sintezu azepinskih i tiepinskih derivata, zasnovana na dvostrukom *N*- i *S*-arilovanju katalizovanom kompleksima paladijuma. Optimizovani reakcioni uslovi primenjeni su u sintezi novih azepina i tiepina. Daljim strukturnim modifikacijama osnovnog tiepinskog sistema, sintetisani su novi tiepini. Određena je antibakterijska i antifungalna aktivnost sintetisanih jedinjenja. Ispitana je njihova toksičnost, a urađeni su i preliminarni eksperimenti s ciljem određivanja mehanizma antifungalnog dejstva tiepinskih molekula.

Ova doktorska disertacija sastoji se iz četiri dela.

**OPŠTI DEO** sadrži osnovne podatke o antibakterijskim i antifungalnim lekovima. Takođe, dat je pregled literature koja se odnosi na sintezu azepinskog i tiepinskog heterocikličnog sistema, sa posebnim osvrtom na upotrebu kompleksa paladijuma za formiranje C-N i C-S veze.

**NAŠI RADOVI** obuhvataju detaljan prikaz rezultata našeg rada na razvoju metode, ispitivanju mehanizma i sintezi novih azepinskih i tiepinskih jedinjenja, analizu struktura pomoću spektroskopskih i računarskih metoda i analizu rezultata ispitivanja biološke aktivnosti.

**EKSPERIMENTALNI DEO** sadrži procedure za sintezu svih dobijenih jedinjenja i osnovne detalje bioloških analiza.

U **PRILOGU 1** opisano je određivanje strukture dva sintetisana jedinjenja, analizom 2D NMR spektara i rezultata dobijenih masenom spektrometrijom.

Kao elektronski prilog na CD-u, dati su  $^1\text{H}$  i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri svih sintetisanih jedinjenja.

## 2. OPŠTI DEO

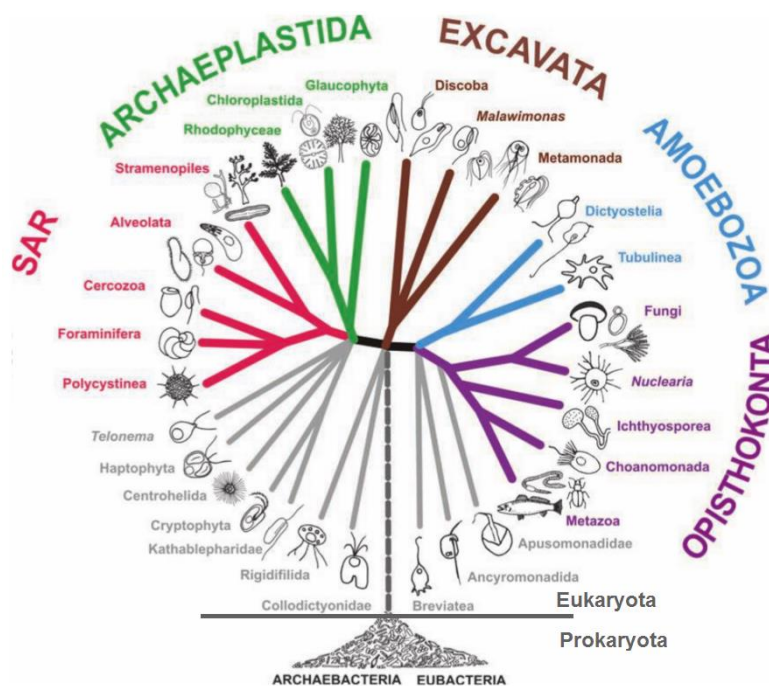
Uzroci bolesti kod ljudi su raznovrsni, ali se, prema mehanizmu, svi mogu podeliti na endogene i egzogene. Endogeni mehanizmi predstavljaju greške ili poremećaje ravnoteže u unutrašnjim procesima. Egzogeni patološki mehanizmi (infektivni ili toksični) izazvani su patogenima, koji mogu biti biološki (prioni, virusi, bakterije, gljive i paraziti), hemijski (toksini) ili fizički (zračenje). Oportunistički patogeni izazivaju bolest samo kada je zdravstveno stanje domaćina već narušeno (na primer, gljivična pneumonija kod osoba sa sindromom stečene imunodeficijencije, SIDA), a nediskriminišući patogeni dovode do bolesti i kod zdravih pojedinaca (na primer, visoki nivoi radijacije).

Infektivne bolesti se geografski šire sve brže, zbog povećanog broja putnika i promena klimatskih faktora. Pored bržeg širenja postojećih bolesti, primećuje se i pojava novih oboljenja. Svake godine identifikuje se u proseku jedna nova infektivna bolest.<sup>1</sup> Usled učestale pojave rezistencije, otežano je lečenje, pa se kod infekcija izazvanih biološkim patogenima povećava smrtnost. Zbog toga je svetska zdravstvena organizacija (WHO – eng. World Health Organization) identifikovala infektivne bolesti kao najveći problem za globalno zdravlje. Stoga je neophodno stalno pronalaženje novih lekova za lečenje infekcija koje izazivaju bakterije i gljive.<sup>2</sup>

### 2.1. Antibakterijski lekovi<sup>3</sup>

Razlike u strukturi i biohemijskim procesima između organizma domaćina i egzogenog patogena omogućavaju razvoj uspešnih lekova. Veliki uspeh antibiotika u lečenju bakterijskih infekcija posledica je njihove selektivnosti prema bakterijskoj ćeliji u odnosu na ćeliju domaćina. Prema građi ćelije, svi organizmi se mogu podeliti na prokariotske i eukariotske (slika 1). Bakterije su prokariotski, a životinje eukariotski organizmi. Bakterijska ćelija je mnogo jednostavnije strukture – nema definisano jedro i ne sadrži organele. Biohemijski procesi ove dve vrste ćelija se takođe značajno razlikuju. Na primer, bakterija mora da sintetiše vitamine koje životinje unose preko hrane. Zbog toga bakterije imaju enzime koji katalizuju te reakcije. Bakterije imaju ćelijsku membranu i ćelijski zid, a životinjske ćelije imaju samo membranu. Ćelijski zid

štiti bakteriju od pucanja – lize, tako što sprečava širenje ćelije usled ulaska vode, izazvanog osmotskim pritiskom.

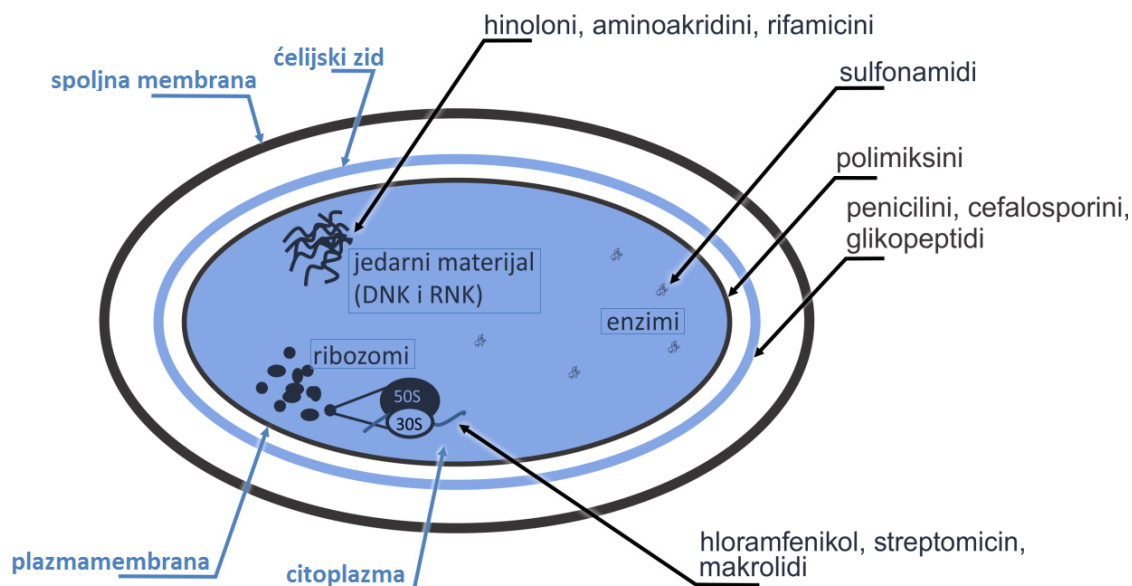


Slika 1. Klasifikacija žmog sveta<sup>4</sup>

Bakterije se klasifikuju kao Gram-pozitivne ili Gram-negativne. Klasifikacija se vrši upotrebom standardizovane tehnike bojenja po Gramu (Hans Christian Gram, danski bakteriolog). Bakterije sa debljim ćelijskim zidom (20 – 40 nm), koje zadržavaju purpurnu boju (*eng.* crystal violet), definišu se kao Gram-pozitivne. Boja koju apsorbuje tanak ćelijski zid (2 – 7 nm) lako se spirira, a bakterije koje se obezbojavaju na ovaj način zovu se Gram-negativne. Iako Gram-negativne bakterije imaju tanak ćelijski zid, one poseduju dodatnu spoljnu membranu, sastavljenu od lipopolisaharida. Ove razlike u građi ćelijskog zida i spoljne membrane dovode do različite osetljivosti ove dve velike grupe bakterija na antibakterijske lekove.

### 2.1.1. Mehanizmi antibakterijskog dejstva

Različite klase antibakterijskih lekova imaju različite mehanizme dejstva. Postoji pet glavnih mehanizama dejstva, koji se zasnivaju na fundamentalnim strukturnim i biohemijskim osobinama bakterija (slika 2).

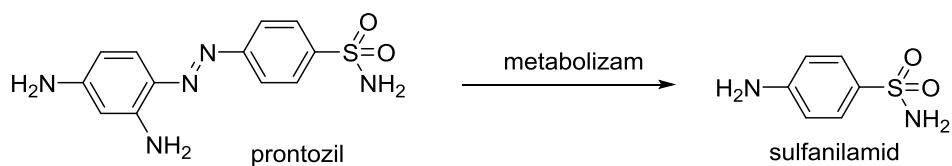


Slika 2. Bakterijska ćelija i glavne mete delovanja antibiotika<sup>3</sup>

### 2.1.1.1. Inhibicija ćelijskog metabolizma

Antibakterijski agensi koji inhibiraju ćelijski metabolizam zovu se antimetaboliti. Ovi agensi mogu da inhibiraju enzime koji katalizuju reakcije koje se odvijaju samo u bakterijskim ćelijama ili, ukoliko je enzim prisutan i u ćeliji organizma domaćina, pokazuju selektivnost prema bakterijskom enzimu.

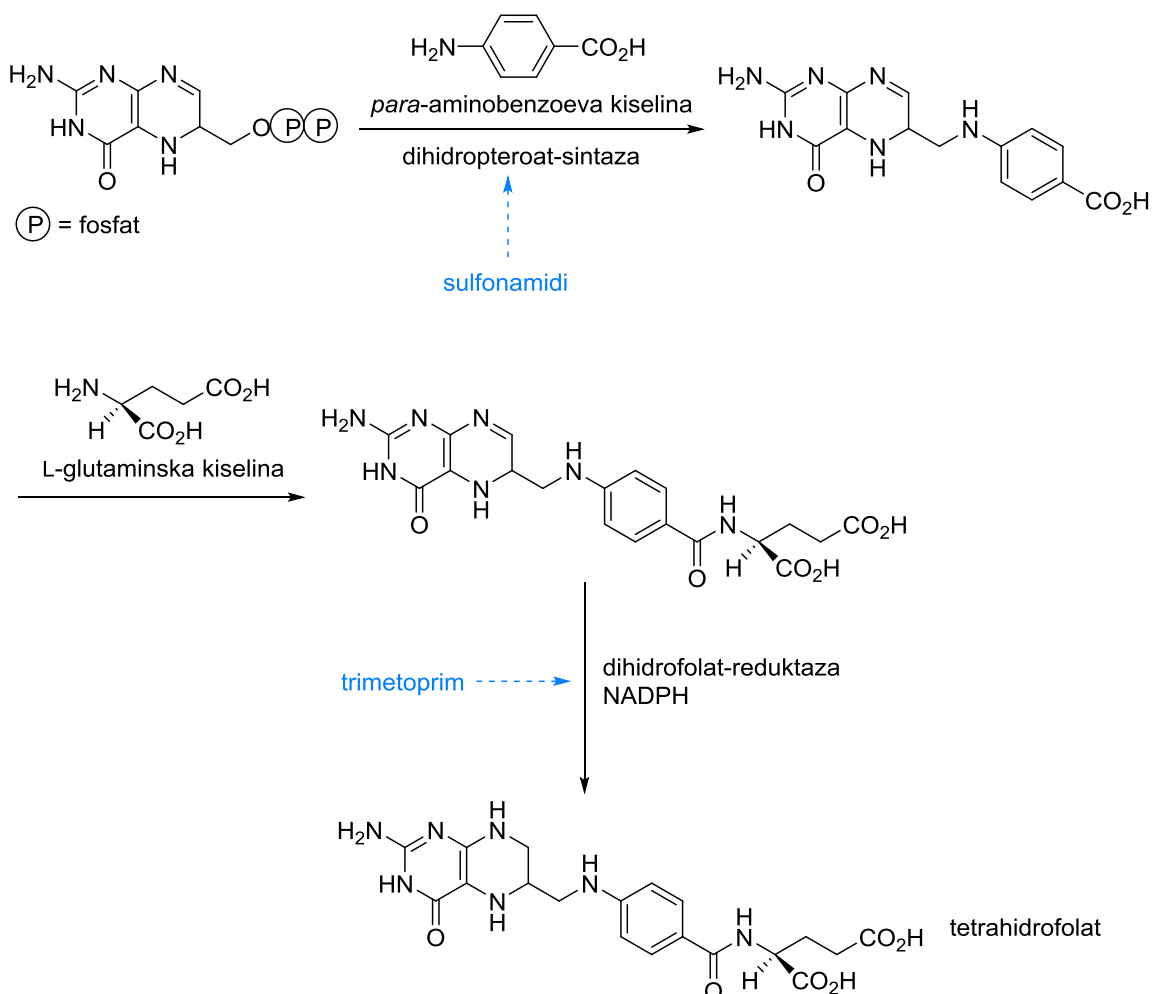
Najčešće upotrebljavani antimetaboliti su sulfonamidi ili sulfa-lekovi.<sup>5</sup> Još 1935 godine, primećeno je da prontosil (crvena boja) ima antibakterijsko dejstvo u *in vivo*, ali ne i *in vitro* uslovima. Ustanovljeno da je prontosil prolek – bakterije u tankom crevu metabolišu ovaj lek, proizvodeći ga u sulfanilamid, koji je aktivni oblik (šema 1).



Šema 1. Metabolizam prontosila

Sulfonamidi ne ubijaju bakterije, već sprečavaju njihov rast i deobu (bakteriostatici). Sulfa-lekovi sprečavaju biosintezu tetrahidrofolata, kofaktora koji daje jednu ugljeničnu jedinicu za sintezu pirimidinskih nukleinskih baza. Kada je

zaustavljena biosinteza pirimidinskih baza, neophodnih za sintezu DNK, ćelija ne može da se deli. Ovi lekovi su kompetitivni inhibitori dihidropteroat-sintaze, jednog od enzima uključenih u biosintezu enzima. Vezivanje sulfonamida za enzim, sprečava vezivanje prirodnog supstrata, *p*-aminobenzojeve kiseline (šema 2). Sulfonamidi se danas koriste protiv infekcija urinarnog trakta, kože i sluzokože.

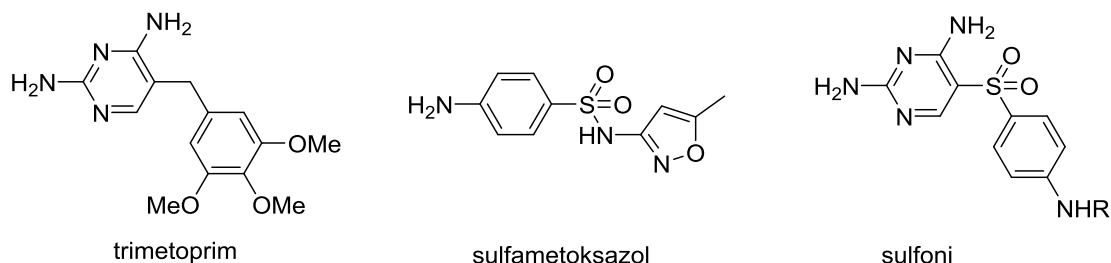


Šema 2. Mehanizam dejstva sulfonamida

Još jedan antimetabolit koji se primenjuje u kliničkoj praksi je trimetoprim.<sup>5</sup> Ovaj lek inhibira dihidrofolat-reduktazu, enzim koji takođe učestvuje u biosintezi tetrahidrofolata. Često se primenjuje u formulaciji zajedno sa sulfametoksazolom (u Srbiji, trgovačko ime je Bactrim<sup>®</sup>). Imajući u vidu da oba jedinjenja inhibiraju isti biosintetički put, ovakav pristup u lečenju omogućava da se lekovi primenjuju u manjim



dozama. Sulfoni su najznačajniji lekovi za tretman lepre, a smatra se da imaju isti mehanizam dejstva kao sulfa-lekovi.

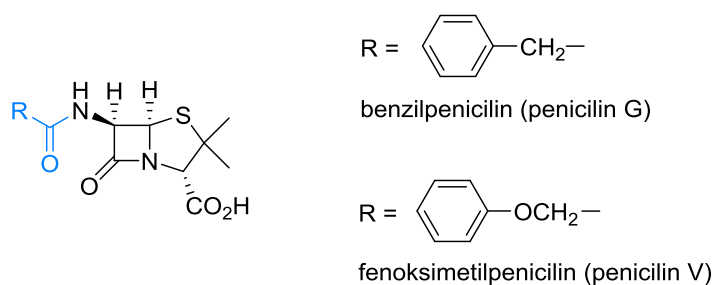


Slika 3. Primeri antimetabolita u kliničkoj praksi

### 2.1.1.2. Inhibicija biosinteze ćelijskog zida

Fleming je, 1928. godine, primetio da su bakterije u kulturi zaraženoj fungalnolom kolonijom vrste *Penicillium* počele da umiru. On je ispravno zaključio da gljivice proizvode jedinjenje koje pokazuje antibakterijsku aktivnost.<sup>6</sup> Problem izolovanja većih količina penicilina rešen je 1938. godine, a od 1944. godine ova klasa lekova se koristi u medicini.<sup>7</sup>

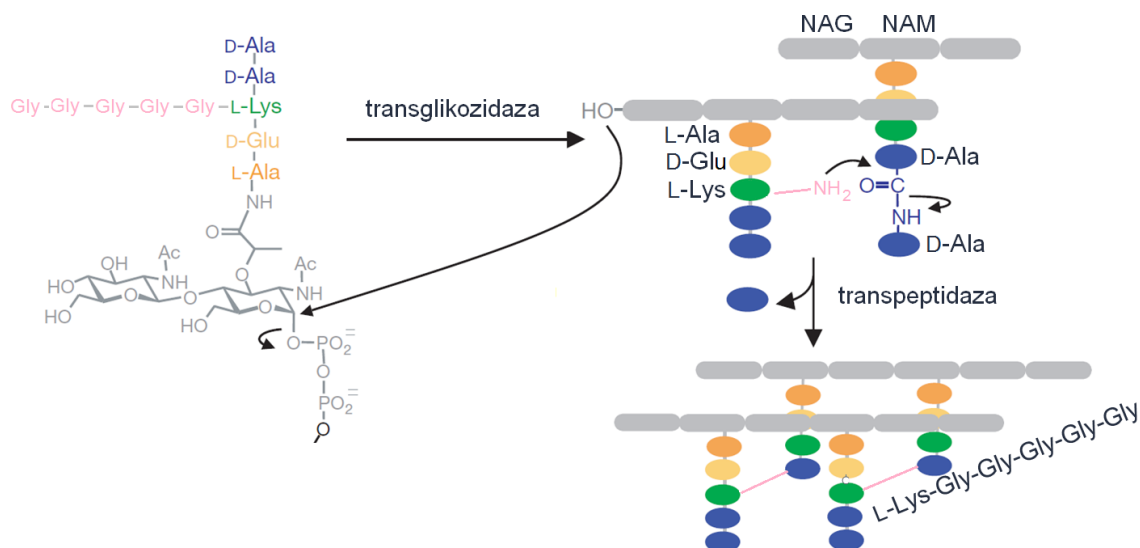
Penicilini sadrže  $\beta$ -laktam kondenzovan sa tiazolidinom (slika 4). Struktura alkanoil-grupe (RCO-) zavisi od sastava fermentacione podloge.



Slika 4. Struktura penicilina

Ćelijski zid je peptidoglikanske strukture i sastoji se od paralelnih nizova šećernog skeleta sa naizmenično povezanim jedinicama *N*-acetilmuraminske kiseline (NAM) i *N*-glukozamina (NAG). Peptidni nizovi vezani su za NAM šećere. U poslednjem koraku biosinteze, peptidni nizovi se povezuju zamenom D-alanina jednog

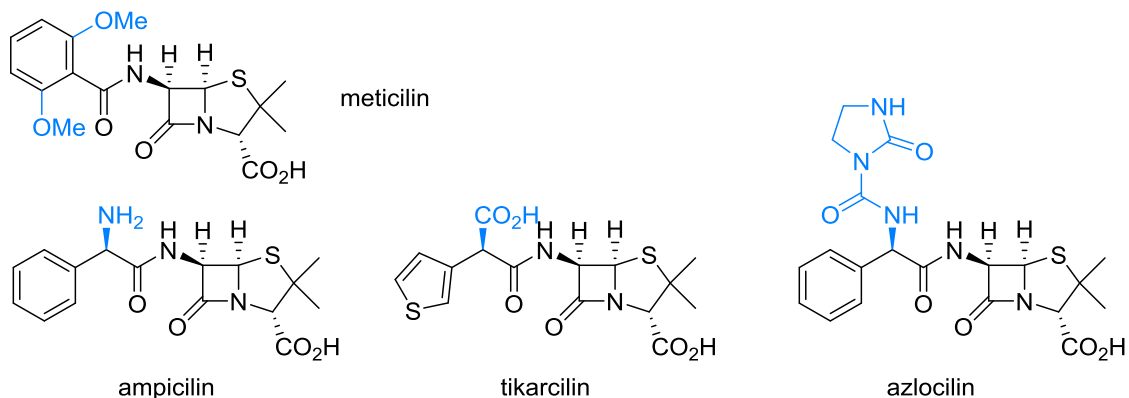
niza glicinom drugog niza (slika 5). Penicilin inhibira enzim transpeptidazu, koji katalizuje ovaj korak.



Slika 5. Peptidoglikanska struktura bakterijskog ćelijskog zida<sup>8</sup>

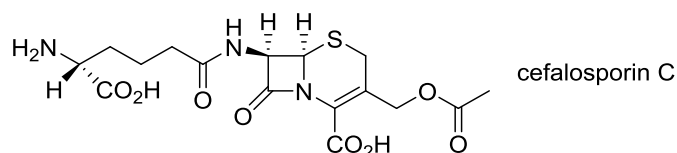
Penicilin ima konformaciju sličnu konformaciji D-Ala-D-Ala strukturnog motiva, pa se zato vezuje za aktivno mesto enzima. Nukleofilni napad kiseonikovog atoma serina iz aktivnog mesta enzima na ugljenikov atom  $\beta$ -laktamskog prstena penicilina, dovodi do kovalentnog vezivanja leka.

Benzoksipenicilin je aktivan protiv velikog broja infekcija izazvanih Gram-pozitivnim bakterijama i kod većine pacijenata ne izaziva neželjena dejstva. Ne može da se primenjuje oralno, jer u kiselim uslovima u želucu dolazi do hidrolize  $\beta$ -laktama. Ima uzak spektar dejstva, jer nije efikasan protiv većine Gram-negativnih bakterija, kao ni protiv Gram-pozitivnih bakterija koje proizvode enzime  $\beta$ -laktamaze.<sup>9</sup> Fenoksimetilpenicilin primenjuje se kod infekcija gornjih respiratornih puteva izazvanih osetljivim bakterijama. Problem osetljivosti penicilina na  $\beta$ -laktamaze rešen je strategijom sternog štita. Meticilin je primer leka kod koga je primenjena ova strategija. Uvođenjem voluminoznijih grupa na bočni alkanoil-niz, onemogućen je prilaz aktivnom mestu enzima. Efikasnost protiv Gram-negativnih bakterija povećana je uvođenjem hidrofilnih grupa na  $\alpha$ -ugljenikov atom alkanoil-grupe. Na ovaj način, dobijeni su aminopenicilini, karboksipenicilini i ureidopenicilini.



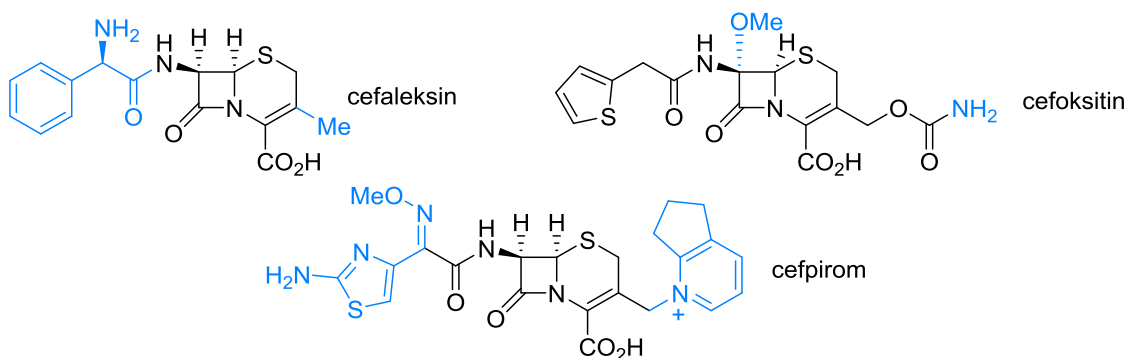
Slika 6. Značajni penicilini u kliničkoj praksi

Druga velika grupa  $\beta$ -laktamskih antibiotika su cefalosporini. Prvi predstavnik, cefalosporin C, izolovan je sredinom četrdesetih godina dvadesetog veka iz gljivične kulture sa italijanskog ostrva Sardinija.<sup>10</sup>



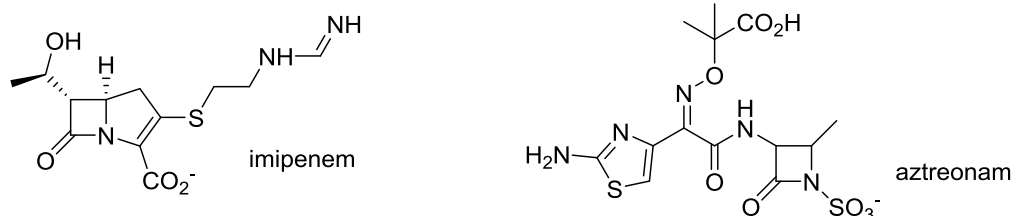
Slika 7. Struktura cefalosporina C

Cefalosporin C je 1000 puta manje aktivan od penicilina G, ali je efikasniji protiv Gram-negativnih bakterija i otporniji je na  $\beta$ -laktamaze. On je poslužio kao vodeća struktura za razvoj nekoliko generacija cefalosporina, sa očuvanim spektrom dejstva, a povećanom aktivnošću (slika 8). Cefalosporini su efikasni antibiotici širokog spektra, koji se koriste za lečenje meningitisa, sepse, peritonitisa, respiratornih i urinarnih infekcija.



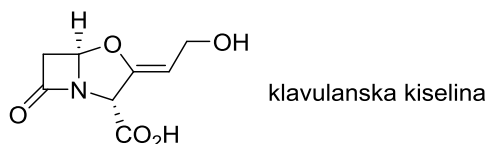
Slika 8. Struktura cefalosporina prve, druge i četvrte generacije

Druge značajne klase  $\beta$ -laktamskih antibiotika su karbapenemi i monobaktami. Imipenem, predstavnik karbapenema, je antibiotik poslednje linije odbrane protiv multirezistentnih bakterija.



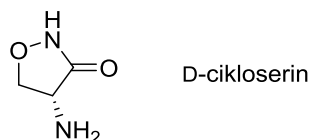
Slika 9. Predstavnici klasa karbapenema i monobaktama

U kombinaciji sa  $\beta$ -laktamskim antibioticima, često se primenjuju inhibitori  $\beta$ -laktamaza, kao što je klavulanska kiselina.<sup>3</sup>



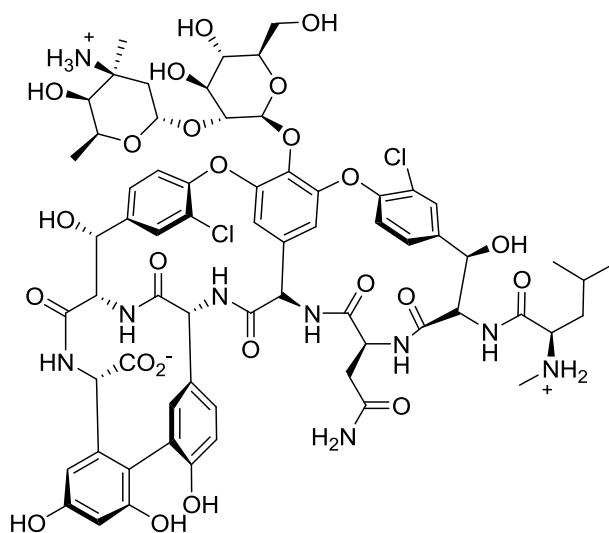
Slika 10. Struktura klavulanske kiseline

Antibakterijski agensi bacitracin, D-cikloserin i vankomicin takođe inhibiraju biosintezu ćelijskog zida u različitim fazama. Bacitracin je polipeptidni kompleks koji se vezuje za lipidni nosač odgovoran za prenos NAM-pentapeptidne jedinice kroz ćelijsku membranu. Koristi se topikalno, za lečenje kožnih infekcija. Jednostavni molekul D-cikloserin deluje u citoplazmi, sprečavajući formiranje dipeptida D-Ala-D-Ala. On onemogućava racemizaciju L-alanina inhibiranjem enzima L-alanin-racemaze. Primenjuje se oralno u kombinaciji sa drugim lekovima za lečenje tuberkuloze.



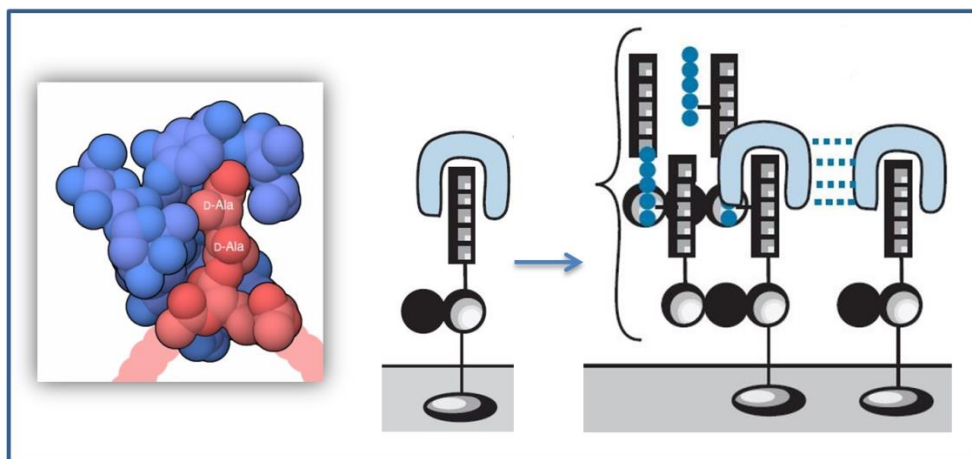
Slika 11. Struktura D-cikloserina

Vankomicin je baktericidni glikopeptid, aktivan protiv Gram-pozitivnih bakterija. Izolovan je iz bakterije *Amycolatopsis orientalis*, pronađene u Borneu i Indiji. Molekul ima složenu strukturu. Osnovu strukture čini heptapeptidni skelet, koji sadrži pet aromatičnih aminokiselinskih ostataka. Oni se, u procesu biosinteze, međusobno povezuju reakcijama oksidativnog kuplovanja, čineći strukturu rigidnom. Molekul sadrži i dva šećerna ostatka.



Slika 12. Struktura vankomicina

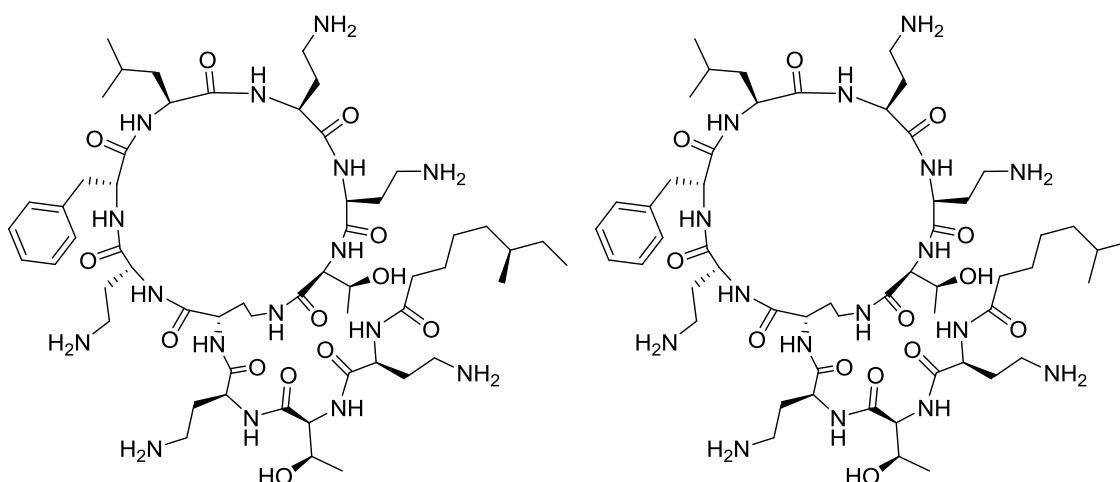
Rigidna struktura molekula važna je za jedinstven mehanizam dejstva. Vankomicin inhibira sintezu ćelijskog zida nekovalentnim vezivanjem za dva D-alanina u prekursoru. Zatim dolazi do dimerizacije, tako što se ostvaruju vodonične veze između heptapeptidnih delova strukture vankomicina. Na ovaj način, sterno se blokira prilaz enzima transpeptidaze. Vankomicin se primenjuje za lečenje infekcija izazvanih Gram-pozitivnim bakterijama rezistentnim na većinu drugih antibiotika.<sup>11</sup>



Slika 13. Mehanizam dejstva vankomicina<sup>3</sup>

### 2.1.1.3. Narušavanje strukture plazmamembrane

Polimiksin B je ciklični polipeptidni antibiotik, koji se izoluje iz bakterije *Bacillus polymyxa*.<sup>12</sup> Aktivan je protiv Gram-negativnih bakterija i u fiziološkim uslovima je višestruko protonovan. On narušava strukturu ćelijske membrane i uzrokuje curenje (izlazak) malih molekula, kao što su nukleozidi, iz ćelije. Primenjuje se intramuskularno, protiv infekcija uzrokovanih *Pseudomonas* vrstama koje su otporne na druge antibiotike, ili topikalno<sup>i</sup>, protiv infekcija kože i oka.

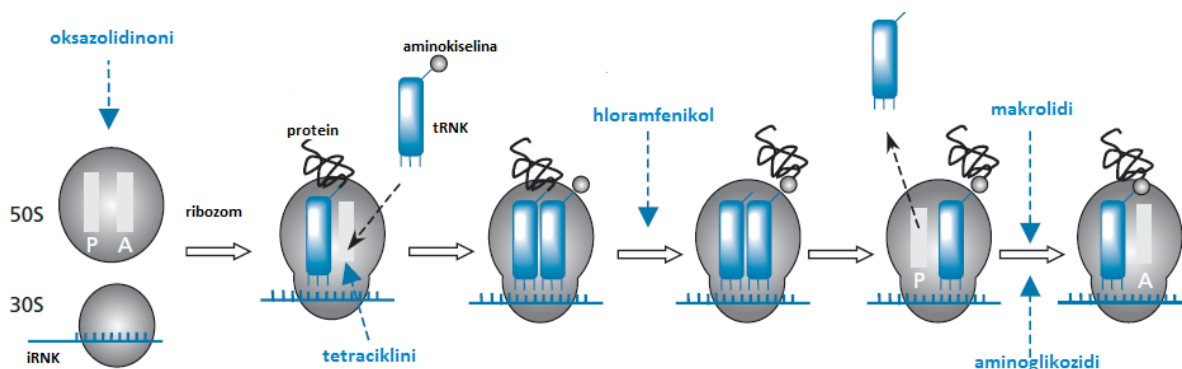


Slika 14. Struktura polimiksina B

<sup>i</sup> Topikalni lek je lek koji se primenjuje na telesnim površinama kao što je koža ili sluzokoža.

#### 2.1.1.4. Ometanje sinteze proteina

Lekovi koji ometaju sintezu bakterijskih proteina vezuju se za ribosome i inhibiraju različite faze procesa bakterijske translacije (slika 15).

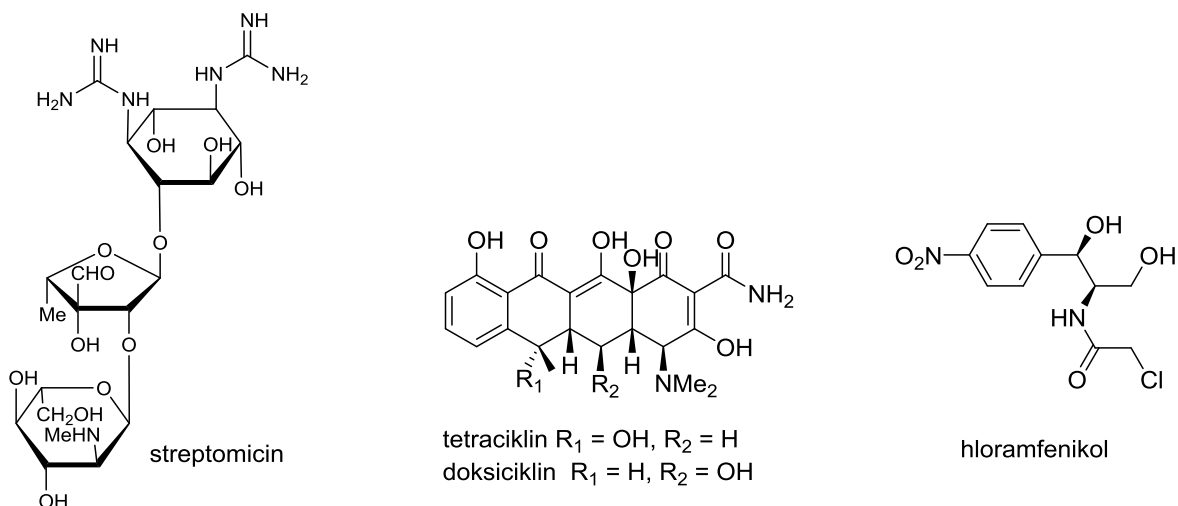


Slika 15. Sinteza proteina u bakterijskoj ćeliji

Streptomycin je izolovan 1944. godine iz mikroorganizma *Streptomyces griseus*.<sup>13</sup> Pripada aminoglikozidima, antibioticima šećerne strukture, koji sadrže baze amino-grupe. Aminoglikozidi se vezuju za 30S podjedinicu ribozoma i sprečavaju kretanje ribozoma duž niza informacione RNK, tako da tripletni kod iRNK ne može da se pročita i sinteza proteina se zaustavlja. U nekim slučajevima, skraćeni proteini dospevaju do ćelijske membrane, što povećava permeabilnost. Streptomycin je bio prvi lek koji se koristio u lečenju tuberkuloze. Zbog razvoja rezistencije, danas je zamenjen drugim lekovima, ali se i dalje koristi za lečenje bakterijskog endokarditisa.

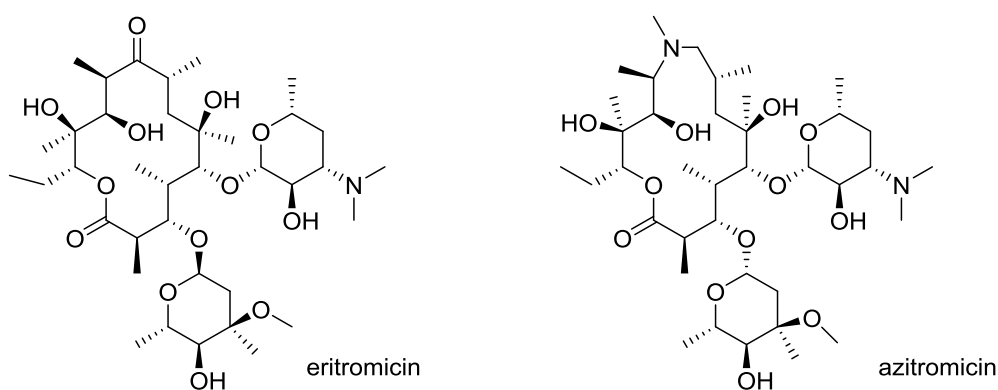
Tetraciklini su bakteriostatici širokog spektra dejstva. Oni inhibiraju sintezu proteina vezivanjem za 30S podjedinicu ribozoma, sprečavajući tako vezivanje aminoacil-tRNK. Tetraciklin i doksiciklin su najkorišćeniji antibiotici posle penicilina. Aktivni su protiv Gram-pozitivnih i Gram-negativnih bakterija. Koriste se za lečenje respiratornih i genitalnih infekcija, Lajmske bolesti i akni.

Hloramfenikol je prirodni proizvod, ali se danas u farmaceutskoj industriji dobija sintetičkim putem. Vezuje se za 50S podjedinicu ribozoma. Smatra se da inhibira reakciju peptidil-transfera, kojom se produžava peptidni niz. Hloramfenikol je antibiotik širokog spektra dejstva, a najčešće se upotrebljava za lečenje infekcija oka.



Slika 16. Strukture nekih lekova koji inhibiraju sintezu proteina kod bakterija

Eritromicin je prvi predstavnik klase makrolidnih antibiotika. Izolovan je 1952. godine, iz mikroorganizma *Saccharopolyspora erythraea*, danas *Streptomyces erythreus*.<sup>14</sup> On sadrži četrnaestočlani makrociklični lakton i dva monosaharida. Ovaj antibiotik ostvaruje aktivnost tako što se vezuje za 50S podjedinicu bakterijskog ribozoma i inhibira translokaciju. Eritromicin ima spektar dejstva sličan penicilinu i najčešće se koristi kod pacijenata sa alergijom na peniciline. Azitromicin je petnaestočlani makrociklični molekul, koji sadrži azot u prstenu. Jedan je od najprodavanijih lekova. U poređenju sa eritromicinom, azitromicin je manje aktivan protiv Gram-pozitivnih, a aktivniji protiv Gram-negativnih bakterija.

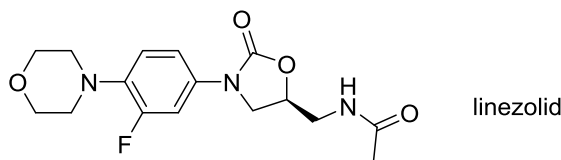


Slika 17. Strukture značajnih makrolidnih molekula

Oksazolidinoni su sintetički antibiotici i jedna su od najmlađih klasa antibiotika u kliničkoj upotrebi. Inhibiraju sintezu proteina u najranijoj fazi – vezuju se za 50S



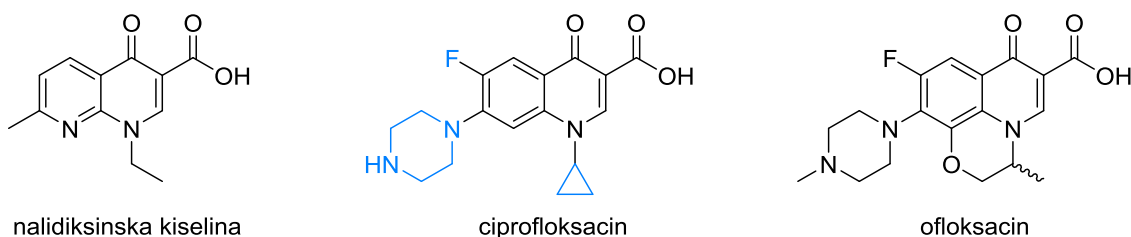
podjedinicu ribozoma pre nego što se ona veže za 30S podjedinicu i sprečavaju nastajanje 70S ribozoma, pa translacija ne može da počne.<sup>15</sup> Najznačajniji predstavnik klase je linezolid, aktivan protiv većine klinički značajnih Gram-pozitivnih bakterija.



Slika 18. Struktura linezolida

#### 2.1.1.5. Ometanje transkripcije i replikacije nukleinskih kiselina

Hinoloni i fluorohinoloni inhibiraju replikaciju i transkripciju bakterijske DNK tako što stabilizuju kompleks DNK i topozomeraza, enzima koji sprečavaju da se dugi nizovi nukleinskih kiselina upetljaju. Prvi klinički značajan hinolon bila je nalidiksinska kiselina, sintetisana 1962. godine. Aktivna je protiv Gram-negativnih bakterija i primenjuje se za lečenje jednostavnih urinarnih infekcija. Uvođenje atoma fluora u položaj 6 aromatičnog jezgra proširuje spektar aktivnosti. Daljim modifikacijama, dobijen je ciprofloksacin, lek koji najveću aktivnost ispoljava prema Gram-negativnim bakterijama. Fluorohinoloni treće generacije, kao što je ofloksacin, pokazuju aktivnost i prema Gram-pozitivnim bakterijama.<sup>16</sup>



Slika 19. Strukture značajnih hinolona i fluorohinolona

Rifampicin je semisintetički antibiotik dobijen iz rifamicina B – antibiotika izolovanog 1957. godine iz mikroorganizma *Amycolatopsis rifamycinica*.<sup>17</sup> Aktivan je protiv Gram-pozitivnih bakterija, a aktivnost ostvaruje nekovalentnim vezivanjem za DNK-zavisnu RNK-polimerazu, čime sprečava početak sinteze RNK. Upotrebljava se u



## 2.2. Antifungalni lekovi

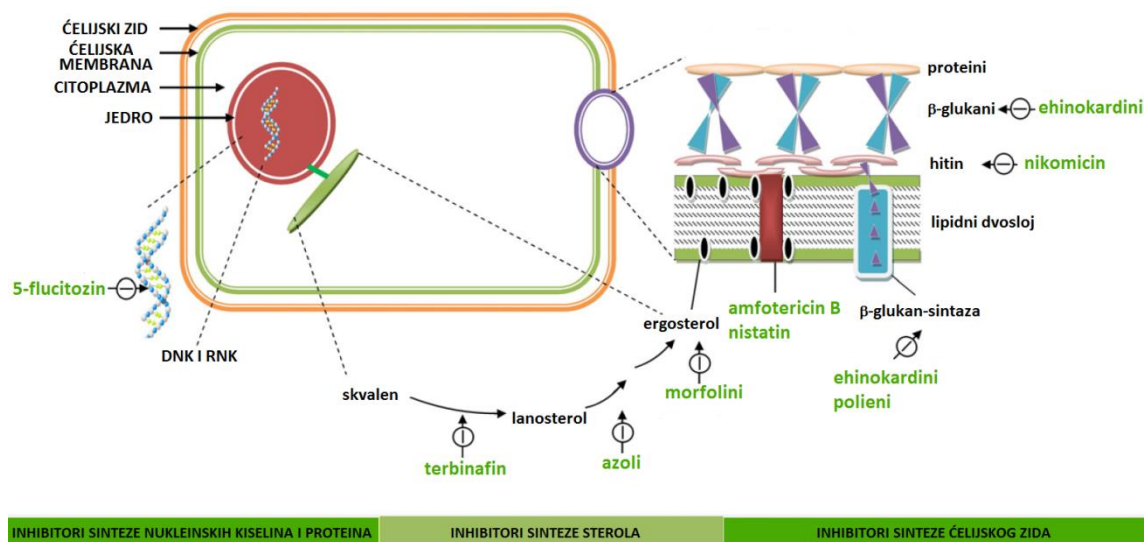
Gljive su jednostavni eukariotski organizmi, koji mogu biti jednoćelijski (kvasci i buđi) ili višećelijski. Ranije se smatralo da pripadaju carstvu biljaka, jer su sesilne i apsorbiraju hranjive materije. Međutim, istraživanja na nivou molekula i gena pokazala su da gljive imaju bližeg zajedničkog pretka sa životinjama nego sa biljkama. Carstvo gljiva (*Fungi*) i carstvo životinja (*Animalia*) pripadaju zajedničkoj evolutivnoj grani *Opisthokont* (slika 1).

Gljive su veoma bitne za normalno funkcionisanje biosfere. Bez njih ne bi bilo moguće biogeohemijsko kruženje ugljenika u prirodi, jer su primarni razlagači organske materije. Mnogi industrijski procesi zasnivaju se na korišćenju metabolizma gljiva (proizvodnja antibiotika i drugih lekova, alkoholnih pića, biogoriva, enzima, vitamina).<sup>18</sup> Veliki broj gljiva živi u simbiotskoj zajednici sa čovekom ili je prisutan u njegovoj okolini. Međutim, gljive mogu predstavljati i ozbiljnu pretnju po ljudsko zdravlje. Gljivične infekcije mogu biti alergijske reakcije na fungalne proteine, reakcije na toksine prisutne u nekim gljivama i prave infekcije (mikoze). Od 1970. godine, beleži se stalni porast broja teških gljivičnih infekcija. Jedan od faktora koji je značajno uticao na to je rasprostranjena upotreba antibiotika širokog spektra, koji eliminišu bakterije odgovorne za sprečavanje prekomernog razmnožavanja gljiva. Drugi faktor je povećanje broja osoba sa smanjenim imunim odgovorom zbog sindroma stečene imunodeficijencije, upotrebe imunosupresiva ili antitumorskih hemioterapeutskih agenasa.<sup>19</sup> Najčešći gljivični patogen kod ljudi je *Candida albicans*, koja kod zdravih ljudi naseljava oralnu šupljinu i gastrointestinalni trakt. Drugi česti patogeni *Candida* vrsta su *C. glabrata*, *C. parapsilosis* i *C. krusei*. Od sporadичnih slučajeva gljivičnih oboljenja pre trideset godina, invazivna kandidijaza postala je četvrta najčešća infekcija krvi u SAD i Evropi,<sup>20</sup> a stopa smrtnosti je veoma visoka, oko 40 %.<sup>21</sup> Ovi podaci ukazuju da je neophodno pronalaženje novih terapijskih opcija za borbu protiv gljivičnih infekcija.

### 2.2.1. Mehanizmi antifungalnog dejstva<sup>22,23</sup>

Gljivična i humana ćelija se značajno razlikuju. Gljive imaju ćelijski zid, a sastav plazmamembrane je bitno različit. Mnogi antifungalni lekovi deluju tako što

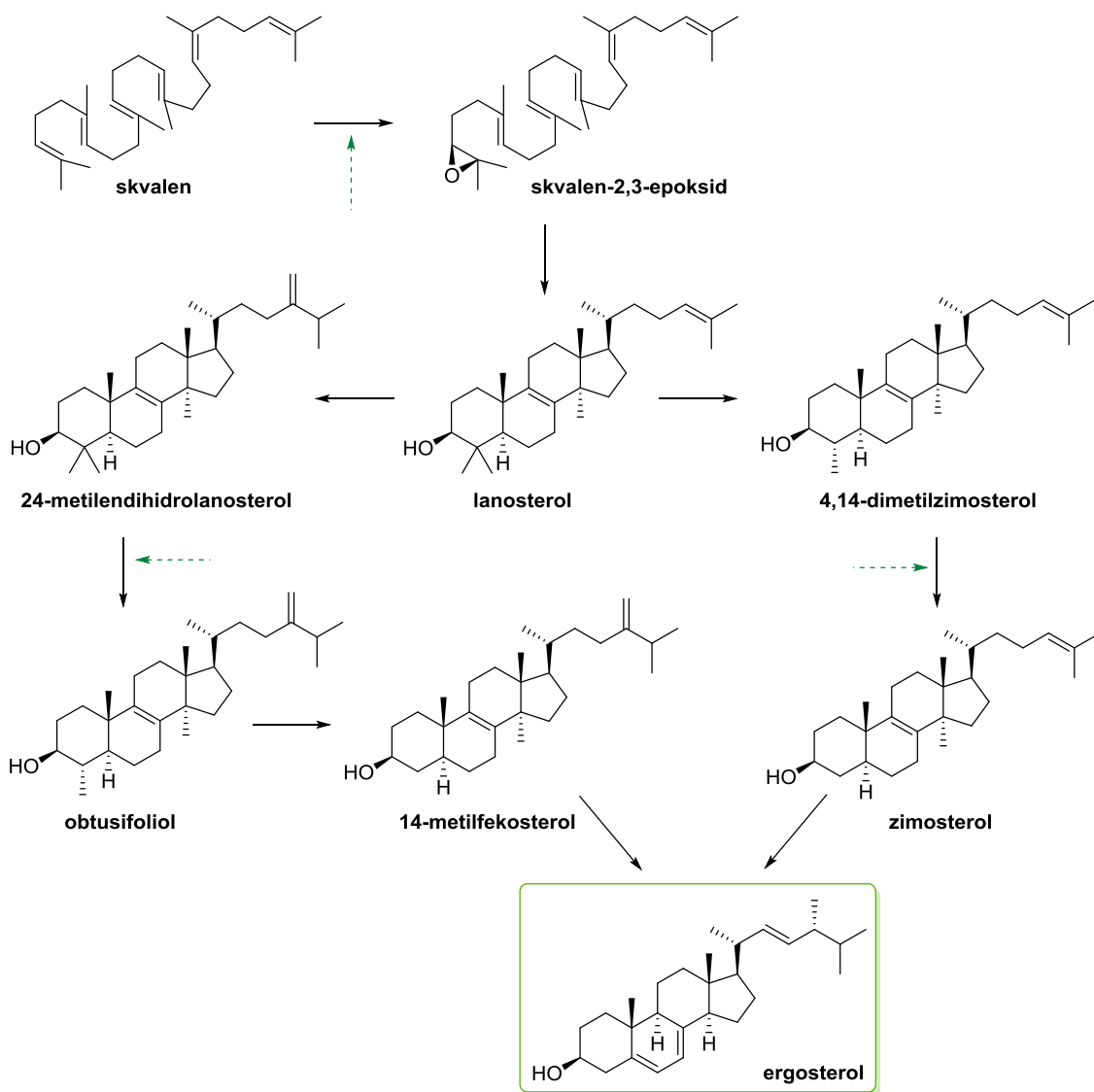
inhibiraju sintezu ili funkciju ergosterola, bitne komponente ćelijskog zida gljiva. Struktura fungalne ćelije i glavne mete dejstva antifungalnih lekova, predstavljene su na slici 21.



Slika 21. Mete delovanja antifungalnih jedinjenja<sup>23</sup>

### 2.2.1.1. Inhibicija sinteze i funkcije ergosterola

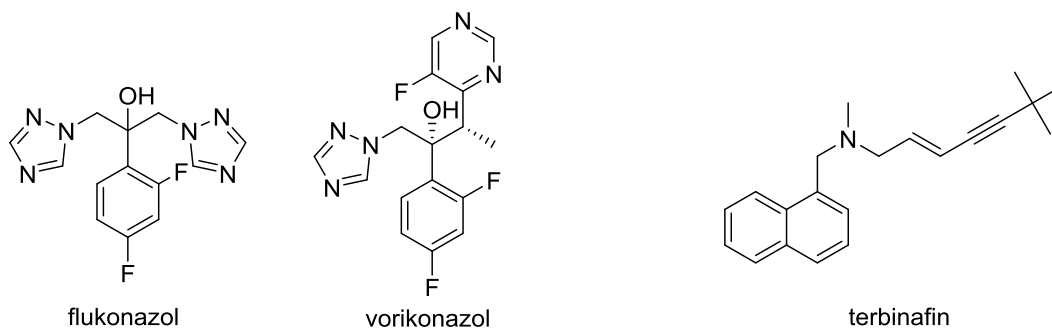
Ergosterol je jedna od osnovnih komponenti fungalne ćelijske membrane i ima sličnu funkciju kao holesterol u životinjskim ćelijama. On je bioregulator fluidnosti i integriteta membrane. Biosinteza ergosterola i mesta delovanja antifungalnih lekova, prikazani su na šemi 3.



Šema 3. Biosinteza ergosterola (zelene isprekidane strelice ukazuju na mesta delovanja inhibitora ergosterola)

Dve klase jedinjenja koja se nalaze u kliničkoj upotrebi inhibiraju sintezu ergosterola – azoli i alilamini. Da bi se očuvao integritet membrane, neohodno je da se u položajima C-4 i C-14 sterola ne nalaze metil-grupe. Azoli inhibiraju 14 $\alpha$ -demetilazu, pa dolazi do nagomilavanja prekursora ergosterola, što menja strukturu i funkciju plazmamembrane.<sup>24</sup> Flukonazol se uzima oralno, a efikasan je protiv kandidijaze i ozbiljnih kriptokokalnih infekcija. Vorikonazol je triazol druge generacije, aktivan protiv vrsta *Aspergillus*, *Fusarium* i *Candida* (uključujući i vrste rezistentne na flukonazol).

Alilamini inhibiraju skvalen-epoksidazu, jedan od enzima koji katalizuje prevođenje skvalena u lanosterol.<sup>25</sup> Terbinafin pokazuje aktivnost protiv vrsta *Aspergillus* i *Fusarium*, ali je manje aktivan protiv kvasaca.



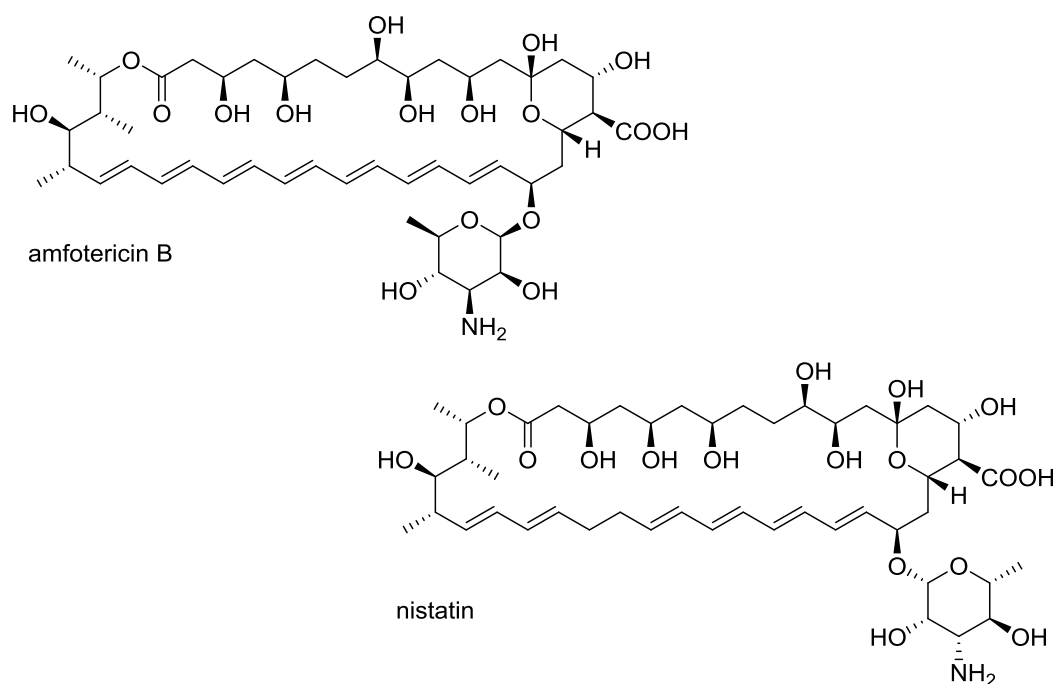
Slika 22. Predstavnicu azola i alilamina

Od pedesetih godina prošlog veka do otkrića azola, polienski antifungicidi predstavljali su standardnu terapiju sistemskih fungalnih infekcija. Polieni deluju tako što ostvaruju interakcije sa ergosterolom u membrani i formiraju jonske kanale (pore), kroz koje ističe ćelijski sadržaj.<sup>26</sup>



Slika 23. Mehanizam dejstva amfotericina B<sup>3</sup>

Amfotericin B je prirodni proizvod, izolovan iz bakterije *Streptomyces nodosus*.<sup>27</sup> Vezuje se deset puta jače za ergosterol nego za holesterol (sterol u membrani životinjskih ćelija), pa pokazuje selektivnost prema gljivičnim ćelijama. Iako ima veoma širok spektar dejstva i spada u najefikasnije antifungalne lekove, njegova klinička primena ograničena je uskim terapijskim prozorom<sup>ii</sup>. Nistatin, lek takođe izolovan iz bakterije (*S. nursei*), ne apsorbuje se iz digestivnog trakta, pa se koristi kao topikalni lek protiv oralne kandidijaze.



Slika 24. Strukture polienskih lekova

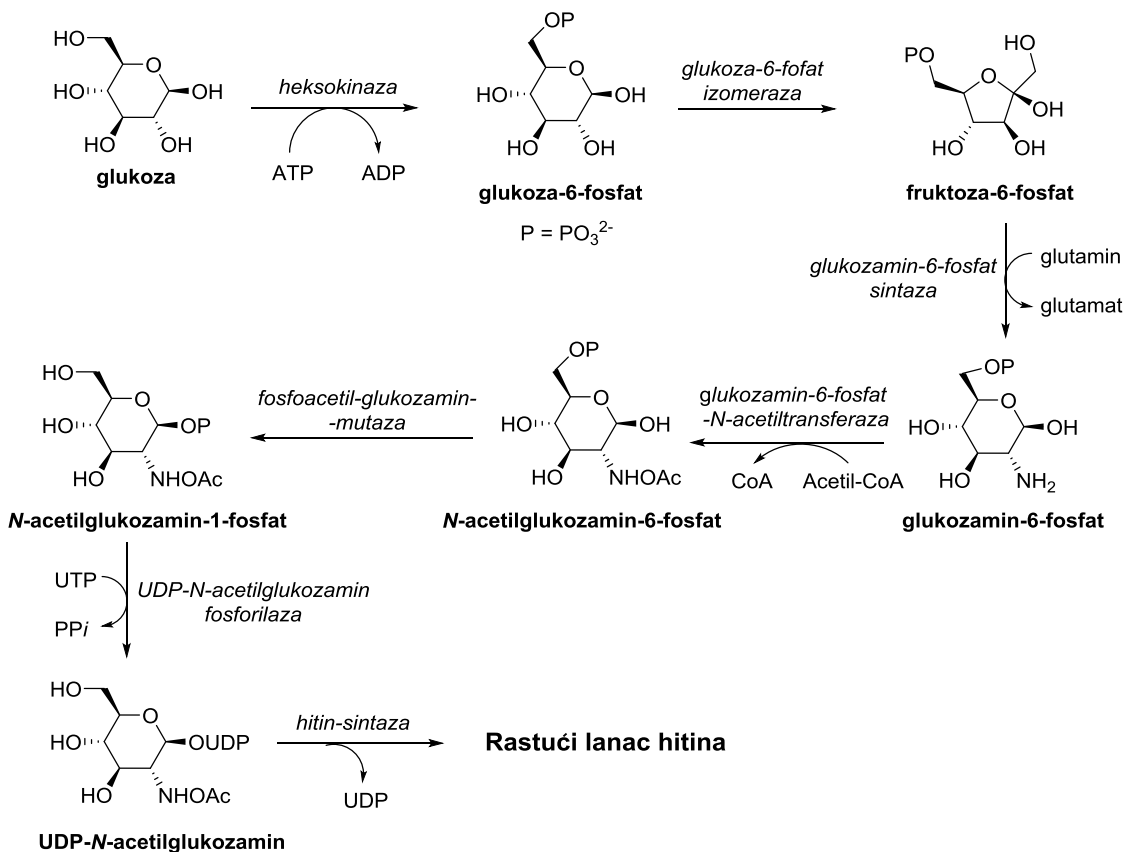
### 2.2.1.2. Narušavanje strukture ćelijskog zida

Ćelijski zid gljiva sadrži jedinjenja kao što su hitin,  $\alpha$ - i  $\beta$ -glukani i manani (glikoproteini na spoljnoj strani ćelijskog zida), koja su karakteristična za carstvo gljiva i nisu prisutna kod životinja. Zbog toga su ona dobra meta za delovanje antifungalnih lekova.

Hitin se sintetiše u plazmamembrani i sastoji se od linearnih nizova  $\beta$ -(1,4)-*N*-acetilglukozamina. Ključan je za održanje oblika ćelije, iako njegov udeo u zidu može biti samo 1%. Hitinski i glukanski slojevi ćelijskog zida su odvojeni, ali su kovalentno

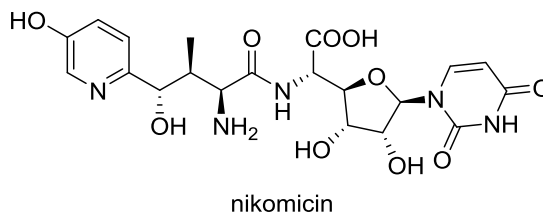
<sup>ii</sup> Terapeutski prozor je razlika između toksične doze leka i doze leka koja izaziva terapijski efekat.

povezani, što dodatno učvršćuje zid. Na šemi 4, prikazana je biosinteza hitina. Poslednji korak u sintezi je reakcija transglikozilovanja, u kojoj se *N*-acetilglukozaminska jedinica vezuje za rastući polimer. Reakcija je katalizovana enzimom hitin-sintazom, koji je meta nekoliko antifungalnih lekova (nikomicin i polioksini).



Šema 4. Biosinteza hitina<sup>28</sup>

Nikomicin je aktivan protiv fungalnih patogena čiji ćelijski zid sadrži veliki udeo hitina (*Coccidioides immitis*, *Blastomyces dermatitidis* i *Histoplasma capsulatum*). Slabo je aktivan protiv *C. albicans*.

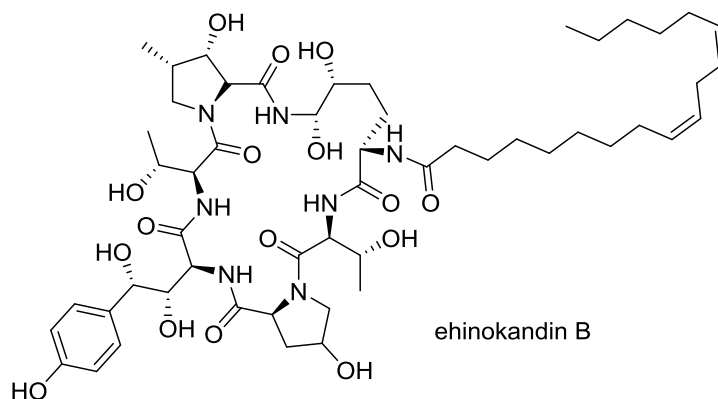


Slika 25. Struktura nikomicina



Glukani su polimeri glukoze. Kod  $\beta$ -glukana, koji obezbeđuju čvrstinu ćelijskog zida gljiva, monomeri glukoze povezani su  $\beta$ -(1,3)- i  $\beta$ -(1,6)-glikozidnom vezom. Jedinice glukoze kod  $\alpha$ -glukana, koji su deo matriksa, povezane su  $\alpha$ -(1,3)- i  $\alpha$ -(1,4)-glikozidnom vezom. Inhibitori sinteze glukana deluju kao inhibitori membranskog proteina  $\beta$ -(1,3)-glukan-sintaze. Inhibicija ovog enzima dovodi do osmotske nestabilnosti ćelijskog zida i ćelijske smrti.

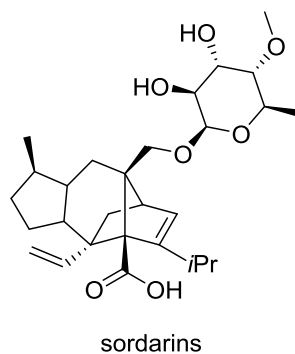
Ehinokandin B je lipopeptid, fermentacioni proizvod *Aspergillus nidulans*. Pokazuje fungicidnu aktivnost protiv *Candida* i *Aspergillus* vrsta. Zbog loše oralne bioraspoloživosti, primenjuje se intravenozno.



Slika 26. Struktura ehinokandina B

### 2.2.1.3. Inhibicija sinteze gljivičnih proteina

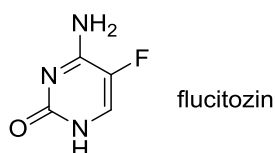
Sordarins je izolovan 1971. godine iz kulture *Sordaria araneosa*. Selektivni je inhibitor procesa translacije u gljivama.<sup>29</sup>



Slika 27. Struktura sordarinsa

#### 2.2.1.4. Inhibicija sinteze nukleinskih kiselina kod gljiva

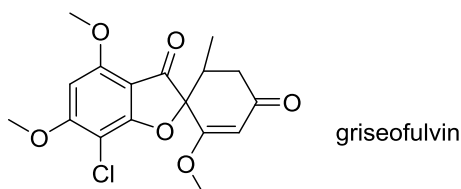
Flucitozin (5-fluorocitozin) je fluorovani pirimidin, koji deluje tako što inhibira sintezu nukleinskih kiselina. On ulazi u ćeliju pomoću enzima permeaze. U ćeliji se, pomoću citozin-deaminaze, prevodi u 5-fluoruracil, koji se zatim prevodi u 5-fluoruridilnu kiselinu. Ona se dalje fosforiluje i ugrađuje u strukturu RNK, što dovodi do prerane terminacije niza. Takođe, 5-fluoruracil se u ćeliji transformiše u 5-fluordeoksiuridin-monofosfat, inhibitor enzima timidilat-sintaze, koji učestvuje u sintezi DNK i ćelijskoj deobi.<sup>30</sup> Većina filamentoznih gljiva nema ove enzime, tako da je aktivnost flucitozina ograničena na patogene kvasce. Zbog brzog razvoja rezistencije, flucitozin se koristi u kombinaciji sa drugim lekovima.



Slika 28. Struktura flucitozina

#### 2.2.1.5. Inhibicija sinteze gljivičnih mikrotubula

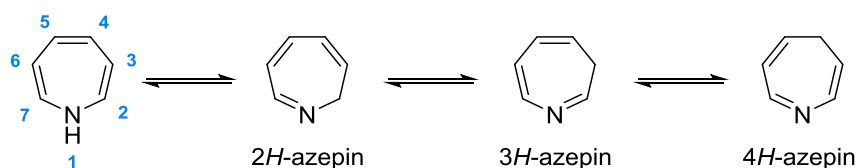
Mikrotubule su dinamički polimeri globularnih proteina  $\alpha$ - i  $\beta$ -tubulina. One grade visokoorganizovani ćelijski skelet u svim eukariotskim ćelijama, a učestvuju i u procesu razdvajanja hromozoma prilikom deobe ćelije. Svi poznati lekovi koji inhibiraju sintezu mikrotubula, uključujući i griseofulvin, vezuju se za  $\beta$ -tubulin, protein koji je veoma sličan kod svih eukariotskih organizama. Na taj način, sprečava se mitozu ćelije gljive. Griseofulvin pokazuje umerenu selektivnost prema fungalnim ćelijama, pa se, zbog mogućih toksičnih efekata, primenjuje samo za površinske infekcije kože.<sup>31</sup>



Slika 29. Struktura griseofulvina

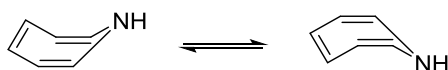
### 2.3. Azepini

Azepin je sedmočlano, nezasićeno heterociklično jedinjenje, sa jednim atomom azota u prstenu. Osnovni azacikloheptatrien, *1H*-azepin, je crveno ulje, nestabilno i na veoma niskim temperaturama. U prisustvu kiseline ili baze, lako prelazi u jedan od stabilnijih tautomera, *3H*-azepin (slika 30).<sup>32</sup>



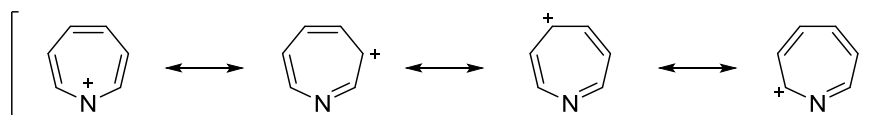
Slika 30. Tautomerni oblici azepina

Planarna konformacija ovog sedmočlanog heterocikličnog sistema uslovala bi da se elektronski par azota nađe u ravni sa trienskim delom strukture, obrazujući antiaromatični  $8\pi$ -elektronski sistem. Teorijski proračuni za *1H*-azepin pokazali su da on nije planaran molekul, već zauzima konformaciju lađe. Eksperimentalni dokazi za konformaciju sličnu lađi dobijeni su rendgenskom strukturnom analizom azepinskih derivata (slika 31).<sup>33</sup> Zbog ovakve konformacije, reaktivnost azepina slična je reaktivnosti acikličnih i homocikličnih poliena.<sup>34</sup>



Slika 31. Konformacija azepinskog prstena

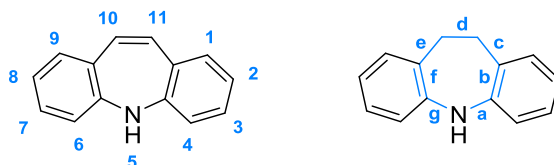
Za razliku od azepina, njegov katjon je aromatičan,  $6\pi$ -elektronski sistem.<sup>35</sup>



Slika 32. Katjon *1H*-azepina

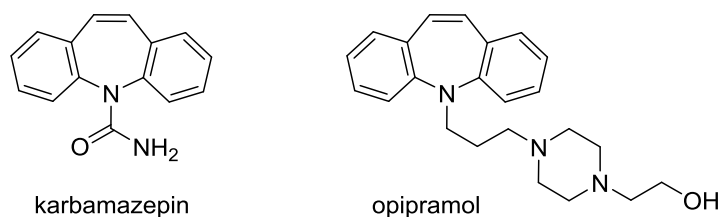
*5H*-Dibenzo[*b,f*]azepini su, zbog biološke aktivnosti, izuzetno važna klasa azepinskih derivata. Dibenzo[*b,f*]azepinski sistem poznat je od 1899. godine, kada su

Thiele i Holzinger sintetisali 10,11-dihidrodibenzo[*b,f*]azepin, kiselokatalizovanom ciklizacijom *o,o'*-diaminodibenzil-hidroklorida. Međutim, derivati ovog jezgra su tek sredinom sledećeg veka sintetisani i potpuno okarakterisani.<sup>36</sup>



Slika 33. Struktura 5*H*-dibenzo[*b,f*]azepina i 10,11-dihidrodibenzo[*b,f*]azepina

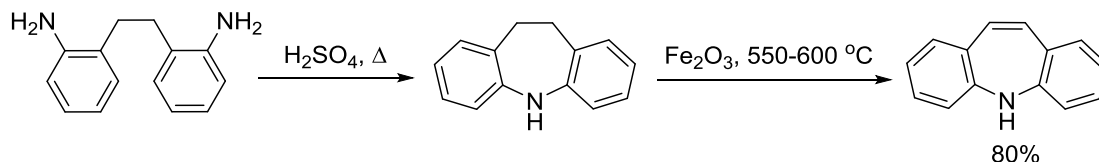
Triciklična 5*H*-dibenz[*b,f*]azepinska (iminostilbenska) podstruktura ulazi u sastav farmaceutski značajnih molekula karbamazepina i opipramola. Karbamazepin, predstavnik tricikličnih antidepresiva, odobren je od strane FDA 1968. godine za lečenje depresije. Osnovna primena opipramola je u terapiji anksioznih poremećaja.<sup>37,38</sup>



Slika 34. Struktura karbamazepina i opipramola

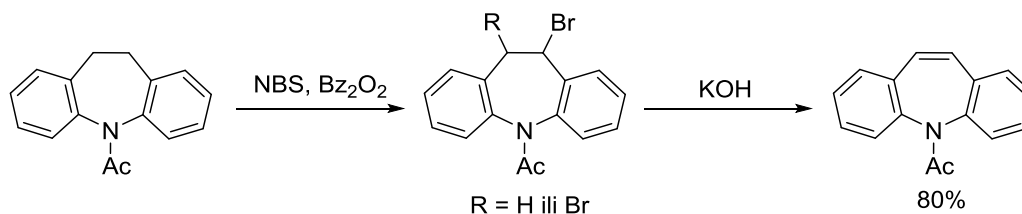
### 2.3.1. Sinteza dibenzo[*b,f*]azepina

Dobijanje dibenzo[*b,f*]azepina iz 10,11-dihidrodibenzo[*b,f*]azepina katalitičkom dehidrogenizacijom (šema 5), dugo je bio glavni način za sintezu ovog jedinjenja. Reakcija se odigrava u čeličnom reaktoru, na veoma visokoj temperaturi.<sup>39</sup> Iminodibenzilno jezgro dobija se zagrevanjem odgovarajućeg diamina u prisustvu polifosforne ili sumporne kiseline.<sup>36</sup>



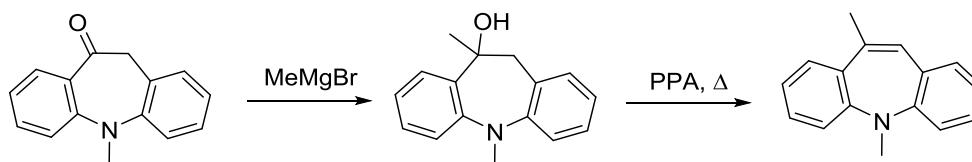
Šema 5

Dehidrobromovanje 10-bromiminobibenzila i 10,11-dibromiminobibenzila, daje azepinski derivat u dobrom prinosu (šema 6). Bromovanje benzilnog položaja 10,11-dihydrodibenzo[*b,f*]azepina postiže se reakcijom sa *N*-bromosukcinimidom (NBS) u prisustvu benzoil-peroksida, a eliminacija bromovodonika postiže se upotrebom baze.<sup>36</sup>



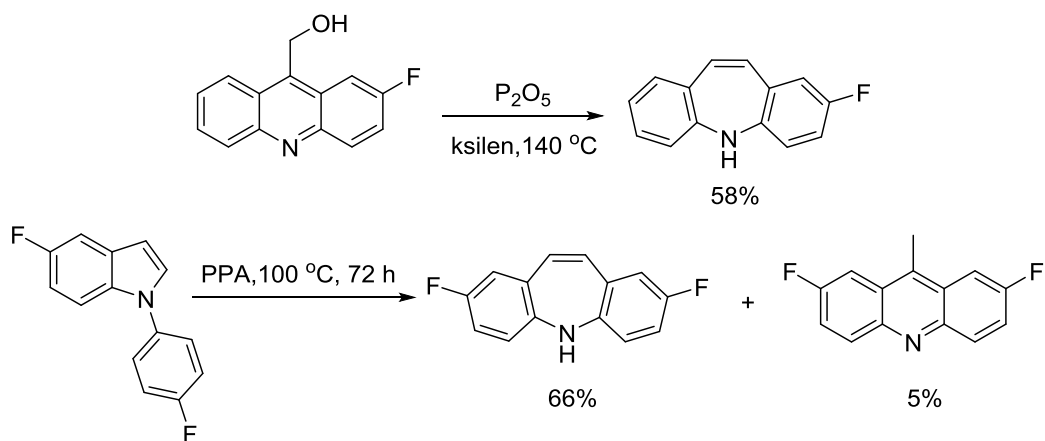
Šema 6

Kao polazni supstrati za sintezu 5,10-disupstituisanih iminostilbena, mogu se upotrebiti azepinoni. U prvom koraku, u reakciji sa Grignard-ovim reagensom, dobija se benzil-alkohol, koji se, dehidratacijom pomoću polifosforne kiseline (PPA) prevodi u *N*-supstituisani iminostilben.<sup>36</sup>



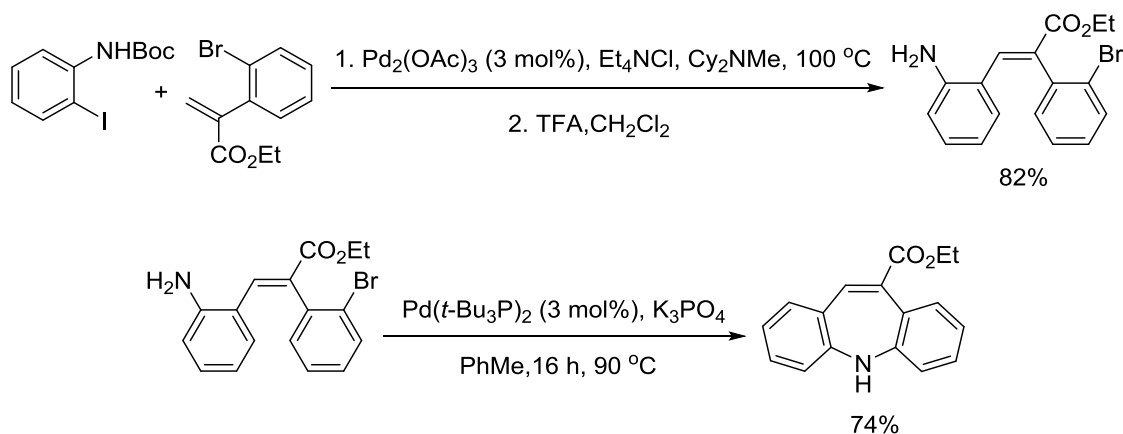
Šema 7

Poznato je nekoliko načina za sintezu dibenzo[*b,f*]azepinskih derivata, koji se zasnivaju na proširenju prstena. Wagner-Meerwein-ovo premeštanje 9-hidroksimetil-9,10-dihidroakridina<sup>40</sup> i kiselokatalizovano premeštanje 1-arilindola<sup>41</sup> upotrebljeni su u sintezi monofluor- i difluor-derivata iminostilbena.<sup>42</sup>



Šema 8

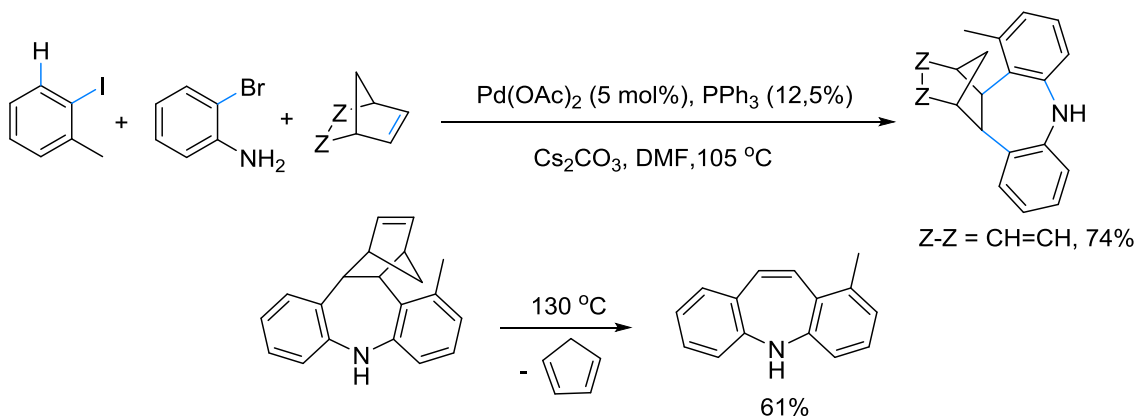
Prva sinteza derivata dibenzo[*b,f*]azepina u kojoj je upotrebljen katalizator na bazi paladijuma objavljena je 2004. godine. Heck-ovom reakcijom zaštićenog *o*-jodanilina i odgovarajućeg alkena, nastaje stilben. Posle deprotekcije anilina pomoću trifluorsirćetne kiseline, sedmočlani azepinski prsten zatvara se Buchwald-Hartwig-ovom reakcijom *N*-arilovanja.<sup>43</sup>



Šema 9

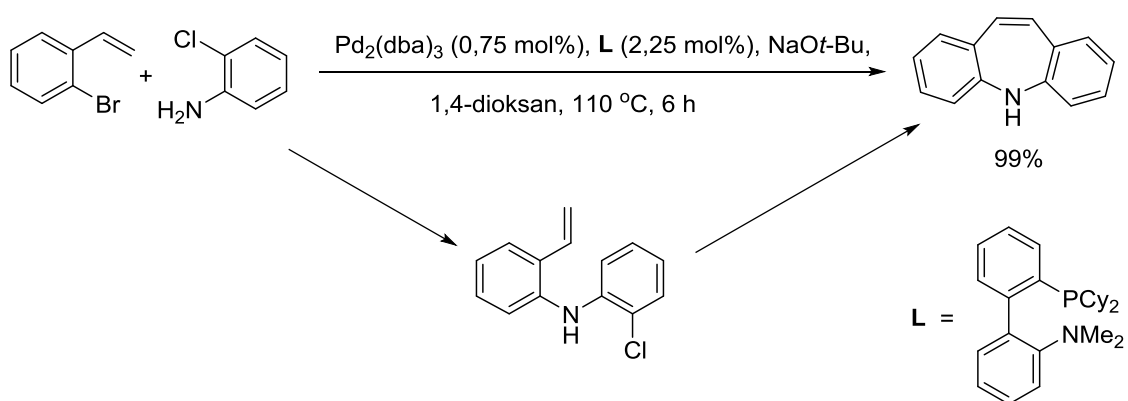
Opisana je i metoda za dobijanje derivata dibenzoazepina, polazeći od komercijalno dostupnih jodarena, *o*-bromanilina i norbornena ( $Z-Z = CH_2-CH_2$ ) ili norbornandiena ( $Z-Z = CH=CH$ ), pomoću paladijum-acetata kao izvora paladijuma. U jednom reakcionom koraku, dolazi do *N*-arilovanja i aril-norbornil kuplovanja (ili aril-norbornadienil kuplovanja). Kada se upotrebi norbornan, dobijaju se derivati dihidrodibenzoazepina, a kada se upotrebi norbornandien, na temperaturi 130 °C, dolazi

do retro-Diels-Alder-ove reakcije, izdvaja se ciklopentadien i nastaju derivati dibenzo[*b,f*]azepina.<sup>44</sup>



Šema 10

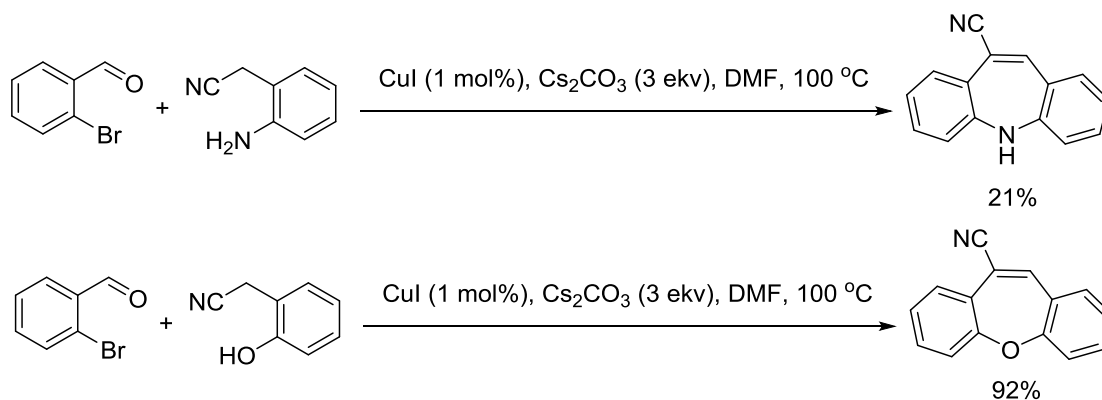
Reakcija 2-bromstirena i 2-hloranilina u prisustvu paladijuma kao katalizatora daje stabilne difenilaminske intermedijere, koji se zatim selektivno mogu prevesti u petočlane, šestočlane i sedmočlane heterociklične prstenove. Selektivnost intramolekulske transformacije postiže se odabirom liganda. Ovom metodom mogu se dobiti supstituisani dibenzoazepini u visokom prinosu i u jednom reakcionom koraku, polazeći od derivata 2-bromstirena i 2-hloranilina.<sup>45</sup>



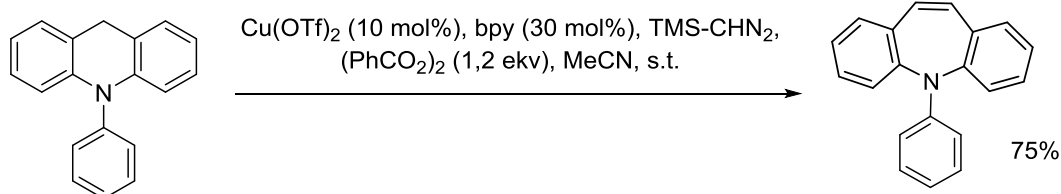
Šema 11

U literaturi je opisano zatvaranje azepinskog prstena u jednom koraku, tandemom reakcija Knoevenagel-ova kondenzacija/Ullmann-ova reakcija, kada je kao

katalizator upotrebljen bakar(I)-jodid. Polazeći od 2-(2-aminofenil)-acetonitrila i 2-brombenzaldehida, odgovarajući azepinski derivat dobijen je u malom prinosu. Međutim, ovo je vrlo efikasna metoda za sintezu dibenzo[*b,f*]oksepina.<sup>46</sup>

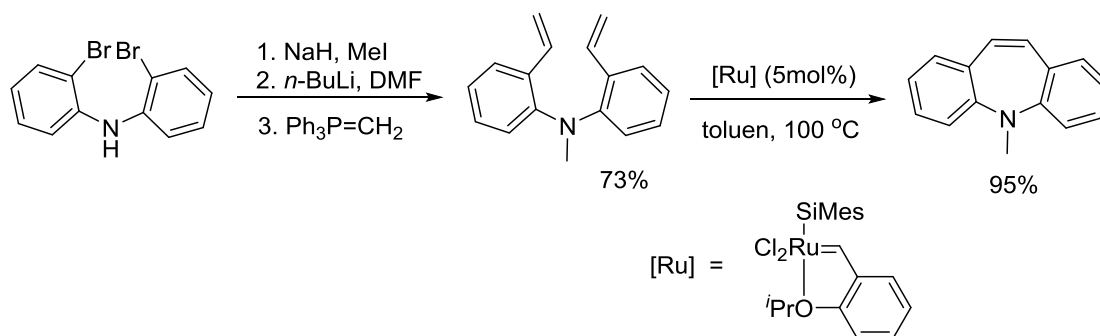


Dibenzo[*b,f*]azepini mogu se dobiti u većem prinosu funkcionalizacijom C-H veze i proširenjem prstena 9,10-dihidroakridina pomoću trimetilsilildiazometana. U ovoj reakciji neophodno je prisustvo katalizatora, bakar(II)-triflata.<sup>47,48</sup>



U literaturi je predstavljena sinteza dibenzo[*b,f*]azepina u kojoj je ključni korak zatvaranje sedmočlanog prstena olefinskom metatezom. Prekursor u reakciji je bis(2-vinilfenil)amin, koji se dobija iz bis(2-bromfenil)amina u tri reakciona koraka. Zatvaranje prstena ostvareno je pomoću Hoveyda-Grubbs-ovog katalizatora druge generacije.<sup>49</sup>

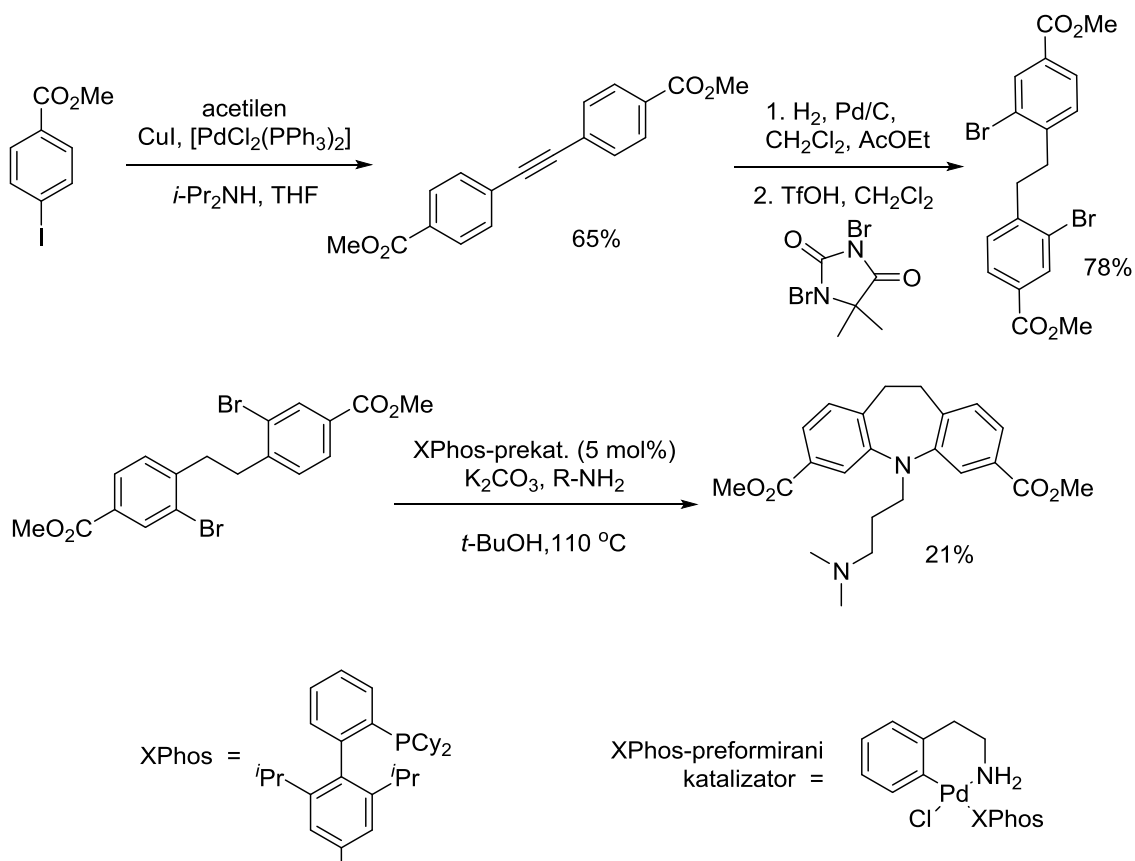




Šema 14

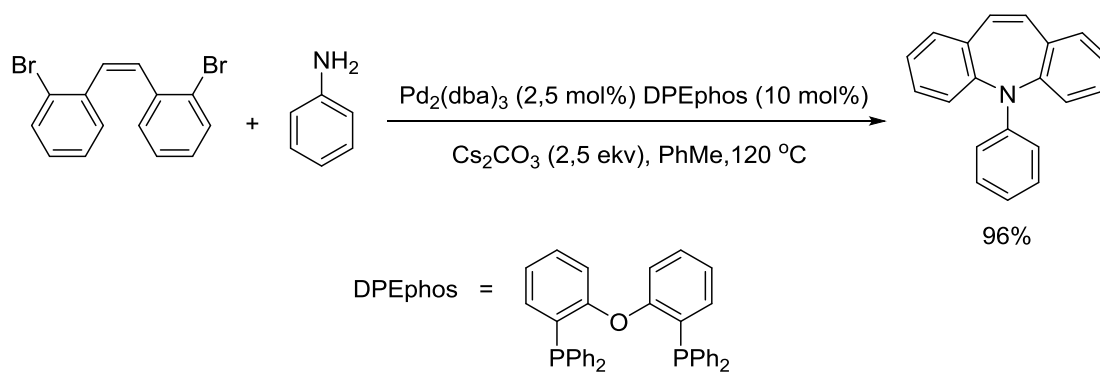
### 2.3.1.1. Dvostruko *N*-arilovanje katalizovano paladijumom

Reakcija dvostrukog *N*-arilovanja pomoću katalitičkih kompleksâ na bazi paladijuma, upotrebljena je za sintezu derivata 10,11-dihidrodibenzo[*b,f*]azepina. Ovaj postupak sinteze autori su iskoristili za dobijanje 3,7-disupstituisanih imipramina (Šema 15). Dvostrukim Sonogashira kuplovanjem acetilena i komercijalno dostupnih *p*-jodbenzoata, nastaju odgovarajući alkini. Redukcijom trostruke veze i bromovanjem aromatičnog jezgra pomoću 1,3-dibrom-5,5-dimetilhidantoina (DBDMH), dobija se prekursor za reakciju ciklizacije. Dvostruko *N*-arilovanje odvija se u prisustvu preformiranog paladijuskog katalizatora sa XPhos ligandom. Mana ovog pristupa je nizak prinos ključnog koraka reakcije.<sup>50</sup>



Šema 15

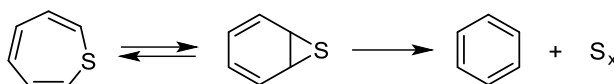
U isto vreme kada su objavljeni rezultati predstavljeni u ovoj tezi, grupa autora iz Kine objavila je sličnu metodologiju za sintezu dibenzo[*b,f*]azepina. Dvostrukim *N*-arilovanjem *o,o'*-bromsupstituisanih *Z*-stilbena dobijeni su 5*H*-dibenzo[*b,f*]azepini u visokom prinosu. U ovoj publikaciji, autori su opisali metodu sinteze koja se zasniva na upotrebi anilinskih derivata, DPEphos kao liganda i cezijum-karbonata kao baze.<sup>51</sup>



Šema 16

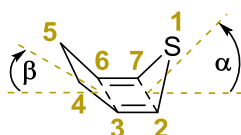
## 2.4. Tiepini

Tiepin je nezasićeno, sedmočlano, heterociklično jedinjenje, koje sadrži šest atoma ugljenika i jedan atom sumpora. Jednostavni monociklični tiepini su nestabilni i prilikom zagrevanja podležu eliminaciji sumpora. Nesupstituisani tiepin nikada nije izolovan. Teorijskim metodama izračunato je da je benzen-sulfidni valencioni tautomer 7,02 kcal/mol stabilniji od tiepina.<sup>52</sup> Smatra se da je uzrok nestabilnosti tiepina ireverzibilna eliminacija sumpora iz benzen-sulfida, pri čemu se dobija aromatični proizvod – benzen.



Slika 35. Eliminacija sumpora iz tiepina

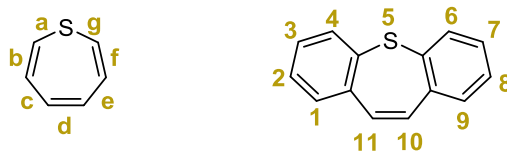
Monociklični tiepini stabilisani voluminoznim supstituentima sintetisani su osamdesetih godina prošlog veka.<sup>53</sup> Rendgenska proučavanja pokazala su da tiepinsko jezgro zauzima konformaciju lađe, sa diedarskim uglovima  $\alpha = 49,6^\circ$  i  $\beta = 28^\circ$  (slika 36). Na taj način, izbegava se planarna konformacija u kojoj bi tiepin formirao  $8\pi$ -elektronski, antiaromatični sistem.



Slika 36. Prikaz konformacije tiepinskog prstena

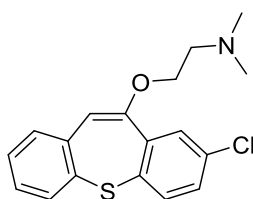
Tiepinski prsten može biti stabilizovan i elektronskim efektima. Pokazano je da termička stabilnost tiepina raste sa povećanjem broja kondenzovanih aromatičnih prstenova.<sup>54</sup>

Derivati dibenzo[*b,f*]tiepina su, zbog biološke aktivnosti, izuzetno važna heterociklična jedinjenja.



Slika 37. Dibenzo[*b,f*]tiepin

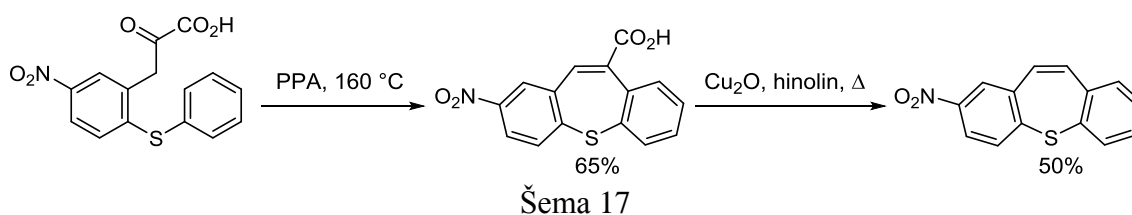
Zotepin je antipsihotik koji se koristi kao primarni lek u terapiji šizofrenije.<sup>55</sup> Dibenzo[*b,f*]tiepini pokazuju i antihistaminsku i antiinflamatornu aktivnost.<sup>56</sup> Rezultati ispitivanja antikancerske aktivnosti,<sup>57</sup> objavljeni 2015. godine, potvrđuju da su tiepini još uvek važna klasa biološki aktivnih heterocikličnih jedinjenja.



Slika 38. Struktura Zotepina

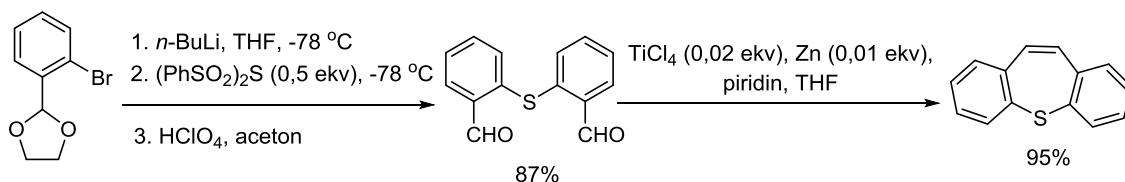
#### 2.4.1. Sinteza dibenzo[*b,f*]tiepina

Sinteza derivata dibenzo[*b,f*]tiepina prikazana je prvi put u hemijskoj literaturi 1957. godine. Loudon je opisao sintezu koja obuhvata formiranje tiepinskog prstena Friedel-Crafts-ovom reakcijom, polazeći iz 2-ariltio-5-nitrofenilpiruvinskih kiselina. Dekarboksilacijom dobijenog tricikličnog molekula, dobijaju se željeni proizvodi (šema 17).<sup>58</sup>



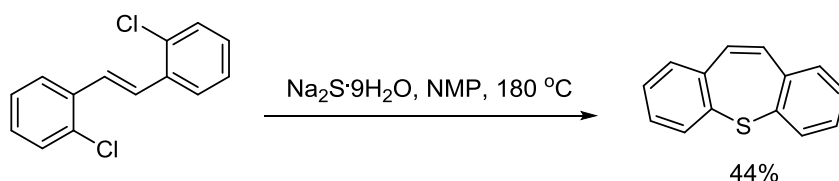
Drugačija strategija za sintezu dibenzo[*b,f*]tiepina obuhvata McMurry-jevu reakciju 2,2'-tiodibenzaldehida. Polazni supstrat u reakciji je acetal 2-brombenzaldehyda, koji se reakcijom halogen-metal izmene, za kojom sledi reakcija sa bis(fenilsulfonil)sulfatom, prevodi u bis(aril)-sulfid. Kiselo-katalizovanom hidrolizom acetala, oslobađa se odgovarajući dialdehid, koji se reakcijom McMurry-jevog kuplovanja prevodi u tiepinski derivat u visokom prinosu.<sup>59,60</sup> Ova metodologija u

sintezi tiepina prvi je primer sinteze u kojoj nastaju dve ugljenik-sumpor veze u jednom koraku.



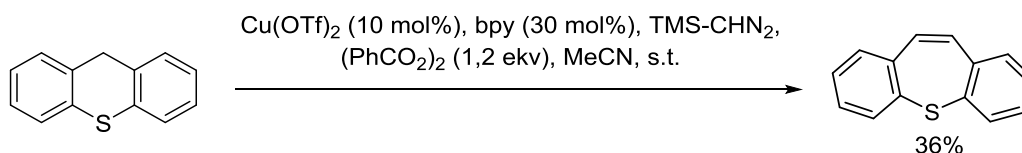
Šema 18

Opisana je i sinteza dibenzo[*b,f*]tiepina iz dihalogen-stilbena. Prilikom pokušaja sinteze benzo[*b*]tiofena, u prisustvu ekvimolarne količine  $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , kao glavni proizvod dobijen je dibenzo[*b,f*]tiepin, u prinosu od 44% (šema 19). Autori pretpostavljaju da se reakcija odvija nukleofilnom aromatičnom supstitucijom, uz istovremenu izomerizaciju *trans*-stilbena u *cis*-izomer.<sup>61</sup>



Šema 19

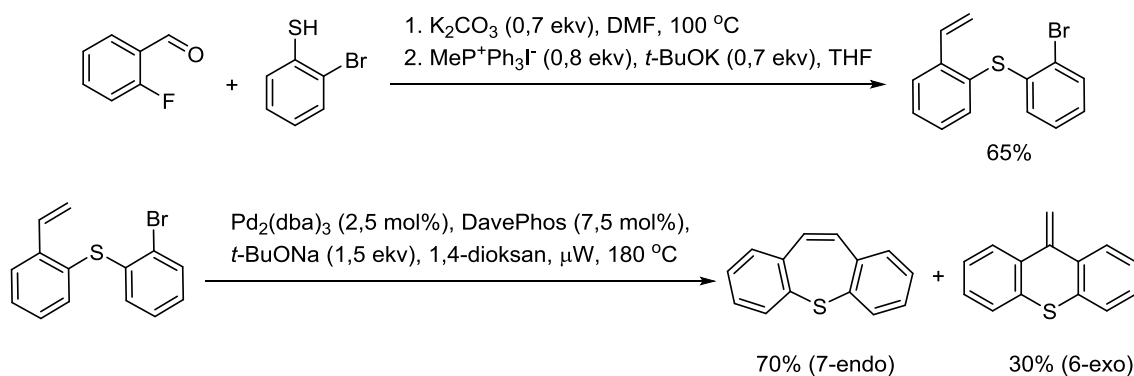
Nedavno je opisana sinteza u kojoj je kao polazni supstrat upotrebljen tioksanten. Funkcionalizacija C-H veze ostvarena je pomoću katalizatora na bazi bakra, a proširenje prstena pomoću trimetilsilildiazometana. Dibenzo[*b,f*]tiepin dobijen je u malom prinosu (šema 20).<sup>47,48</sup>



Šema 20

Prva sinteza tiepina katalizovana kompleksima paladijuma, objavljena je 2012. godine. U prvom koraku, polazeći iz komercijalno dostupnog 2-fluorbenzaldehida i 2-bromtiofenola, nukleofilnom aromatičnom supstitucijom dobija se odgovarajući

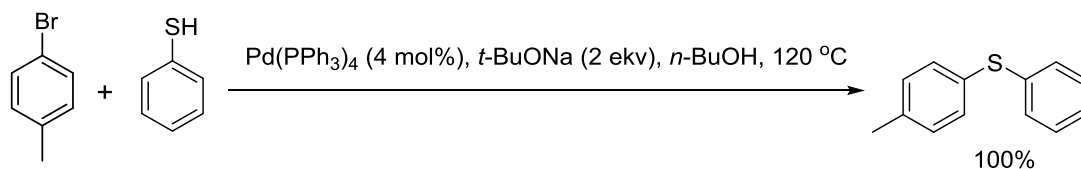
aldehid, koji se zatim Wittig-ovom reakcijom transformiše u alken, u ukupnom prinosu 65%. Tiepinski prsten (7-endo-proizvod) zatvara se Mizoroki-Heck-ovom reakcijom. U reakciji nastaje i tioksantinski 6-egzo-proizvod kao sporedni proizvod.<sup>62</sup>



Šema 21

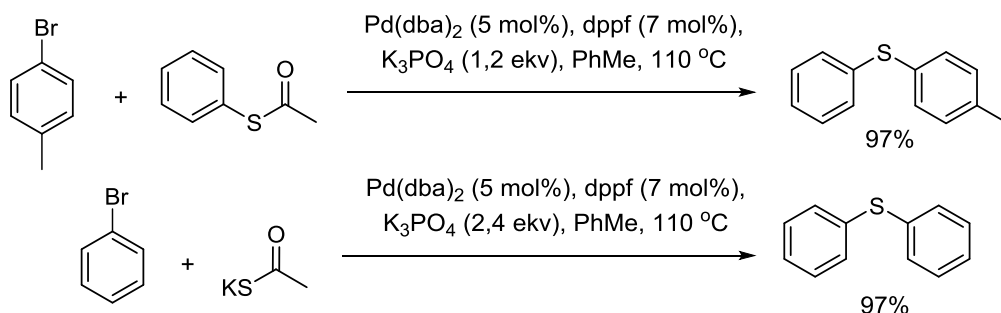
#### 2.4.2. Građenje C-S veze arilovanjem katalizovanim paladijumom – put ka sintezi tiepina dvostrukim arilovanjem sumpora

Prva reakcija arilovanja tiola katalizovana paladijumom objavljena je 1980. godine. Polazeći iz aril-bromida i aril-tiola, pomoću tetrakis(trifenilfosfin)paladijuma, dobijaju se diaril-sulfidi u odličnom prinosu.<sup>63</sup>



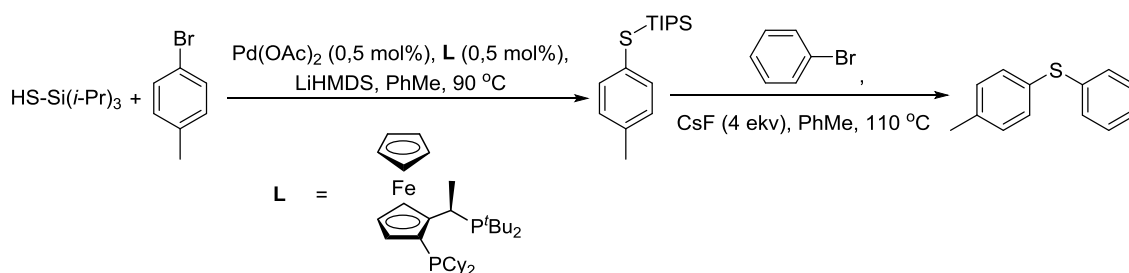
Šema 22

Sličan pristup upotrebljen je za sintezu simetričnih i nesimetričnih tioetara, reakcijom aril-bromida i tioacetata katalizovanom kompleksima paladijuma. U istom radu, prikazana je i sinteza tioetara reakcijom dvostrukog arilovanja, kada je kao izvor sumpora upotrebljen kalijum-tioacetat.<sup>64</sup>



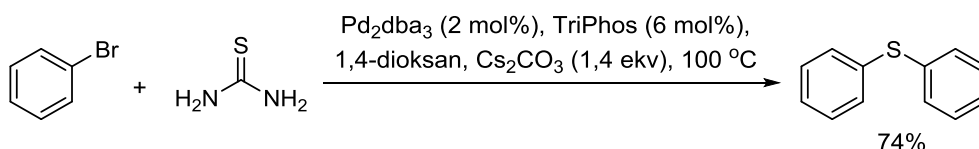
Šema 23

Rodríguez i Hartwig objavili su sintezu nesimetričnih diaril-sulfida, katalizovanu kompleksom paladijuma i ferocenskog alkilbifosfinskog liganda. Prvi korak u sintezi je reakcija aril-halogenida sa triizopropilsilil-sulfidom. U drugom koraku, bez prethodnog izolovanja, sililovani tioetar podleže kuplovanju sa halogenarenima dajući odgovarajuće diaril-sulfide.<sup>65</sup>



Šema 24

Kuhn i saradnici opisali su sintezu simetričnog bisariltioetra reakcijom katalizovanom kompleksima paladijuma. Iz halogenarena i tiouree kao izvora sumpora, u jednom koraku formiraju se dve C-S veze i nastaju odgovarajući simetrični diaril-sulfidi.<sup>66</sup>



Šema 25

### 3. NAŠI RADOVI

Predmet ove doktorske disertacije je razvoj nove metode za sintezu azepinskih i tiepinskih derivata, zasnovane na dvostrukom *N*- i *S*-arilovanju katalizovanom kompleksima paladijuma, i primena optimizovane metode za sintezu novih jedinjenja koja pokazuju antibakterijsku i antifungalnu aktivnost.

Usled brzog geografskog širenja postojećih bolesti i pojave novih oboljenja, infektivne bolesti postaju sve veći problem za globalno zdravlje. Učestala pojava rezistencije otežava lečenje, pa se povećava smrtnost kao posledica infekcija izazvanih biološkim patogenima. Neracionalna upotreba antibiotika dovela je do pojave rezistentnih sojeva bakterija. Do sada je identifikovana rezistencija na skoro sve poznate antibiotike, a postoje bakterije otporne na više različitih antibiotika. U poslednjih nekoliko decenija, beleži se i stalni porast broja teških gljivičnih infekcija. Faktori koji dovode do toga su rasprostranjena upotreba antibiotika širokog spektra (eliminiraju bakterije odgovorne za kontrolu broja gljivica) i povećanje broja osoba sa smanjenim imunim odgovorom (usled bolesti koje utiču na imunitet ili upotrebe lekova koji imaju imunosupresivno dejstvo).

Navedeni podaci ukazuju na to da je neophodno stalno pronalaženje novih lekova za lečenje infekcija koje izazivaju bakterije i gljive. Jedan od pristupa u pronalaženju novih lekova je sinteza malih molekula koji poseduju biološku aktivnost. Za sintezu biološki aktivnih jedinjenja, posebno je značajna reakcija formiranja C-N veze, jer mnoga aktivna jedinjenja, uključujući i veliki broj lekova, sadrže azot. Ovu transformaciju uspešno mogu da katalizuju kompleksi paladijuma.

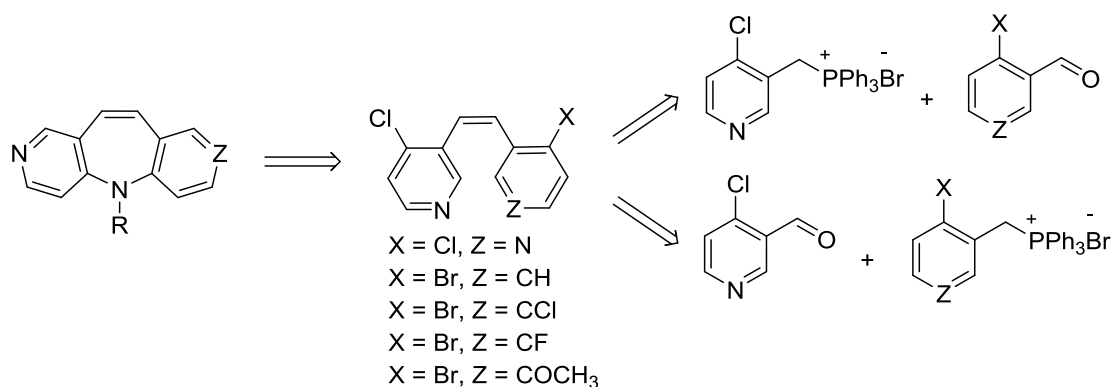
#### 3.1. Novi azepinski derivati

Derivati iminostilbena (*5H*-dibenz[*b,f*]azepina) pokazuju različite biološke aktivnosti, uključujući antikancerogenu<sup>67</sup> i antioksidativnu aktivnost<sup>68</sup>, a ovo heterociklično jezgro je i osnova strukture nekoliko odobrenih lekova koji deluju na centralni nervni sistem.<sup>37,38</sup> Pregled literature, prikazan u Opštem delu ove disertacije, ukazuje na to da i dalje postoji značajno interesovanje za pronalaženje novih načina sinteze *5H*-dibenz[*b,f*]azepina i njihovu primenu u medicinskoj hemiji.



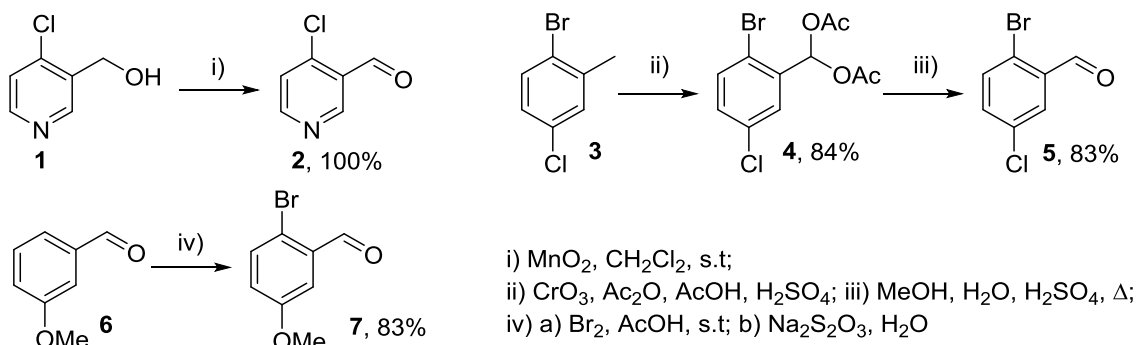
### 3.1.1. Sinteza stilbenskih prekursora

U Šemi 26, prikazan je retrosintetički pristup sintezi tricikličnih azepinskih derivata. Planirano je da se željeni 5*H*-diaril[*b,f*]azepini sintetišu iz odgovarajućih *o,o'*-dihalogensupstituisanih *Z*-stilbena, koji bi bili dobijeni Wittig-ovom reakcijom iz fosfonijum-soli i odgovarajućih aldehida.<sup>69</sup>



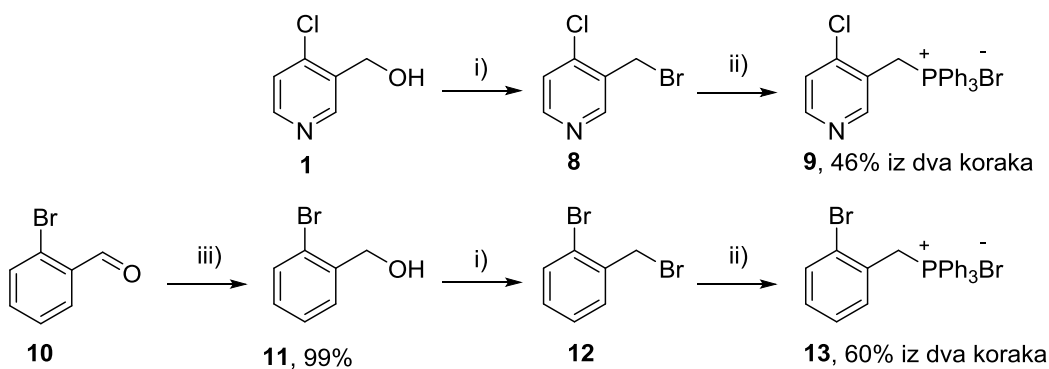
Šema 26

Sinteza aldehida predstavljena je u šemi 27. Aldehid **2** dobijen je oksidacijom alkohola **1**<sup>70</sup> pomoću  $\text{MnO}_2$  i pripreman je neposredno pre upotrebe u Wittig-ovoj reakciji, jer je veoma nestabilan. Oksidacijom benzilnog položaja 1-brom-4-hlor-2-metilbenzena (**3**) pomoću  $\text{CrO}_3$  u smeši  $\text{Ac}_2\text{O}$  i  $\text{AcOH}$  sintetisan je aldehid **5**. U reakciji prvo nastaje geminalni diacetat **4**, koji se hidrolizom u kiselim uslovima prevodi u aldehid **5**.<sup>71</sup> Pomoću  $\text{Br}_2$  u  $\text{AcOH}$ , 3-metoksibenzaldehid (**6**) transformisan je u aldehid **7**.<sup>72</sup>



Šema 27

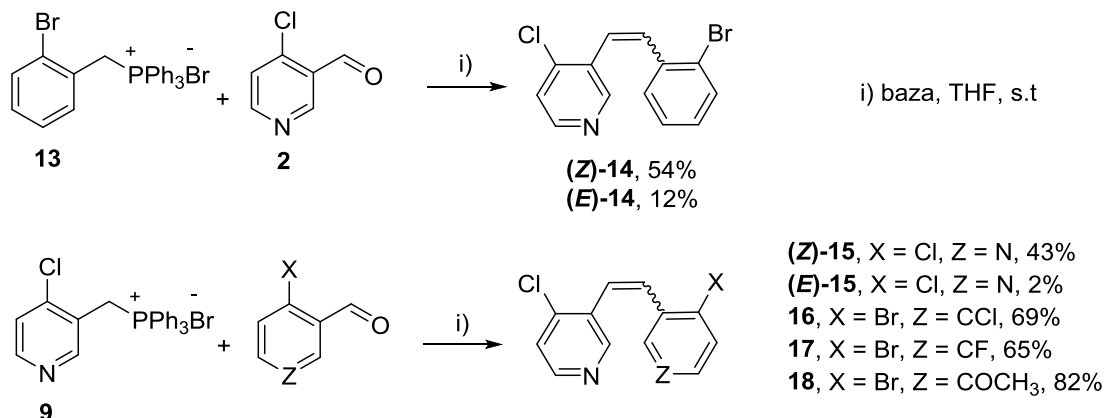
Reakcijom nukleofilne supstitucije pomoću  $\text{PBr}_3$ , alkohol **1** preveden je u brom-derivat **8**, koji je, pomoću  $\text{Ph}_3\text{P}$ , transformisan u fosfonijum-so **9**. Fosfonijum-so **13** dobijena je polazeći iz komercijalno dostupnog 2-brombenzaldehyda, koji je preveden u alkohol **11** pomoću  $\text{NaBH}_4$ . Alkohol **11** je zatim, opisanom sekvencom reakcija, transformisan u odgovarajuću fosfonijum-so (šema 28).



i)  $\text{PBr}_3$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , s.t.; ii)  $\text{Ph}_3\text{P}$ ,  $\text{PhMe}$ ,  $110\text{ }^\circ\text{C}$ ; iii)  $\text{NaBH}_4$ ,  $\text{MeOH}$ , s.t.

Šema 28

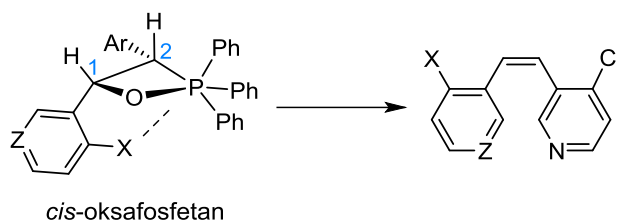
Etilenski derivati **14-18** dobijeni su Wittig-ovom reakcijom fosfonijum-soli i aldehida, u prisustvu  $\text{KO}t\text{-Bu}$  ili  $\text{LDA}$  kao baza.



Šema 29

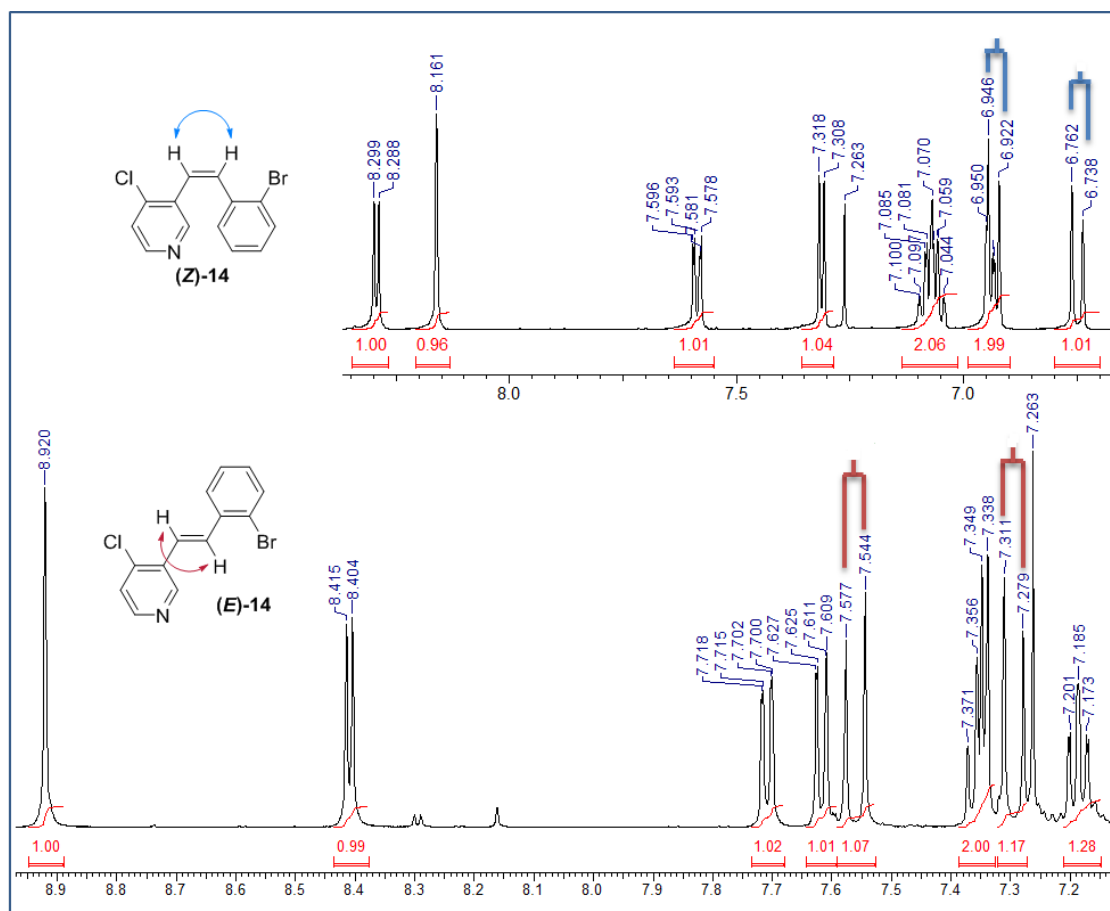
Prilikom sinteze stilbena **14** i **15**, pretežno nastaju *Z*-izomeri, ali su uspešno izolovani i okarakterisani i *E*-izomeri. U slučaju ostalih stilbena, izolovani su samo *Z*-izomeri. Velika selektivnost prilikom sinteze *Z*-stilbena, može se objasniti istovremenim *ortho*-efektom atoma halogena aldehida i fosfonijum-soli.<sup>73</sup> Halogen u *ortho*-položaju

aldehida može da ostvari interakciju sa atomom fosfora fosfonijum-soli. Zbog uvijanja četveročlanog prstena, smanjuju se i 1,2-interakcije (slika 39). Ova dva efekta zajedno dovode do stabilizacije *cis*-oksafofetana i nastajanja glavnog *Z*-izomera. Upotreba voluminozne baze takođe doprinosi selektivnosti.



Slika 39. Stabilizacija *cis*-oksafofetana

Konfiguracija dvostruke veze etilenskih derivata određena je na osnovu konstanti kuplovanja vinilnih vodonika u  $^1\text{H}$  NMR spektrima. U alkenima je sprezanje *cis*-orijentisanih atoma vodonika manje u poređenju sa *trans*-orijentisanim atomima, što je potvrđeno mnogobrojnim primerima 1,2-disupstituisanih diastereomernih etena.<sup>74</sup> Na slici 40, prikazana je razlika konstanti sprezanja vicinalnih protona *E*-izomera (16 Hz) i *Z*-izomera (12 Hz) jedinjenja **14**. Kod jedinjenja **16-18**, gde je izolovan samo (*Z*)-izomer, vrednosti konstanti sprezanja iste su kao kod jedinjenja (**Z**)-**14**. Konfiguracija dvostruke veze  $C_2$  simetričnog etilenskog derivata **15** ne može se odrediti na ovaj način, jer ne postoje prostorne ili elektronske interakcije karakteristične za jedan od izomera. Na osnovu stereochemijskog ishoda ostalih reakcija i očekivanih posledica kooperativnog *orto*-efekta, predlažemo *Z*-konfiguraciju glavnog izolovanog izomera jedinjenja **15**.



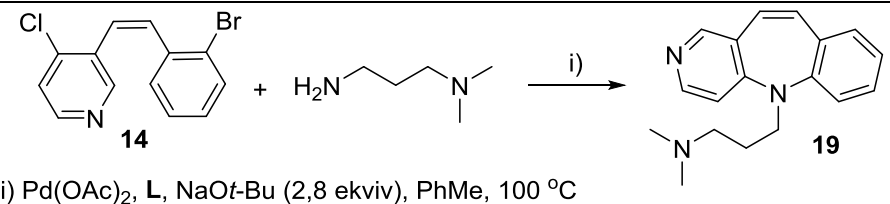
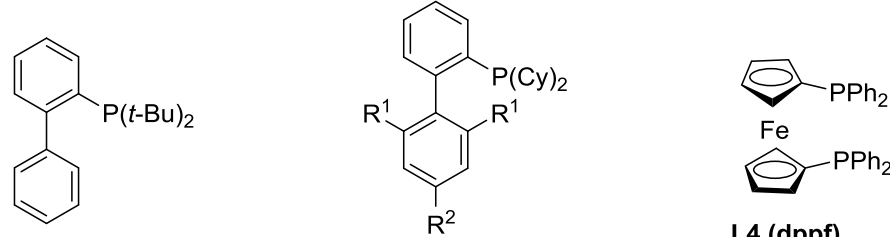
Slika 40.  $^1\text{H}$  NMR spektri *E*-(**14**) i *Z*-(**14**)

### 3.1.2. Sinteza azepinskog prstena

Pod uslovima Buchwald-Hartwig-ove reakcije aminovanja, pomoću  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  i JohnPhos kao liganda, polazeći iz stilbenskog derivata (*Z*)-**14**, dobijen je 5*H*-dipirido[*b,f*]azepin **19** u visokom prinosu (tabela 1, reakcija 1). Izbor odgovarajućeg liganda veoma je značajan za uspeh reakcije. Poznato je da dialkilbilarilfosfinski ligandi sa paladijumom formiraju komplekse koji uspešno katalizuju ovaj tip reakcija.<sup>75</sup> Zato je ispitivan uticaj liganda na prinos reakcije, bez promene ostalih reakcionih parametara. Izvor paladijuma u reakciji bio je  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (5 mol% u odnosu na **14**), a baza  $\text{NaOt-Bu}$  (2,8 ekviv). Reakcije su izvođene u toluenu, na 100 °C, tokom 48 sati. Kada su upotrebljeni biarilfosfanski ligandi JohnPhos (10 mol%) i SPhos (10 mol%), dobijen je isti prinos azepina **19** (tabela 1, reakcije 1 i 3), ali je upotreba XPhos-a dovela do značajnog nižeg prinosa (tabela 1, reakcija 4). U reakciji sa dppf, nije došlo do promene polaznog jedinjenja (tabela 1, reakcija 5). Povećanje količine  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (10 mol%) i

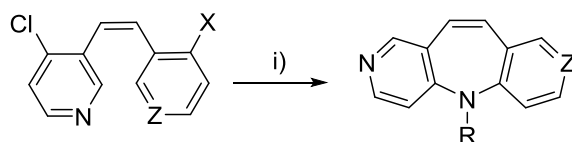
najefikasnijeg liganda (30 mol%) nije značajno uticalo na prinos reakcije (tabela 1, reakcija 2).

Tabela 1. Optimizacija reakcije dvostrukog aminovanja jedinjenja **14**

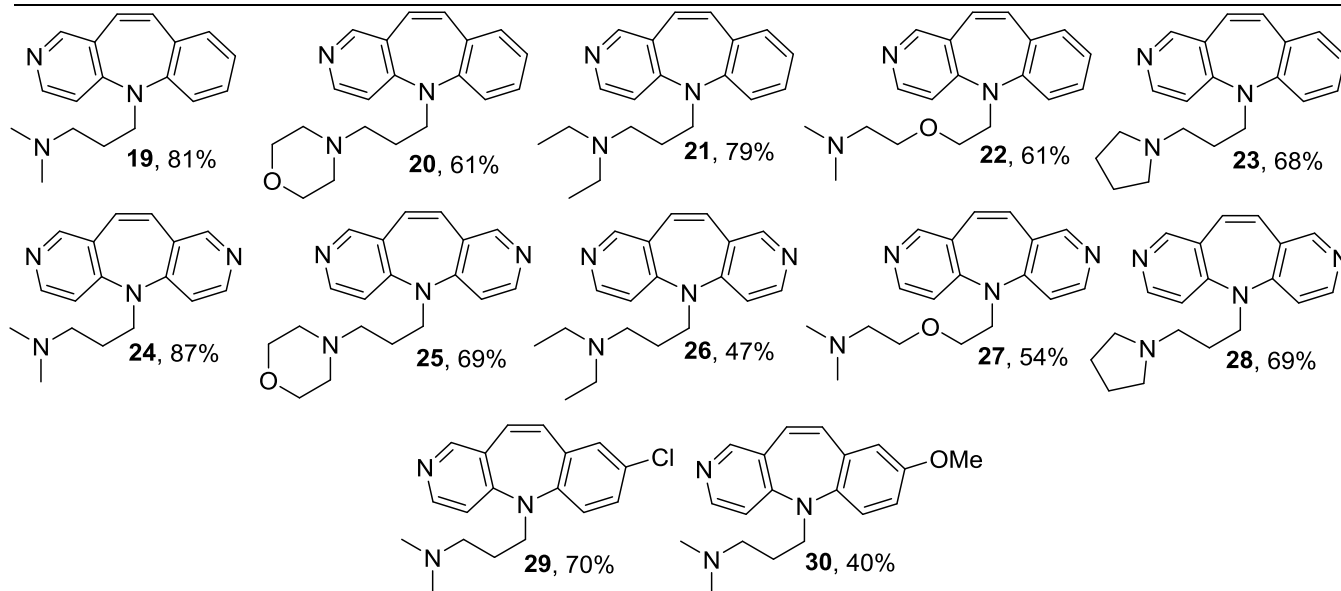
 <p>i) Pd(OAc)<sub>2</sub>, L, NaOt-Bu (2,8 ekviv), PhMe, 100 °C</p>			
 <p><b>L1 (JohnPhos)</b>      <b>L2 (SPhos):</b> R<sup>1</sup> = OMe, R<sup>2</sup> = H  <b>L3 (XPhos):</b> R<sup>1</sup> = R<sup>2</sup> = <i>i</i>-Pr      <b>L4 (dppf)</b></p>			
Broj reakcije	Izvor Pd (mol%)	Ligand (mol%)	Prinos (%)
1	Pd(OAc) <sub>2</sub> (5)	<b>L1</b> (10)	81
2	Pd(OAc) <sub>2</sub> (10)	<b>L1</b> (30)	78
3	Pd(OAc) <sub>2</sub> (5)	<b>L2</b> (10)	81
4	Pd(OAc) <sub>2</sub> (5)	<b>L3</b> (10)	19
5	Pd(OAc) <sub>2</sub> (5)	<b>L4</b> (10)	0

Optimizovani reakcioni uslovi (tabela 1, reakcija 1), primenjeni su za sintezu različitih 5*H*-diaril[*b,f*]azepina. Visok prinos jedinjenja **24** takođe ukazuje na *Z*-geometriju dvostruke veze etilenskog derivata **15**. Prilikom reakcije stilbena **17** sa 3-dimetilamino-1-propilaminom, nije došlo do konverzije polaznog jedinjenja.

- 14**, X = Br, Z = CH  
**15**, X = Cl, Z = N  
**16**, X = Br, Z = CCl  
**17**, X = Br, Z = CF  
**18**, X = Br, Z = COCH



i)  $\text{NH}_2\text{R}$  (3 ekviv),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (5 mol%), JohnPhos (10 mol%),  $\text{NaOt-Bu}$  (2,8 ekviv), PhMe, 100 °C



Šema 30

### 3.1.3 Ispitivanje mehanizma i nukleofilna aromatična supstitucija

Elektronima siromašni 4-halogenpiridinski prsten može reagovati sa različitim nukleofilima, adiciono-eliminacionim mehanizmom nukleofilne aromatične supstitucije (*ipso*-supstitucija,  $\text{S}_{\text{N}}\text{Ar}$ ). Reakcija 4-hlorpiridina sa primarnim aminima predstavlja efikasan način za sintezu 4-alkilaminopiridina. Međutim, za odvijanje reakcije, obično je potrebna povišena temperatura i duže reakciono vreme.<sup>76</sup>

Kako bismo pokazali da je prethodno opisano zatvaranje azepinskog prstena potpomognuto kompleksima paladijuma, a ne posledica nukleofilne aromatične supstitucije, izveli smo seriju eksperimenata pod različitim reakcionim uslovima (tabela 2). U odsustvu  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ , liganda i baze, u toluenu, na temperaturi 100 °C, nije bilo reakcije stilbena **15** i 3-dimetilamino-1-propilamina (tabela 2, reakcija 3). Da bismo isključili mogućnost da je reakcija katalizovana bazom, eksperiment smo ponovili pod istim reakcionim uslovima, uz dodatak  $\text{NaOt-Bu}$  (tabela 2, reakcija 2). Pod opisanim uslovima, nije došlo do promene polaznih jedinjenja. Na osnovu rezultata izvedenih

eksperimentata, može se zaključiti da je, pod primenjenim reakcionim uslovima (toluen, 100 °C) za odvijanje reakcije neophodno prisustvo kompleksa paladijuma.

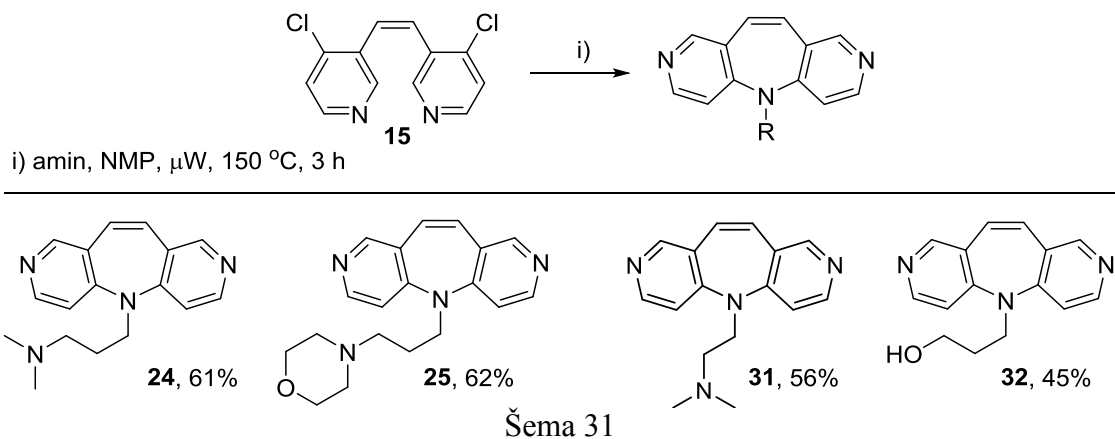
Želeli smo da ispitamo da li je ipak moguće dobiti azepinske derivate reakcijom nukleofilne aromatične supstitucije. Kako je poznato da je za  $S_NAr$  reakcije 4-hlorpiridina sa primarnim aminima potrebna povišena temperatura, toluen je zamenjen *N*-metilpirolidonom (NMP), rastvaračem koji ima višu tačku ključanja. Na temperaturi 150 °C dobijen je proizvod **24** u dobrom prinosu (tabela 2, reakcija 5). Kada je reakcija ponovljena na 100 °C u NMP, nije nastao željeni proizvod (tabela 2, reakcija 4). Reakciono vreme značajno je skraćeno primenom mikrotalasnog zračenja (tabela 2, reakcija 6).

Tabela 2. Sinteza azepina **24** pod različitim reakcionim uslovima

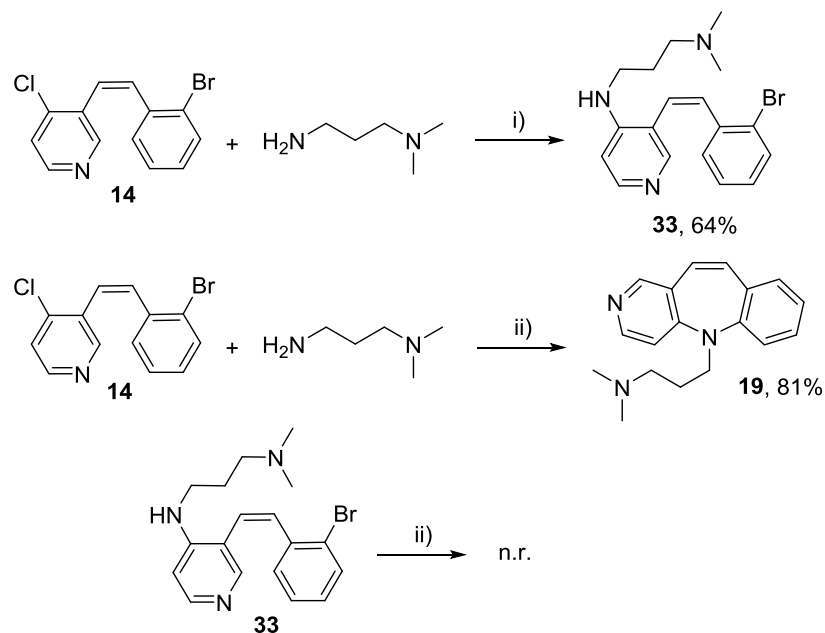
Broj reakcije	Rastvarač	T (°C)	„Pd”	baza	MW	t (sati)	Prinos (%)
1 <sup>a</sup>	toluen	100	+	+	-	24	87
2 <sup>b</sup>	toluen	100	-	+	-	24	0
3 <sup>b</sup>	toluen	100	-	-	-	24	0
4 <sup>b</sup>	NMP	100	-	-	-	24	0
5 <sup>b</sup>	NMP	150	-	-	-	24	58
6 <sup>b</sup>	NMP	150	-	-	+	3	61

<sup>a</sup> Pd(OAc)<sub>2</sub> (5 mol%), JohnPhos (10 mol%), amin (3 ekv), NaO*t*-Bu (2,8 ekv); <sup>b</sup> 10 ekv. amina

Optimizovani reakcioni uslovi primenjeni su za sintezu još jednog poznatog i dva nova *5H*-diaril[*b,f*]azepina (šema 31). Iako su prinosi reakcija niži od prinosa u prethodno opisanoj sintezi katalizovanoj kompleksima paladijuma, prednosti  $S_NAr$  metodologije su odustvo katalizatora i skraćeno reakciono vreme.



Očekivano, kada je kao supstrat upotrebljen stilben **14**, nije nastao azepinski derivat, već proizvod monosupstitucije, jedinjenje **33** (šema 32). Dobijeni proizvod upotrebljen je u ogledu za ispitivanje mehanizma dvostrukog *N*-arilovanja katalizovanog kompleksima paladijuma. Naša pretpostavka bila je da je ovaj proizvod intermedijer u sintezi azepina **19**. Međutim, pod eksperimentalnim uslovima Buchwald-Hartwig-ovog aminovanja, polazeći iz jedinjenja **33**, nije došlo do ciklizacije.



i) NMP,  $\mu$ W, 150 °C, 3 h

ii) Pd(OAc)<sub>2</sub> (5 mol%), JohnPhos (10 mol%), NaOt-Bu (2,8 ekviv), PhMe, 100 °C

Šema 32



Pomoću eksperimenata prikazanih u tabeli 2, nedvosmisleno je potvrđeno da je reakcija zatvaranja azepinskog prstena potpomognuta kompleksima paladijuma. Međutim, kako pod uslovima Buchwald-Hartwig-ovog aminovanja ne dolazi do ciklizacije jedinjenja **33**, nemoguće je isključiti mogućnost da je nastanak azepinskih proizvoda posledica kombinacije različitih mehanizama. Neophodno je dalje istraživanje s ciljem određivanja detaljnog reakcionog mehanizma.

#### 3.1.4. Antimikrobna aktivnost novih azepinskih derivata

Antibakterijska i antifungalna aktivnost sintetisanih azepina ispitana je prema pet Gram-negativnih bakterija (*Escherichia coli*, *Proteus hauseri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* podvrsta *enterica* serovar Enteritidis i *Klebsiella pneumoniae*), tri Gram-pozitivne bakterije (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus* ATCC 10240 i *M. luteus* ATCC 4698) i tri gljive (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Aspergillus brasiliensis*). Kao antibakterijski standardi upotrebljeni su amikacin (AMK) i hloramfenikol (CHL), a kao antifungalni standardi nistatin (NYS) i flukonazol (FLC). Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC – *eng.* minimum inhibitory concentration) u eseju u tečnom medijumu definisana je kao najniža koncentracija jedinjenja koja vodi inhibiciji rasta bakterija ili gljiva.

Rezultati ispitivanja antibakterijske aktivnosti derivata **19-30** prikazani su u tabeli 3. Sva ispitana jedinjenja ispoljila su manju antibakterijsku aktivnost u poređenju sa amikacinom, a samo je azepinski derivat **19** pokazao 1,5 – 3 puta veću aktivnost od hloramfenikola prema tri Gram-negativne bakterije (*E. coli*, *P. hauseri* i *P. aeruginosa*) i jednoj Gram-pozitivnoj bakteriji (*M. luteus* ATCC 4698).

Svi piridobenzazepinski derivati (**19-23**) prema svim ispitanim bakterijama imaju višu aktivnost od odgovarajućih dipiridoazepinskih analoga (**24-28**). Azepin **19**, sa *N,N*-dimetil-supstituentom, pokazao je četiri puta veću aktivnost u poređenju sa *N,N*-diethyl-supstituisanim derivatom **21**. Jedinjenje **23**, sa pirolidinskim prstenom u bočnom nizu, aktivnije je od jedinjenja **21**. Ovaj rezultat može ukazati na to da je konformacija supstituenata na azotu bitna za aktivnost i da veća konformaciona sloboda etil-grupa nepovoljno utiče na aktivnost. Poređenjem derivata **19** i **22**, može se zaključiti da uvođenje atoma kiseonika u bočni niz, značajno snižava aktivnost. Derivati **29** i **30**, koji imaju supstituente u položaju C-8 piridobenzazepinskog tricikličnog sistema, takođe su

manje aktivni u poređenju sa odgovarajućim *N,N*-dimetil-supstituisanim jedinjenjem **19**. Na osnovu ovih rezultata možemo zaključiti da aktivnost ne zavisi od elektronskih efekata supstituenata u položaju C-8 (šema 30).

Tabela 3. Antibakterijske minimalne inhibitorne koncentracije – MIC ( $\mu\text{g/mL}$ ) azepinskih derivata

Jedinjenje	Gram-negativne bakterije					Gram-pozitivne bakterije		
	<i>E. coli</i>	<i>P. hauseri</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i> 10240	<i>M. luteus</i> 4698
<b>19</b>	39	78	78	78	78	39	78	39
<b>20</b>	39	313	313	313	313	39	156	78
<b>21</b>	156	313	313	625	625	156	313	313
<b>22</b>	313	625	625	625	625	313	625	313
<b>23</b>	78	156	313	313	313	156	156	156
<b>24</b>	1250	1250	1250	1250	625	1250	1250	2500
<b>25</b>	1250	2500	1250	1250	1250	2500	1250	2500
<b>26</b>	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250
<b>27</b>	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250	1250
<b>28</b>	625	625	625	625	625	625	625	625
<b>29</b>	78	156	313	313	313	156	313	156
<b>30</b>	156	313	313	313	625	313	313	313
AMK	5	7	50	8	8	11	2	2
CHL	62	125	250	43	62	15	31	125

Vrednosti minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) sintetisanih azepina prema tri soja gljiva (*Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* i *Aspergillus brasiliensis*) prikazane su u tabeli 4. Jedinjenja **20** i **23** pokazala su značajnu aktivnost prema *C. albicans* i *S. cerevisiae*, u poređenju sa flukonazolom i nistatinom. Navedeni derivati su šesnaest puta aktivniji od nistatina prema *C. albicans* i osam puta aktivniji prema *S. cerevisiae*. Azepin **19** ispoljio je veću aktivnost u poređenju sa standardima prema *S. cerevisiae*, a azepin **29** aktivniji je prema *C. albicans* soju. Najaktivniji prema *A. brasiliensis* su derivati **20** i **30**, četiri puta aktivniji od nistatina, ali manje aktivni od flukonazola. Kao i prilikom određivanja antibakterijske aktivnosti, može se primetiti da su piridobenzazepinski derivati (**19-23**) aktivniji od odgovarajućih dipiridoazepinskih analoga (**24-28**).

Tabela 4. Antifungalne minimalne inhibitorne koncentracije – MIC (mg/mL) azepinskih derivata

Jedinjenje	<i>C. albicans</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>A. brasiliensis</i>
<b>19</b>	2500	156	1250
<b>20</b>	156	156	313
<b>21</b>	625	625	625
<b>22</b>	625	313	625
<b>23</b>	156	156	625
<b>24</b>	2500	1250	1250
<b>25</b>	2500	1250	1250
<b>26</b>	1250	1250	1250
<b>27</b>	1250	1250	1250
<b>28</b>	625	625	1250
<b>29</b>	156	313	625
<b>30</b>	313	313	313
NYS	2500	1250	1250
FLC	313	313	156

Kako su ispitani azepinski derivati pokazali slabu do umerenu antibakterijsku i antifungalnu aktivnost, odlučeno je da se njihova antimikrobna aktivnost ne ispituje detaljnije.

### 3.2. Novi tiepinski derivati

Mnogi derivati dibenzo[*b,f*]tiepina su biološki aktivna jedinjenja, koja pokazuju antihistaminsku, antiinflamatornu i antikancersku aktivnost.<sup>56,57</sup> Antipsihotik Zotepin je tiepinski derivat koji se koristi u terapiji šizofrenije.<sup>55</sup> U Opštem delu ove disertacije, prikazane su različite metode za sintezu diaril[*b,f*]tiepina, ali samo u jednoj sintezi tiepinski prsten nastaje reakcijom katalizovanom kompleksima paladijuma.<sup>62</sup>

#### 3.2.1. Sintaza tiepinskog prstena

Prethodno opisana metodologija sinteze diaril[*b,f*]azepina, uspešno je primenjena za sintezu odgovarajućih tiepinskih derivata. Za optimizaciju reakcionih uslova, korišćena je reakcija dobijanja benzotiepino(2,3-*c*)piridina, prikazana u tabeli 5. Kao izvor sumpora upotrebljen je kalijum-tioacetat, kao izvor paladijuma Pd(OAc)<sub>2</sub>, a kao baza NaO*t*-Bu. Prvo se pokušalo sa sintezom tiepina pod termalnim uslovima – reakciona smeša mešana je jedan sat na temperaturi 70 °C, a zatim četrnaest sati na 110

°C (tabela 5, reakcije 1 i 2). Kada je kao ligand upotrebljen JohnPhos, nije bilo promene polaznog stilbena (tabela 5, reakcija 1). Kada je JohnPhos zamenjen ferocenskim ligandom, dppf, željeni proizvod izolovan je u prinosu 28% (tabela 5, reakcija 2).

S ciljem povećanja prinosa i skraćanja reakcionog vremena, reakcija je izvedena pod dejstvom mikrotalasnog zračenja, zagrevanjem na temperaturu 175 °C tokom 90 minuta. Prinos proizvoda povećan je na 51% (tabela 5, reakcija 3). Kada je temperatura snižena na 150 °C, a reakciono vreme produženo na 120 minuta, prinos izolovanog proizvoda snižen je na 24% (tabela 5, reakcija 4). Ovo ukazuje da temperatura bitnije utiče na prinos reakcije nego reakciono vreme. Upotreba biarilfosfanskih liganada (XPhos i SPhos) značajno smanjuje prinos reakcije (tabela 5, reakcije 5 i 6). Zanimljivo je da kompleksi paladijuma sa biarilfosfanskim ligandima, koji su se pokazali najuspešnijim prilikom sinteze azepina, ne katalizuju uspešno reakciju sinteze tiepina.

Pokazalo se da prinos reakcije pod najboljim reakcionim uslovima (tabela 5, reakcija 3) nije ponovljiv, najverovatnije kao posledica nestabilnosti paladijum-acetata. Zbog toga je promenjen izvor paladijuma i umesto Pd(OAc)<sub>2</sub>, u daljim reakcijama korišćen je Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>. Posle 60 minuta zagrevanja na 170 °C u mikrotalasnom reaktoru, izolovan je proizvod u prinosu 51% (tabela 5, reakcija 7). Povećanje količine kalijum-tioacetata nije značajno uticalo na prinos (tabela 5, reakcija 8). Upotreba slabije baze (Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ili K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) dovodi do sniženja prinosa proizvoda (tabela 5, reakcija 10 i 11). Promena izvora sumpora takođe snižava prinos (tabela 5, reakcija 12).

Interesantno je da su dva sedmočlana heterociklična sistema (azepin i tiepin), dobijeni primenom iste sintetičke metodologije – dvostrukim *N*- ili *S*-arilovanjem katalizovanim kompleksima paladijuma. Međutim, selektivnost liganda prilikom sinteze bila je različita. Prilikom sinteze azepina, najefikasnijim su se pokazali kompleksi paladijuma sa biarilfosfanskim ligandima (JohnPhos i SPhos), a u reakciji sinteze tiepina efikasan je bio jedino ferocenski ligand (dppf). Takođe, za dobijanje dobrog prinosa tiepina bila je neophodna primena mikrotalasnog zračenja.

Tabela 5. Optimizacija reakcije sinteze benzotiepino(2,3-*c*)piridina (33)

Reakcija	Izvor S	„Pd“	Ligand	Baza	T (°C)	t	MW	Prinos (%)
1	KSCOCH <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	<b>L1</b>	NaOt-Bu	70 °C 110 °C	1 h 14 h	-	0
2	KSCOCH <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	<b>L4</b>	NaOt-Bu	70 °C 110 °C	1 h 14 h	-	28
3	KSCOCH <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	<b>L4</b>	NaOt-Bu	175 °C	90 min	+	51 (32) <sup>c</sup>
4	KSCOCH <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	<b>L4</b>	NaOt-Bu	150 °C	120 min	+	24
5	KSCOCH <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	<b>L2</b>	NaOt-Bu	175 °C	90 min	+	9 <sup>a</sup>
6	KSCOCH <sub>3</sub>	Pd(OAc) <sub>2</sub>	<b>L3</b>	NaOt-Bu	175 °C	90 min	+	7 <sup>a</sup>
7	KSCOCH <sub>3</sub>	Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub>	<b>L4</b>	NaOt-Bu	170 °C	60 min	+	51
8 <sup>b</sup>	KSCOCH <sub>3</sub>	Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub>	<b>L4</b>	NaOt-Bu	170 °C	60 min	+	49
9	KSCOCH <sub>3</sub>	Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub>	<b>L3</b>	NaOt-Bu	170 °C	60 min	+	12
10	KSCOCH <sub>3</sub>	Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub>	<b>L4</b>	K <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	170 °C	60 min	+	0
11	KSCOCH <sub>3</sub>	Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub>	<b>L4</b>	Cs <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	170 °C	60 min	+	13
12	tiourea	Pd <sub>2</sub> dba <sub>3</sub>	<b>L4</b>	NaOt-Bu	170 °C	60 min	+	8

<sup>a</sup> NMR prinos; <sup>b</sup> 2,4 ekviv. KSCOCH<sub>3</sub>; <sup>c</sup> prinos ponovljene reakcije

Optimalni reakcioni uslovi (tabela 5, reakcija 7) primenjeni su za sintezu pet tiepinskih derivata (šema 33). Reakcijom *Z*-stilbena **14-18** sa kalijum-tioacetatom (1,2 ekviv), u prisustvu katalizatora Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (5 mol%) i dppf (10 mol%), pod dejstvom mikrotalasnog zračenja, dobijeni su tiepinski derivati **34-38** u malom do umerenom prinosu. Povećanjem količine kalijum-tioacetata na 2,4 ekvivalenta, povećan je prinos

derivata **36** i **37**, ali ne i derivata **34** i **38**. Prilikom reakcije etilenskog derivata **15** sa 2,4 ekvivalenta  $\text{KSCoCH}_3$ , nastaje komplikovana smeša proizvoda.

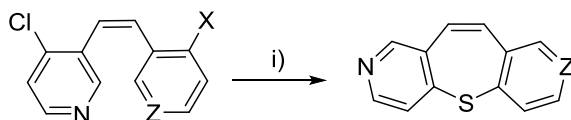
**14**, X = Br, Z = CH

**15**, X = Cl, Z = N

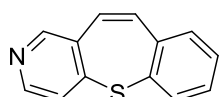
**16**, X = Br, Z = CCl

**17**, X = Br, Z = CF

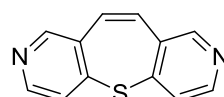
**18**, X = Br, Z = COCH



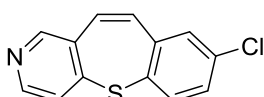
i)  $\text{KSCoCH}_3$  (1,2 ekviv),  $\text{Pd}_2\text{dba}_3$  (5 mol%), dppf (10 mol%),  $\text{NaOt-Bu}$  (1,2 ekviv), PhMe, 170 °C,  $\mu\text{W}$



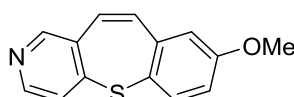
**34**, 51% (49%)\*



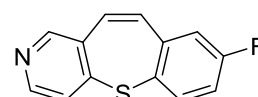
**35**, 60%



**36**, 32% (51%)\*



**37**, 19% (45%)\*

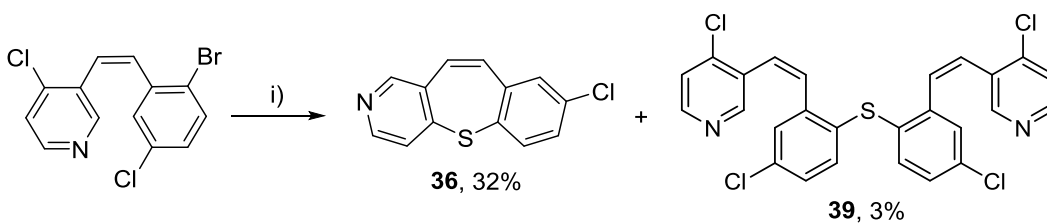


**38**, 35% (27%)\*

\* 2,4 ekviv.  $\text{KSCoCH}_3$

### Šema 33

U reakciji dobijanja tiepinskog derivata **36**, kao sporedni proizvod izolovano je jedinjenje **39** (Šema 34). Određivanje strukture jedinjenja **36** i **39** opisano je u Prilogu 1.

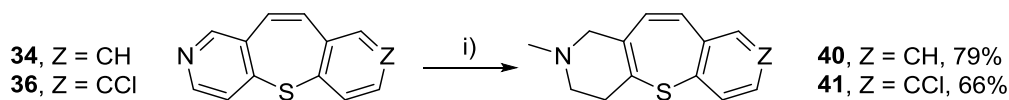


i)  $\text{KSCoCH}_3$  (1,2 ekviv),  $\text{Pd}_2\text{dba}_3$  (5 mol%), dppf (10 mol%),  $\text{NaOt-Bu}$  (1,2 ekviv), PhMe, 170 °C,  $\mu\text{W}$

### Šema 34

#### 3.2.2. Dalje transformacije tiepinskih derivata

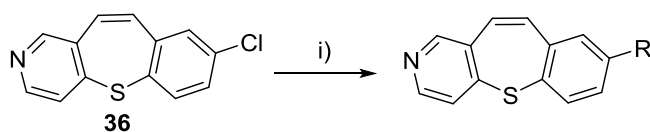
Jedinjenja **34** i **36** prevedena su u proizvode **40** i **41**, sekvencom reakcija metilovanje-redukcija. Piridinski azot metilovan je pomoću  $\text{CH}_3\text{I}$  u  $\text{CH}_3\text{CN}$ , a dobijena kvaternerna amonijum-so je potom redukovana pomoću  $\text{NaBH}_4$  u  $\text{MeOH}$  (šema 35).



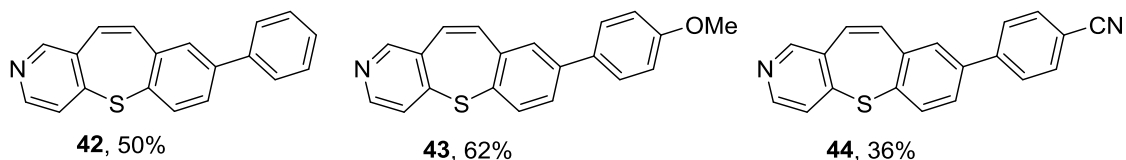
i) a)  $\text{CH}_3\text{I}, \text{CH}_3\text{CN}, 50\text{ }^\circ\text{C}$ , b)  $\text{NaBH}_4, \text{MeOH}, \text{s.t.}$

Šema 35

Tiepin **36** je Suzuki-jevom reakcijom pomoću komercijalno dostupnih arilboronskih kiselina, transformisan u jedinjenja **42-44**.

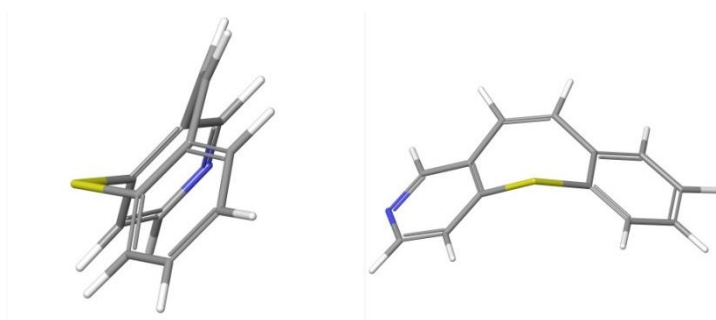


i)  $\text{ArB(OH)}_2, \text{Pd(OAc)}_2, \text{SPhos}, \text{K}_3\text{PO}_4, \text{PhMe}, 100\text{ }^\circ\text{C}$



Šema 36

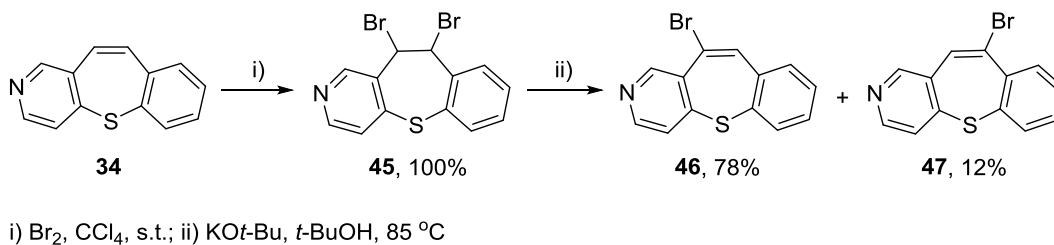
Molekulskim modelovanjem<sup>77</sup> utvrđeno je da sintetisani tiepinski derivati nisu planarni molekuli, već sedmočlani tiepinski prsten zauzima konformaciju lađe.



Slika 41. Optimizacija geometrije benzotiepino(2,3-*c*)piridina

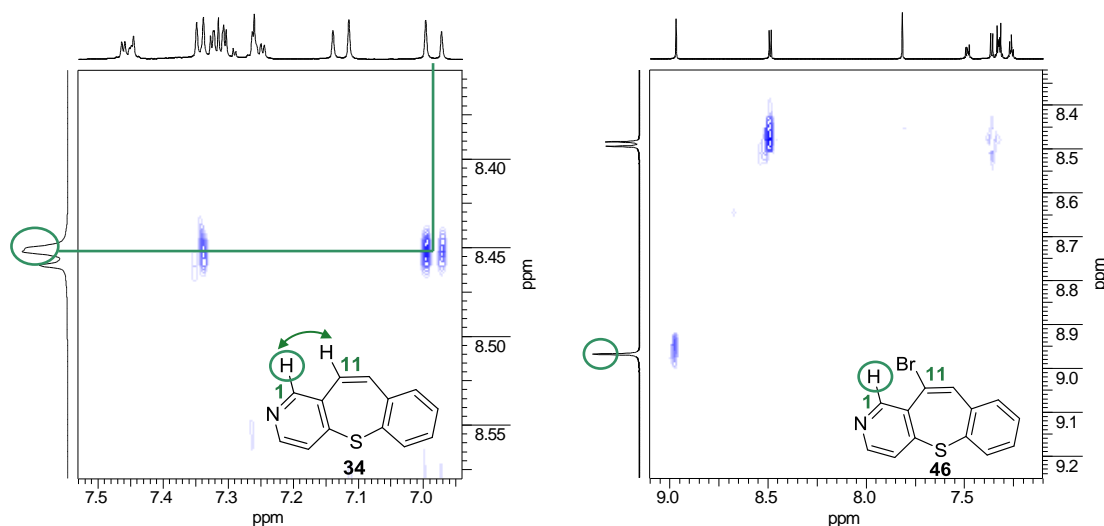
Odstupanje sistema od planarne geometrije, povećava reaktivnost dvostruke veze. Dvostruka veza koja nije deo konjugovanog sistema, trebalo bi da lako podleže reakcijama elektrofilne adicije. Ova pretpostavka potvrđena je uspešnim bromovanjem benzotiepino(2,3-*c*)piridina (šema 37). Sledeći korak u sintezi, bila je eliminacija  $\text{HBr}$  u

baznim uslovima, pomoću KO*t*-Bu kao baze.<sup>78</sup> Kao glavni proizvod izolovan je vinil-bromid **46**, a u reakciji je ostvarena visoka regioselektivnost.



Šema 37

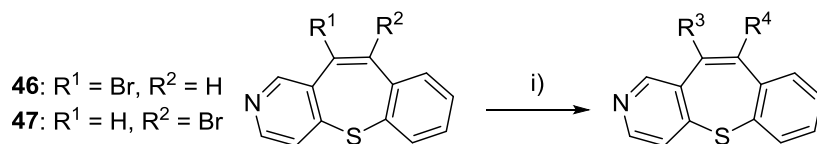
Dobijeni izomerni vinil-bromidi uspešno su razdvojeni, a zatim okarakterisani standardnim spektroskopskim metodama (NMR, IC, HRMS). Odnos proizvoda potvrđen je pomoću HPLC-MS. Položaj atoma broma u proizvodu **46** potvrđen je analizom NOESY 2D NMR spektra (slika 42). Kod tiepinskog jedinjenja **34**, postoji sprezanje kroz prostor protona H-1 sa piridinskog prstena i protona H-11 sa centralnog, tiepinskog prstena. Vinil-bromid **46** u položaju C-11 nema vodonikov atom, pa ne postoji mogućnost prostorne interakcije sa protonom H-1.



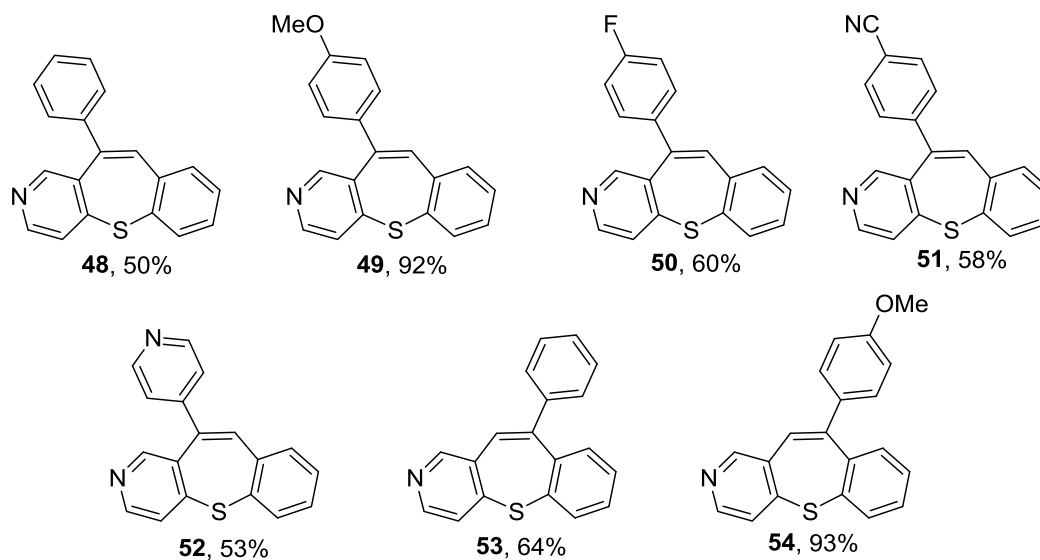
Slika 42. NOE spektri jedinjenja **34** i **46**

Jedinjenje **46** je, Suzuki-jevom reakcijom, pomoću komercijalno dostupnih arilboronskih kiselina, transformisano u jedinjenja **48-52**. Na isti način, jedinjenje **47** prevedeno je u derivate **53** i **54**.



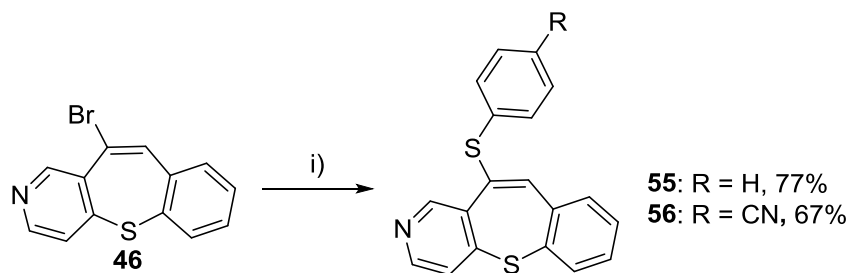


ArB(OH)<sub>2</sub>, Pd(OAc)<sub>2</sub>, Ph<sub>3</sub>P, DME, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> aq, EtOH, 90 °C



Šema 38

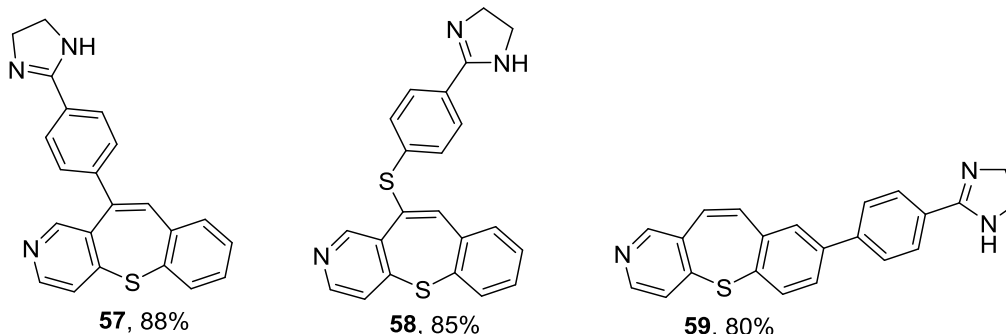
Kuplovanjem bromida **46** sa odgovarajućim tiofenolima, pomoću Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> i dppf kao liganda, dobijeni su tiepinski derivati **55** i **56** u dobrom prinosu (šema 39).



i) ArSH, Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub>, dppf, NaOt-Bu, PhMe, 90 °C

Šema 39

Sva sintetisana jedinjenja koja sadrže cijano-grupu, transformisana su u 2-supstituisane-2-imidazoline **57-59**, pomoću etilendiamina u prisustvu sumpora (šema 40).



Šema 40

### 3.2.3. Antimikrobna aktivnost novih tiepinskih derivata

Preliminarna antibakterijska i antifungalna aktivnost sintetisanih tiepina prema četiri Gram-negativne bakterije (*E. coli*, *P. hauseri*, *P. aeruginosa* i *Salmonella enterica* podvrsta *enterica* serovar Enteritidis), četiri Gram-pozitivne bakterije (*Clostridium sporogenes*, *S. aureus*, *M. luteus* ATCC 10240 i *Kocuria rhizophila*) i tri gljive (*C. albicans*, *S. cerevisiae* i *A. brasiliensis*) ispitana je disk-difuzionom metodom. Kao antibakterijski standard upotrebljen je amikacin (AMK), a kao antifungalni standard nistatin (NYS). Antimikrobna aktivnost određena je na osnovu prečnika zone inhibicije.

Ispitivanje antibakterijske aktivnosti (tabela 6) pokazalo je da tiepinski derivati ispoljavaju veoma slabu antibakterijsku aktivnost. Sva ispitana jedinjenja manje su aktivna u poređenju sa amikacinom. Prečnik zone inhibicije najaktivnijeg derivata **36** prema *C. sporogenes* je 20 mm.

Tabela 6. Antibakterijska aktivnost tiepinskih derivata, izražena preko prečnika zone inhibicije (mm)

Jedinjenje	Gram-negativne bakterije				Gram-pozitivne bakterije			
	<i>E. coli</i>	<i>P. hauseri</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. enterica</i>	<i>C. sporogenes</i>	<i>S. aureus</i>	<i>M. luteus</i> 10240	<i>M. luteus</i> 4698
<b>34<sup>a</sup></b>	n.a. <sup>b</sup>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>35</b>	14	10	n.a.	10	16	n.a.	n.a.	n.a.
<b>36</b>	14	n.a.	n.a.	n.a.	20	n.a.	n.a.	10
<b>37</b>	14	10	n.a.	10	14	n.a.	n.a.	n.a.
<b>38</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>41</b>	10	14	n.a.	n.a.	10	n.a.	n.a.	n.a.
<b>42</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
AMK <sup>c</sup>	26	26	25	25	24	24	27	23

<sup>a</sup> Koncentracija jedinjenja: 1 mg/disk; <sup>b</sup> n.a – nema aktivnosti; <sup>c</sup> koncentracija AMK: 30 µg/disk

Međutim, sva jedinjenja, osim derivata **36**, pokazala su dobru antifungalnu aktivnost (tabela 7). Derivati **34**, **35**, **37**, **38**, **41** i **42** su, pri koncentraciji 1000 µg/disk, potpuno inhibirali rast *C. albicans* i *S. cerevisiae*.

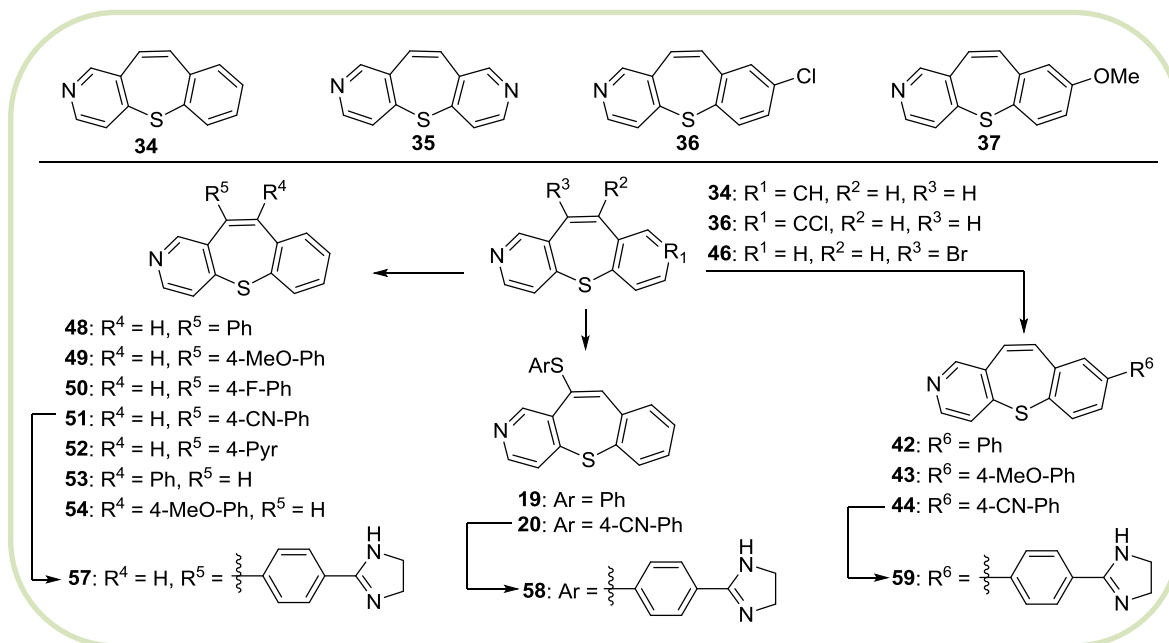
Tabela 7. Antifungalna aktivnost tiepinskih derivata, izražena preko prečnika zone inhibicije (mm)

Jedinjenje	<i>C. albicans</i> <sup>a</sup>				<i>S. cerevisiae</i> <sup>b</sup>				<i>A. brasiliensis</i> <sup>a</sup>			
	Koncentracija, µg/disk											
	1000	500	250	125	1000	500	250	125	1000	500	250	125
<b>34</b>	k.i. <sup>c</sup>	12	10	n.a. <sup>d</sup>	k.i.	18	15	11	18	14	12	10
<b>35</b>	k.i.	k.i.	30	n.a.	k.i.	20	16	12	k.i.	16	12	10
<b>36</b>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
<b>37</b>	k.i.	k.i.	50	28	k.i.	30	22	18	k.i.	30	20	12
<b>38</b>	k.i.	14	n.a.	n.a.	k.i.	22	16	12	12	10	n.a.	n.a.
<b>41</b>	k.i.	k.i.	10	n.a.	k.i.	26	18	n.a.	k.i.	10	n.a.	n.a.
<b>42</b>	k.i.	14	n.a.	n.a.	k.i.	16	10	n.a.	12	n.a.	n.a.	n.a.

<sup>a</sup> NYS: koncentracija 30 µg/disk – 30 mm; <sup>b</sup> NYS: koncentracija 30 µg/disk – 54 mm; <sup>c</sup> k.i – kompletna inhibicija; <sup>d</sup> n.a – nema aktivnosti

Kako su u preliminarnim ispitivanjima testirani tiepinski derivati pokazali značajnu antifungalnu aktivnost i selektivnost prema gljivama u odnosu na bakterije, vršena su dodatna ispitivanja njihovih antifungalnih svojstava. Za dalja ispitivanja, na osnovu rezultata preliminarnih testova, izabrana su jedinjenja **34**, **35**, **36**, **37** i **42**.

Takođe, ispitana je antifungalna aktivnost novosintetisanih derivata, dobijenih strukturnim modifikacijama osnovnih tricikličnih tiepinskih jedinjenja **34** i **36** (slika 43).



Slika 43. Strukture testiranih tiepinskih derivata

Za određivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) sintetisanih jedinjenja, korišćen je esej u tečnom medijumu. Kao antifungalni standardi upotrebljeni su antifungalni lekovi vorikonazol (VOR) i nistatin (NYS) (tabela 8). Minimalna inhibitorna koncentracija najaktivnijeg jedinjenja **42** prema *C. albicans* soju je 15,62  $\mu\text{g/mL}$ . Tiepinski derivati **36** i **37**, sa hlor- i metoksi-supstuentom u položaju C-8, pokazali su veću aktivnost od odgovarajućeg nesupstituisanog analoga **34**. Interesantno je primetiti da derivat **36** nije bio aktivan prilikom ispitivanja antifungalne aktivnosti preliminarnom disk-difuzionom metodom. Ova razlika u aktivnosti može biti posledica interakcije jedinjenja sa celuloznim diskom. Ukoliko se porede aktivnosti derivata **34** i **42**, može se zaključiti da uvođenje fenil-supstituenta u položaj C-8 tricikličnog tiepinskog sistema povećava aktivnost, ali u slučaju jedinjenja **43** i **44** dodatni supstuent na benzenovom prstenu nepovoljno utiče na aktivnost. Derivati **48** i **49** ispoljili su četiri puta veću aktivnost prema *C. albicans* od nesupstituisanog tiepina **34**. Ako se porede derivati sa aril-supstuentima u položaju C-11, može se primetiti da su

jedinjenja **50**, **51** i **55** aktivna kao i osnovno jedinjenje **34**, a piridinski analog **52** ispoljava manju aktivnost. Poređenjem izomernih derivata **42**, **48** i **53**, može se zaključiti da je položaj fenil-supstituenta ključan za aktivnost. Tiepin **42** dva puta je aktivniji od izomernog tiepina **48**, a šesnaest puta aktivniji od izomera **53**. Poznato je da 2-supstituiscani 2-imidazolini mogu imati antimikrobno dejstvo.<sup>79</sup> Među testiranim 2-imidazolinskim derivatima, najaktivnije je jedinjenje **59**, koje je pokazalo dva puta manju aktivnost od **42** prema *C. albicans*, ali osam puta veću aktivnost od **42** prema *C. parapsilosis*. Ovo je veoma važan rezultat, jer *C. parapsilosis* često poseduje urođenu rezistenciju, a sklon je i sticanju rezistencije na antifungalne lekove (korišćeni soj je klinički izolat rezistentan na vorikonazol).

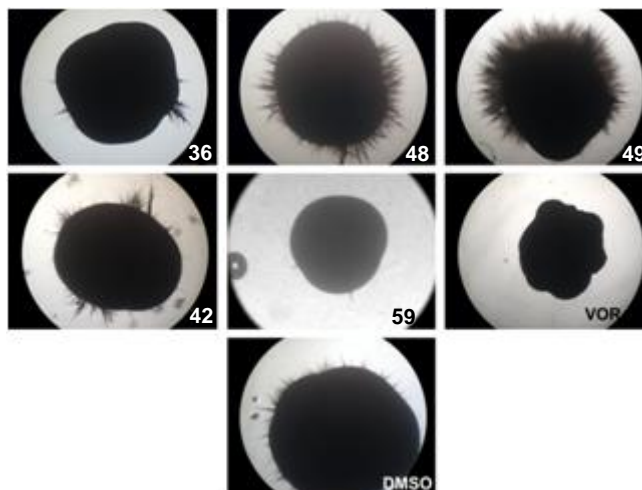
Tabela 8. Antifungalne minimalne inhibitorne koncentracije – MIC (µg/mL) tiepinskih derivata

Jedinjenje	<i>C. albicans</i> ATCC10231	<i>C. parapsilosis</i> C27	Jedinjenje	<i>C. albicans</i> ATCC10231	<i>C. parapsilosis</i> C27
<b>34</b>	125	>500	<b>50</b>	125	500
<b>35</b>	250	250	<b>51</b>	125	62,5
<b>36</b>	31,25	250	<b>52</b>	500	250
<b>37</b>	62,5	125	<b>53</b>	250	>500
<b>42</b>	15,6	250	<b>54</b>	250	250
<b>43</b>	125	>500	<b>55</b>	125	>500
<b>44</b>	250	250	<b>56</b>	125	500
<b>46</b>	125	>500	<b>57</b>	250	250
<b>48</b>	31,2	250	<b>58</b>	125	62,5
<b>49</b>	31,2	62,5	<b>59</b>	31,2	31,2
<b>VOR</b>	0,5	R <sup>a</sup>	<b>NYS</b>	2	2

<sup>a</sup> R – rezistentan

Gljiva *C. albicans* ima tri različite morfologije: kvasac, pseudohife i hife. Formiranje hifa vrlo je važno za ulazak *Candida* vrsta u humane ćelije tokom početnih faza infekcije i za formiranje biofilma.<sup>80</sup> Biofilm je složena zajednica mikroorganizama, okružena ekstracelularnim polimernim matriksom, koja se formira na površini različitih materijala koji su u kontaktu sa organizmom domaćinom (plastika, kateteri) i štiti mikroorganizme od imunog sistema domaćina. Biofilmovi *Candida* vrsta su rezistentni na većinu antifungalnih lekova. Zbog toga je ispitan uticaj najaktivnijih derivata (MIC ≤ 31,2 µg/mL) na rast hifa *C. albicans* (slika 44). Aktivnost testiranih jedinjenja poređena

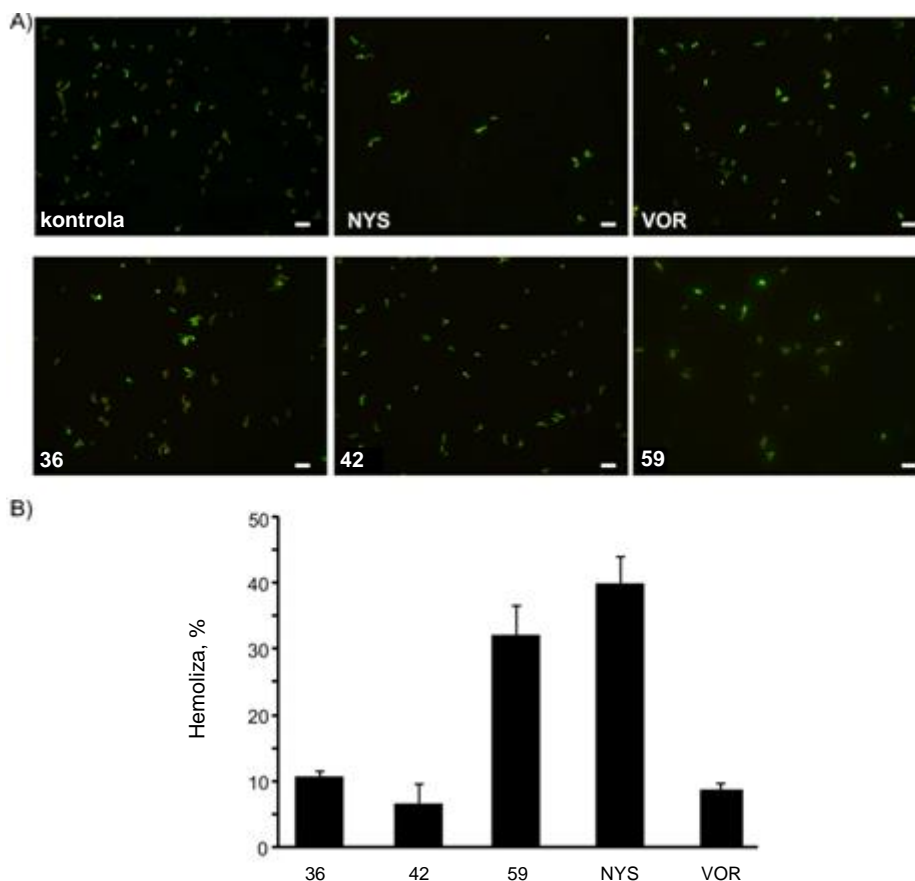
je sa vorikonazolom. Tiepini **36** i **59** su značajno ili potpuno sprečili nastanak hifa, a tiepin **42** nije pokazao značajan uticaj na razvoj hifa. Derivati **48** i **49** stimulisali su rast hifa, pa je odlučeno da se isključe iz daljih testova.



Slika 44. Uticaj subinhibitornih koncentracija ( $MIC_{70}$ ) najaktivnijih tiepina na nastanak hifa *C. albicans*

Najaktivniji tiepinski derivati, koji nisu podsticali rast hifa, podvrgnuti su daljim testovima s ciljem ispitivanja mehanizma antifungalnog dejstva. Prvo je ispitivano da li je primarna meta dejstva testiranih jedinjenja ćelijska membrana. Pomoću fluorescentne mikroskopije, proučen je uticaj jedinjenja **36**, **42** i **59** na ćelije *C. albicans* tokom pet sati (slika 45A). Takođe je ispitano dejstvo jedinjenja na procenat hemolize eritrocita, kako bi se utvrdilo da li postoje interakcije jedinjenja sa ćelijskom membranom (slika 45B). Eritrociti ovce i tiepini inkubirani su u puferu fiziološke pH vrednosti, a membrane eritrocita predstavljale su model za lipidni dvosloj. Procenat hemolize eritrocita kvantifikovan je poređenjem sa pozitivnom kontrolom, liziranom Triton-X detergentom.<sup>81</sup> Jedinjenja **36**, **42** i vorikonazol, u MIC koncentracijama, pokazala su nizak procenat hemolize (10%) na fiziološkoj pH vrednosti, što znači da ćelijska membrana nije meta njihovog delovanja. Derivat **59** doveo je do hemolize 30-40% ćelija, slično vrednostima za nistatin. Pošto je poznato da nistatin i drugi antifungalni polieni izazivaju neselektivne perforacije ćelijske membrane,<sup>82</sup> jedan od mehanizama antifungalnog dejstva derivata **59** može biti interakcija sa ćelijskom membranom.

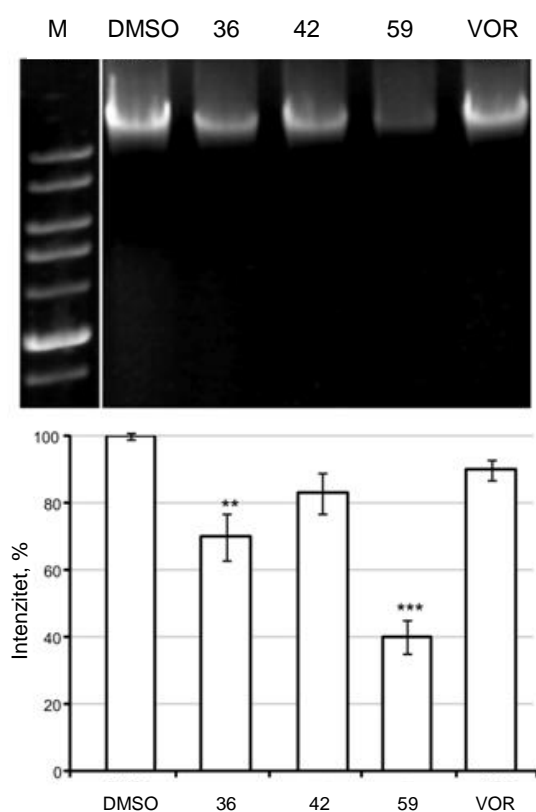
Rezultati esaja hemolize potvrđeni su mikroskopijom, koja je pokazala da su nistatin i **59** smanjili broj ćelija posle pet sati dejstva. Jedinjenja **36**, **42** i vorikonazol smanjili su metaboličku aktivnost (smanjenje broja ćelija sa narandžastim fluorescentnim intravakuolarnim strukturama), ali je za smrt ćelijske kulture bilo potrebno duže inkubiranje od 24 sata.



Slika 45. Aktivnost tiepina **36**, **42** i **59**, nistatina (NYS) i vorikonazola (VOR) prema A) kulturi *C. albicans*, praćena fluorescentnom mikroskopijom posle 5 sati dejstva (bela linija predstavlja 10  $\mu$ m;  $\times$  40 uveličanje) i B) isprani eritrociti ovce u esaju hemolize sa MIC koncentracijama svih jedinjenja

Jedno od mogućih objašnjenja antifungalnog dejstva tiepinskih derivata su interakcije ovih molekula sa gljivičnim DNK. Sintetisani derivati sadrže aromatične prstenove, koji imaju planarnu geometriju, pa bi se moglo očekivati da dolazi do interkalacije sa DNK. Pomoću gel elektroforeze<sup>83</sup>, ispitane su *in vitro* interakcije odabranih tiepina sa genomskom DNK *C. albicans*, nakon produžene inkubacije (12

sati) jedinjenja (25 µg/mL) sa prečišćenom DNK (dvostruki lanac velike molekulske mase). Testirana jedinjenja nisu izazvala degradaciju DNK pod opisanim uslovima. Međutim, smanjenje UV-luminiscencije nakon izlaganja etidijum-bromidu, ukazuje na interkalaciju jedinjenja **36** i **59** (slika 46), pa se njihova aktivnost bar delimično može pripisati interakciji sa ovim biomolekulom. Rezultati dobijeni ispitivanjem ponašanja jedinjenja **59** su očekivani, jer je sposobnost 2-imidazolinskih derivata da vežu DNK opisana u literaturi.<sup>84</sup>

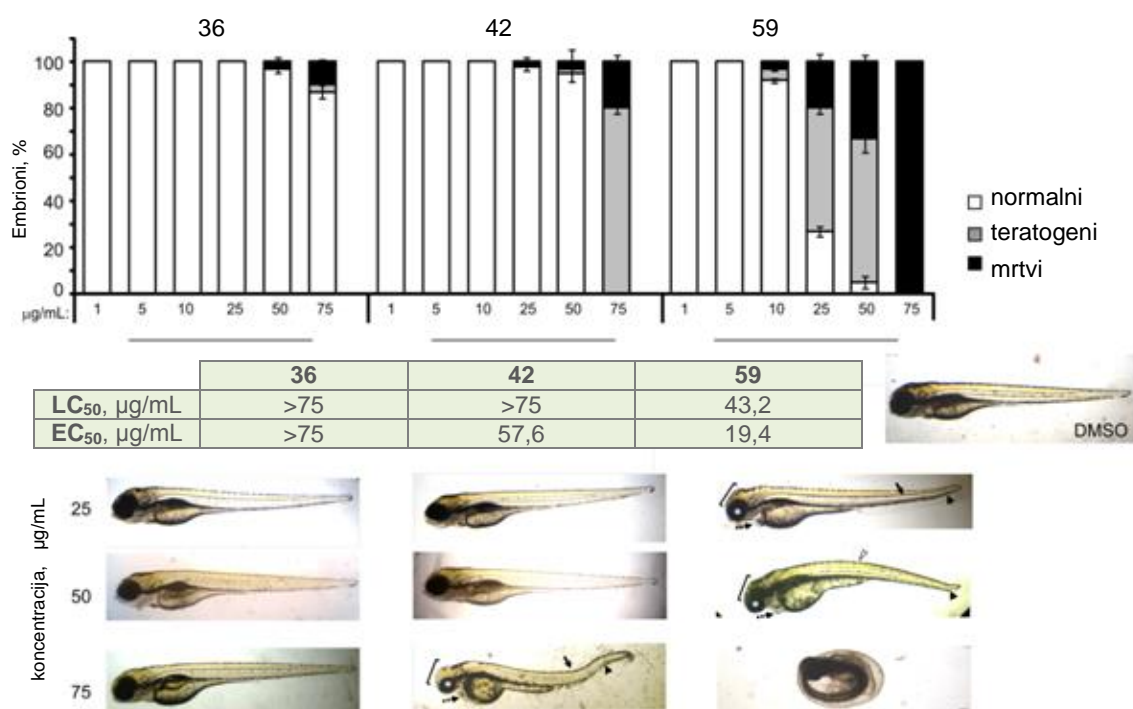


Slika 46. *In vitro* interakcije tiepina **36**, **42** i **59** i vorikonazola sa genomskom DNK iz *C. albicans* (rezultati su značajni u poređenju sa DMSO kontrolom: \*\*\* $p < 0,001$  i \*\* $p < 0,01$ ; M je standard molekulske mase)

Rezultati dobijeni u eksperimentima u kojima se koriste zebra-ribice (*Danio rerio*) dobro su korelisani sa toksičnošću i bioraspoloživošću u ljudskom organizmu, što smanjuje mogućnost neuspeha potencijalnih lekova u kasnijim fazama testiranja.<sup>85</sup> Zbog toga su letalitet i teratogenost najaktivnijih tiepinskih derivata ispitani na ovim organizmima. Prema  $LC_{50}$  i  $EC_{50}$  vrednostima, toksičnost ispitanih jedinjenja menja se u nizu: **59**>**42**>**36** (slika 47). Embrioni inkubirani sa jedinjenjem **36** do koncentracije 50 µg/mL, razvili su se bez deformiteta, a pri koncentraciji jedinjenja 75 µg/mL, samo 13% embriona je pokazalo znake toksičnosti. Pri koncentraciji jedinjenja **42** od 75 µg/mL, svi preživeli embrioni imali su ozbiljne skeletalne deformitete (lordoza, deformisan rep,



mala glava, malformacija očiju) i perikardijalni edem. Pri nižim koncentracijama, derivat **42** ispoljio je veoma malu toksičnost. Jedinjenje **59** pri koncentraciji 75  $\mu\text{g/mL}$  dovodi do potpuno letalnog ishoda, a pri nižim koncentracijama izaziva visok procenat perikardijalnog edema i skeletnih deformiteta (skolioza, deformisane oči, glava i rep). Sva tri tiepinska derivata imaju više  $\text{LC}_{50}$  vrednosti prema embrionima zebra-ribica u poređenju sa MIC prema *C. albicans*. Samo jedinjenje **59** pokazuje visoku teratogenost, sa  $\text{EC}_{50}$  vrednostima višim od MIC prema *C. albicans*. Međutim, poznato je da i vorikonazol, lek koji je u kliničkoj upotrebi, pokazuje izražen teratogeni efekat.<sup>83</sup>



Slika 47. *In vivo* toksičnost tiepina **36**, **42** i **59** prema embrionima zebra-ribica

Antibakterijska i antifungalna aktivnost sintetisanih tiepinskih derivata prvo su ispitane disk-difuzionom metodom. U preliminarnim testovima, tiepini su pokazali značajnu antifungalnu aktivnost i selektivnost prema gljivama u odnosu na bakterije. Zbog toga su vršena dodatna ispitivanja njihovih antifungalnih svojstava. Korišćenjem eseja u tečnom medijumu određene su MIC. Zatim je ispitan uticaj pet najaktivnijih derivata ( $\text{MIC} \leq 31,2 \mu\text{g/mL}$ ) na rast hifa *C. albicans*. Tri derivata koja nisu podsticala rast hifa (**36**, **42** i **59**) podvrgnuta su daljim testovima, kako bi se utvrdio mehanizam antifungalnog dejstva. Pokazano je da derivat **59** dovodi do hemolize eritrocita, što

može da ukaže da je jedna od meta njegovog dejstva ćelijska membrana. Takođe, dolazi do interkalacije jedinjenja **36** i **59** sa DNK, pa se njihova aktivnost bar delimično može pripisati interakciji sa ovim biomolekulom. U eksperimentima u kojima su korišćene zebra-ribice, derivati **36** i **42** ispoljili su veoma malu toksičnost.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja antifungalne aktivnosti i toksičnosti, može se zaključiti da bi testirani tiepini **36** i **42** mogli biti osnova za razvoj novih antifungalnih terapeutika. Trebalo bi detaljnije ispitati mehanizam antifungalnog dejstva ovih jedinjenja, posebno derivata **42**, koji ima najnižu vrednost MIC, ali ne utiče ni na jednu od ispitanih fungalnih meta (ćelijska membrana, DNK). Na osnovu poznavanja mete delovanja, mogla bi se planirati sinteza novih tiepinskih derivata, sa ciljem poboljšanja antifungalne aktivnosti. Može se primetiti da tri najaktivnija derivata (**36**, **42** i **59**) imaju supstituent u položaju C-8 osnovnog tricikličnog tiepinskog sistema. Pokazalo se da uvođenje 2-imidazolinskog prstena (jedinjenje **59**) ne povećava aktivnost, ali povećava toksičnost u odnosu na odgovarajući nesupstituisani derivat **42**. Jedinjenje **59** pokazuje visoku teratogenost, a njegova  $LC_{50}$  vrednost bliska je vrednosti MIC prema *C. albicans*. Međutim, ovo je jedini testirani derivat koji je inhibirao rast hifa *C. albicans*. Formiranje hifa vrlo je važno za formiranje biofilma, a biofilmovi *Candida* vrsta rezistentni su na većinu antifungalnih lekova. Zbog toga bi trebalo detaljno proučiti uticaj tiepina **59** na biofilm pomenutih gljiva, kako bi se donela odluka da li ovo jedinjenje treba dalje ispitivati kao potencijalni antifungalni agens.

## 4. EKSPERIMENTALNI DEO

### 4.1. Sintetičke procedure

Tačke topljenja određivane su na aparatu Boetius PMHK i nisu korigovane. IR spektri snimani su na Perkin-Elmer FT-IR 1725X spektrofotometru.  $^1\text{H}$  NMR i  $^{13}\text{C}$  NMR spektri snimani su na Bruker Ultrashield Advance III spektrometru (na 500 i 125 MHz) u navedenom rastvaraču, uz TMS kao interni standard. Hemijska pomeranja izražena su u ppm, a konstante kuplovanja ( $J$ ) u Hz. HRMS spektri snimani su na Agilent Technologies 1200 Series instrumentu koji je opremljen degaserom, autosemplerom, kolonom Zorbax Eclipse Plus C18 ( $100 \times 2,1$  mm i. d,  $1,8 \mu\text{m}$ ) i DAD detektorom u kombinaciji sa 6210 Time-of-Flight LC/MS sistemom (Agilent Technologies). Uzorci su rastvarani u metanolu, vodi ili acetonitrilu (HPLC čistoće), a po potrebi, u uzorke je dodavana mravlja kiselina. Kao mobilna faza korišćena je smeša rastvarača A (0,2% rastvor mravlje kiseline u vodi) i B (acetonitril) sa programiranim izokratnim i gradijentnim eluiranjem: 0 – 1,5 minuta 95 % A, 1,5 – 12 minuta 95-5% A, 12 – 15 minuta 5 % A, 15 – 16 minuta 5-95% A, pri protoku od 0,40 mL/min. Za detekciju signala u opsegu talasnih dužina 190-450 nm korišćen je DAD detektor. Injekciona zapremina bila je 1  $\mu\text{L}$ , a temperatura kolone 40 °C. Pozitivno naelektrisani molekularni joni dobijeni su elektrosprej jonizacijom (ESI) na atmosferskom pritisku: eluirana jedinjenja su mešana sa azotom u zagrejanom interfejsu, a polarnost je podešena na pozitivnu, sa sledećim vrednostima ES parametara: potencijal kapilare, 4000 V; temperatura gasa, 350 °C; protok gasa za sušenje, 12 L/min; pritisak nebulajzera, 45 psig (310,26 Pa); napon fragmentora, 70 V (140 V), a mase su merene u opsegu 50-2500 m/z. Za dobijanje i obradu podataka korišćen je softver MassHunter Workstation. GC-MS analiza vršena je na sistemu koji čine: Agilent Technologies 7890A gasni hromatogram, 5975C MSD i FID detektor, DB-5 MS kolona ( $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm} \times 0,25 \mu\text{m}$ ). Kao noseći gas korišćen je He (1,0 mL/min), a temperatura je linearno programirana u oblasti 40-310 °C (6 °C/min). Injekciona zapremina bila je 1  $\mu\text{L}$ , a temperatura 220 °C. Temperatura FID detektora: 300 °C. EI maseni spektri (70 eV) su snimani u opsegu 30-550 m/z. Za tankoslojnu hromatografiju (HTS) korišćene su ploče  $\text{SiO}_2$  (Merck). Za dry-flash hromatografiju korišćen je  $\text{SiO}_2$  ( $40\text{-}63 \mu\text{m}$ ). Rastvor

MeOH(NH<sub>3</sub>) je smeša MeOH/NH<sub>3</sub> aq = 9/1, and rastvor CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>(PhMe) odgovara smeši sastava CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/PhMe = 99/1.

Optimizacija geometrije jedinjenja **34** rađena je pomoću programa Jaguar 8.0 iz paketa Schrödinger Suite 2013-1 (DFT metoda, B3LYP/6-311++G\*\*).

HPLC čistoća jedinjenja određena je pomoću Agilent 1200 HPLC sistema opremljenog Quat pumpom (G1311B), injektorom (G1329B) 1260 ALS, TCC 1260 (G1316A) i detektorom 1260 DAD VL + (G1315C). Čistoća svakog jedinjenja ispitana je u dva različita sistema. HPLC analize vršene su različitim metodama.

#### *Metod A*

Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 × 150 mm, 1,8 μ, S.N. USWKY01594 kolona upotrebljena je kao stacionarna faza. Eluent je pravljen od sledećih rastvarača: 0,2 % mravlja kiselina u vodi (A) i metanol (B). Analize su vršene na UV maksimumu jedinjenja (250 nm, 254 nm, 270 nm ili 300 nm) da bi se povećala selektivnost. Jedinjenja su rastvorena u metanolu; finalne koncentracije bile su ≈1 mg/ml. Protok je bio 0,5 mL/min. Jedinjenja **19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 29, 30, 40** i **41** eluirana su protokolom: 0 – 1 minut 95 % A, 1 – 5 minuta 95 % A → 5 % A, 5 – 14 minuta 5 % A, 14 – 15 minuta 5% A → 95 % A, 15 – 16 minuta 95 % A. Jedinjenja **34, 35, 36, 37** i **38** eluirana su protokolom: 0 – 1,5 minuta 95 % A, 1,5 – 5 minuta 95 % A → 5 % A, 5 – 16 minuta 5 % A, 16 – 18 minuta 5 % A → 95 % A. Jedinjenje **42** eluirano je protokolom: 0 – 1,5 minuta 50 % A, 1,5 – 3 minuta 50 % A → 30 % A, 3 – 6 minuta 30 % A → 0 % A, 6 – 9 minuta 0 % A → 50 % A, 9 – 12 minuta 50 % A.

#### *Metod B*

Zorbax Eclipse Plus C18 4,6 × 150 mm, 1,8 μ, S.N. USWKY01594 kolona upotrebljena je kao stacionarna faza. Eluent je pravljen od sledećih rastvarača: 0,2 % mravlja kiselina u vodi (A) i acetonitril (B). Analize su vršene na UV maksimumu jedinjenja. Jedinjenja su rastvorena u metanolu; finalne koncentracije bile su ≈1 mg/ml. Protok je bio 0,5 mL/min. Jedinjenja **19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40** i **41** eluirana su protokolom: 0 – 1 minut 95 % A, 1 – 6 minuta 95 % A → 5 % A, 6 – 11 minuta 5 % A, 11 – 14 minuta 5 % A → 95 % A, 14 – 15 minuta 95 % A. Jedinjenja **36** i **37** eluirana su protokolom: 0 – 1,5 minuta 95 % A, 1,5 – 5 minuta 95 % A → 5 % A, 5 – 16 minuta 5 % A, 16 – 18 minuta 5 % A → 95 % A, 18 – 21 minuta 95 % A.

Jedinjenja **34, 35, 38** i **42** eluirana su protokolom: 0 – 1,5 minuta 50 % A, 1,5 – 3 minuta 50 % A → 30 % A, 3 – 6 minuta 30 % A → 0 % A, 6 – 9 minuta 0 % A → 50 % A, 9 – 12 minuta 50 % A. Jedinjenja **46, 48, 49, 50, 51** i **55** eluirana su protokolom: 0 – 0,5 minuta 95 % A, 0,5 - 3 minuta 95 % A → 5 % A, 3 – 13 minuta 5 % A, 13 – 14 minuta 5 % A → 95 % A, 14 – 16 minuta 95 % A. Jedinjenje **58** eluirano je protokolom: 0 – 0,5 minuta 95 % A, 0,5 - 3 minuta 95 % A → 5 % A, 3 - 13 minuta 5 % A, 13 – 14 minuta 5 % A → 95 % A, 14 – 16 minuta 95 % A.

#### *Metod C*

Zorbax Eclipse Plus C18 2,1 × 100 mm, 1,8 μ, kolona upotrebljena je kao stacionarna faza. Eluent je pravljen od sledećih rastvarača: 0,2 % mravlja kiselina u vodi (A) i metanol (B). Analize su vršene na UV maksimumu jedinjenja. Jedinjenja su rastvorena u metanolu ili metilen-hloridu; finalne koncentracije bile su ≈1 mg/ml. Protok je bio 0,2 mL/min. Jedinjenja **43, 44, 53, 54** i **56** eluirana su protokolom: 0 – 0,5 minuta 95 % A, 0,5 – 3 minuta 95 % A → 5 % A, 3 – 17 minuta 5 % A, 17 – 19 minuta 5 % A → 95 % A, 19 – 20 minuta 95 % A.

#### *Metod D*

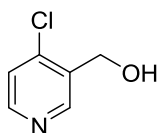
Zorbax Eclipse Plus C18 2,1 × 100 mm, 1,8 μ, kolona upotrebljena je kao stacionarna faza. Eluent je pravljen od sledećih rastvarača: 0,2 % mravlja kiselina u vodi (A) i acetonitril (B). Analize su vršene na UV maksimumu jedinjenja. Jedinjenja su rastvorena u metanolu ili metilen-hloridu; finalne koncentracije bile su ≈1 mg/ml. Jedinjenje **28** eluirano je protokolom: 0 – 1 minut 95 % A, 1 – 6 minuta 95 % A → 5 % A, 6 – 11 minuta 5 % A, 11 – 14 minuta 5 % A → 95 % A, 14 – 15 minuta 95 % A; Protok je bio 0,5 mL/min. Jedinjenja **43, 44, 53, 54** i **56** eluirana su protokolom: 0 – 0,5 minuta 95 % A, 0,5 – 3 minuta 95 % A → 5 % A, 3 – 17 minuta 5 % A, 17 – 19 minuta 5 % A → 95 % A, 19 – 20 minuta 95 % A. Protok je bio 0,2 mL/min.

#### *Metod E*

Zorbax Eclipse XDB-C18 4,6 × 50 mm, 1,8 μ, S.N. USWDY02826 kolona upotrebljena je kao stacionarna faza. Eluent je pravljen od sledećih rastvarača: 0,2 % mravlja kiselina u vodi (A) i acetonitril (B). Analize su vršene na UV maksimumu jedinjenja. Jedinjenja su rastvorena u metanolu ili metilen-hloridu; finalne koncentracije bile su ≈1 mg/ml. Protok je bio 0,5 mL/min. Jedinjenja **46, 48, 49, 50, 51, 55** i **58**

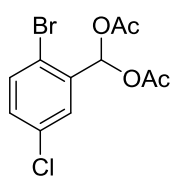
eluirana su protokolom: 0 – 0,5 minuta 95 % A, 0,5 – 3 minuta 95 % A → 5 % A, 3 – 13 minuta 5 % A, 13 – 14 min 5 % A → 95 % A, 14 – 16 min 95 % A.

#### (4-Hlorpiridin-3-il)metanol (**1**)<sup>70</sup>



U rastvor *i*-Pr<sub>2</sub>NH (0,670 mL, 4,78 mmol) u suvom THF (2,0 mL) u atmosferi Ar na -78 °C, doda se 1,6 M rastvor *n*-BuLi u heksanu (2,43 mL, 3,90 mmol). Posle 5 minuta mešanja na 0 °C, smeša se ohladi na -78 °C i koristi u sledećoj reakciji. U suspenziju 4-hlorpiridin hidrohlorida (500 mg, 3,33 mmol) u suvom THF (5 mL), u atmosferi Ar na 0 °C, doda se *n*-BuLi (2,10 mL, 3,33 mmol, 1,6 M). Posle 30 minuta mešanja na sobnoj temperaturi, reakciona smeša se ohladi na -78 °C, doda se prethodno pripremljeni rastvor LDA i mešanje nastavi na istoj temperaturi 30 minuta. U reakciju se potom doda DMF (380 µL, 4,95 mmol). Reakciona smeša se postepeno zagreje na sobnu temperaturu. Posle 18 sati mešanja, smeša se ohladi na 0 °C i reakcija se prekida dodatkom 3 M HCl. Reakciona smeša se ostavi da dostigne sobnu temperaturu i mešanje se nastavi još 2 sata. U reakcionu smešu se zatim doda zasićeni rastvor NaHCO<sub>3</sub> (do pH = 9), slojevi se odvoje i vodeni sloj ekstrahuje pomoću CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 20 mL). Spojeni organski slojevi suše se pomoću anhidrovanog Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rastvarač se ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom. Dobijeni sirovi proizvod, u obliku braon ulja, rastvori se u MeOH (25 mL) i u porcijama se doda NaBH<sub>4</sub> (187 mg, 4,95 mmol). Posle 3 sata mešanja na sobnoj temperaturi, ukloni se rastvarač. Suvi ostatak se pomoću vode prenese u levak za odvajanje, a zatim se smeša ekstrahuje CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 20 mL). Spojeni organski slojevi suše se iznad anhidrovanog Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, a zatim se rastvarač ukloni pod sniženim pritiskom. Proizvod se izoluje dry-flash hromatografijom na stubu SiO<sub>2</sub> (heksan/EtOAc = 1/1). Prinos jedinjenja **1** iz dva koraka je 206 mg (43%). Svetložuti amorfni prah, TT = 87-90 °C. IR (ATR): 3176, 2925, 2853, 1582, 1563, 1468, 1443, 1405, 1359, 1226, 1190, 1067, 830, 715 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,65 (s, 1H), 8,37 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 7,30 (d, *J* = 5,6 Hz, 1H), 4,82 (s, 2H), 4,43 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 149,4; 149,1; 143,0; 134,8; 124,4; 60,0. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 144,02063 (greška -3,01 ppm).

#### (2-Brom-5-hlorfenil)metandiil diacetat (**4**)<sup>71</sup>



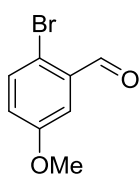
Smeša 1-brom-4-hlor-2-metilbenzena (1,0 g, 4,9 mmol), Ac<sub>2</sub>O (6,4 mL), AcOH (5,0 mL) i koncentrovane H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,5 mL) ohladi se na 0 °C, a zatim se u kapima, tokom 2 sata, dodaje pripremljeni rastvor CrO<sub>3</sub> (1,8 g, 18,0 mmol) u AcOH (5,0 mL). Posle 2 sata mešanja na 0 °C, reakciona smeša se izlije u 60 mL hladne vode. Izdvojeni talog se odvoji ceđenjem, ispere vodom (50 mL) i suši pod sniženim pritiskom. Prinos jedinjenja **4** je 1,31 g (84%). Čvrsta, bela supstanca, TT = 65-67 °C. IR (ATR): 3077, 2995, 1759, 1466, 1435, 1374, 1234, 1202, 1140, 1096, 1068, 1032, 1006, 880, 832, 602, 543 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,85 (s, 1H), 7,54-7,50 (m, 2H), 7,27-7,22 (m, 1H), 2,16 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 168,2; 136,6; 134,3; 133,9; 131,1; 128,1; 120,3; 88,4; 20,6.

#### 2-Brom-5-hlorbenzaldehyd<sup>86</sup> (**5**)



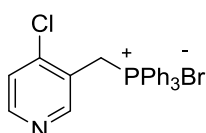
U rastvor (2-brom-5-hlorfenil)metandiil diacetata (1,5 g, 4,7 mmol) u smeši MeOH/H<sub>2</sub>O (15 mL, V/V = 1/1), doda se koncentrovana H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (1,6 mL). Posle 1 sata mešanja na temperaturi ključanja rastvarača, reakciona smeša se ohladi do sobne temperature i razblaži vodom (15 mL). Slojevi se odvoje i vodeni sloj ekstrahuje EtOAc (3×10 mL). Spojeni organski slojevi isperu se zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suše iznad anhidrovanog Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rastvarač se ukloni isparavanjem pod sniženim pritiskom. U čvrsti ostatak doda se THF (15 mL) i 1M HCl (4 mL). Reakciona smeša meša se 3 sata na temperaturi ključanja rastvarača, a zatim se rastvarač ukloni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Proizvod se prečisti dry-flash hromatografijom na stubu SiO<sub>2</sub> (heksan/EtOAc = 95/5). Prinos jedinjenja **5** je 0,84 g (83%). Čvrsta, bela supstanca, TT = 72-74 °C. IR (ATR): 3351, 3060, 2884, 1689, 1578, 1455, 1390, 1283, 1248, 1188, 1125, 1091, 1031, 899, 820, 724, 635, 526 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR<sup>87</sup> (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,30 (s, 1H), 7,88 (d, *J* = 2,5 Hz, 1H), 7,60 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,43 (dd, *J* = 2,5 Hz, *J* = 8,5 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 190,5; 135,1; 135,0; 134,6; 134,4; 129,7; 124,6. GC/MS, RT 23 min (*m/z* (%)): 218,9 ([M<sup>+</sup>] (100)); 190,9 (24); 138 (14); 110 (29); 84 (5); 75 (47); 61 (3); 50 (15).

## 2-Brom-5-metoksibenzaldehid (7) <sup>72</sup>



U rastvor 3-metoksibenzaldehida (3,03 g, 22,3 mmol) u AcOH (5,0 mL), u kapima se doda Br<sub>2</sub> (1,4 mL, 26,8 mmol, 1,2 ekviv). Posle 36 sati mešanja na sobnoj temperaturi, doda se zasićeni rastvor Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (25 mL) i smeša se izlije u 10 mL vode. U smešu se doda EtOAc (25 mL), slojevi se razdvoje i vodeni sloj ekstrahuje EtOAc (3×25 mL). Spojeni organski slojevi isperu se vodom i zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suše iznad anhidrovanog Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rastvarač se ukloni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Prinos jedinjenja **7** je 3,99 g (83%). Čvrsta, bezbojna supstanca, TT = 76-78 °C. IR (ATR): 3339, 3095, 3074, 3008, 2981, 2944, 2876, 2845, 2746, 1890, 1677, 1689, 1600, 1570, 1471, 1419, 1384, 1301, 1281, 1243, 1200, 1169, 1136, 1061, 1014, 932, 866, 820 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 10,31 (s, 1H), 7,52 (d, *J* = 9,0 Hz, 1H), 7,42 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H), 7,03 (dd, *J* = 3,0 Hz, *J* = 9,0 Hz, 1H), 3,84 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 191,8; 159,2; 134,5; 134,0; 123,1; 118,0; 112,7; 55,7. GC/MS, RT 14,92 min (*m/z* (%)): 213,9 ([M<sup>+</sup>] (100)); 184,9 (15); 171,9 (14); 156,9 (8); 144,9 (16); 134,0 (10); 106,0 (20); 92,0 (16); 75,0 (18); 63,0 (55); 50,0 (9).

## [(4-Hlorpiridin-3-il)metil](trifenil)fosfonijum-bromid (9)

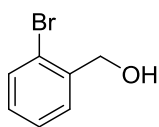


Smeša (4-hlorpiridin-3-il)metanola (0,80 g, 5,6 mmol) i PBr<sub>3</sub> (1,0 mL, 11 mmol) u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (45 mL) meša se na sobnoj temperaturi 2 sata. Reakcija se prekida pažljivim dodavanjem NaHCO<sub>3</sub> na 0 °C. Slojevi se razdvoje i vodeni sloj ekstrahuje pomoću CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 40 mL). Spojeni organski slojevi suše se iznad anhidrovanog Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Proizvod se prečisti dry-flash hromatografijom na stubu SiO<sub>2</sub> (heksan/EtOAc = 1/1). Dobijeni proizvod u obliku svetlocrvene tečnosti, rastvori se u suvom PhMe (18 mL), doda se PPh<sub>3</sub> (1,5 g, 5,9 mmol) i reakciona smeša se meša na temperaturi ključanja 5 dana. Posle hlađenja na sobnu temperaturu, talog se odvoji ceđenjem, ispere suvim Et<sub>2</sub>O i suši na 45 °C pod sniženim pritiskom. Prinos jedinjenja **9** iz dva koraka je 1,2 g (46%). Beli amorfni prah. IR (ATR): 2998, 2861, 2838, 2769, 1644, 1556, 1481, 1435, 1402, 1319, 1191, 1159, 1107, 995, 855, 751, 725, 692 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,69 (s, 1H), 8,41 (s, 1H), 7,88-7,60 (m, 15H), 7,20-7,13 (m, 1H), 5,84 (d, *J* = 14,5 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 153,1 (d, *J* = 5,5 Hz); 150,4 (d, *J* = 3,6



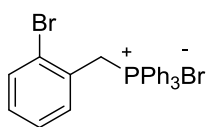
Hz); 145,6 (d,  $J = 5,5$  Hz); 135,4 (d,  $J = 2,6$  Hz); 134,2 (d,  $J = 10,0$  Hz); 130,4 (d,  $J = 12,5$  Hz); 124,3; 123,3; 117,1 (d,  $J = 84,8$  Hz); 26,2 (d,  $J = 49,6$  Hz).

### (2-Brombenzen-1-il)metanol (**11**)



U rastvor 2-brombenzaldehida (1,26 mL, 10,8 mmol) u MeOH (25 mL), doda se NaBH<sub>4</sub> (491 mg, 12,9 mmol). Reakciona smeša se meša preko noći na sobnoj temperaturi. Rastvarač se ukloni destilacijom pod sniženim pritiskom, a ostatak u balonu se pomoću vode i CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> prenese u levak za odvajanje. Slojevi se razdvoje i vodeni sloj se ekstrahuje CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 100 mL). Organski slojevi se suše iznad anhidrovanog Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rastvarač se ukloni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Prinos jedinjenja **11** je 2,00 g (99%). Svetložuto ulje. IR (ATR): 3992, 3970, 3912, 3892, 3857, 3304, 3078, 2910, 2858, 2710, 2577, 2029, 1965, 1567, 1466, 1439, 1364, 1264, 1244, 1196, 1113, 1056, 1021, 989, 939, 798 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (200 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,58-7,42 (m, 2H), 7,38-7,24 (m, 1H), 7,22-7,10 (m, 1H), 4,72 (s, 2H), 2,31 (s, 1H). <sup>13</sup>C NMR (50 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 139,7; 132,6; 129,1; 128,8; 127,6; 122,5; 65,0. GC-MS (m/z (%)): 186,0 ([M]<sup>+</sup> (43)); 169,0 (5); 157,0 (10); 107,1 (70); 89,1 (11); 79,0 (100).

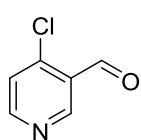
### [(2-brombenzen-1-il)metil](trifenil)fosfonijum-bromid (**13**)



Smeša (2-brombenzen-1-il)metanola (2,00 g, 10,7 mmol) i PBr<sub>3</sub> (2,00 mL, 21,3 mmol) u CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (100 mL), meša se 2 sata na sobnoj temperaturi. Reakcija se prekida pažljivim dodavanjem NaHCO<sub>3</sub> na 0 °C. Slojevi se razdvoje i vodeni sloj ekstrahuje pomoću CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 50 mL). Spojeni organski slojevi suše se iznad anhidrovanog Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Proizvod se prečisti dry-flash hromatografijom na stubu SiO<sub>2</sub> (heksan/EtOAc = 8/2). Dobijeni proizvod u obliku svetlocrvene tečnosti, rastvori se u suvom PhMe (75 mL), doda se PPh<sub>3</sub> (1,97 g, 7,62 mmol) i reakciona smeša se meša na temperaturi ključanja 5 dana. Posle hlađenja na sobnu temperaturu, talog se odvoji ceđenjem, ispere suvim Et<sub>2</sub>O i suši na 45 °C pod sniženim pritiskom. Prinos jedinjenja **13** iz dva koraka je 3,30 g, (60%). Beli prah. IR (ATR): 3038, 3015, 2984, 2941, 2855, 2773, 2689, 1585, 1475, 1437, 1401, 1321, 1273, 1190, 1160, 1108, 1028, 995, 829, 784, 756, 723 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,80-7,72 (m, 3H), 7,65-7,56 (m, 12H), 7,49-7,44 (m,

1H), 7,35-7,30 (m, 1H), 7,14-7,06 (m, 2H), 5,52 (d,  $J = 14,5$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  135,1 (d,  $J = 2,7$  Hz); 134,1 (d,  $J = 10,0$  Hz); 132,8; 132,8; 130,1 (d,  $J = 12,6$  Hz); 128,2 (d,  $J = 3,5$  Hz); 127,4 (d,  $J = 9,1$  Hz); 127,0 (d,  $J = 7,2$  Hz); 116,9 (d,  $J = 84,9$  Hz); 30,8 (d,  $J = 48,8$  Hz).

#### 4-Hlorpiridin-3-karbaldehid (2)



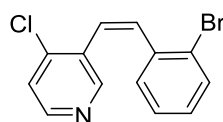
Smeša (4-hlorpiridin-3-il)metanola (92 mg, 0,65 mmol) i  $\text{MnO}_2$  (0,56 g, 6,5 mmol) u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (5 mL) meša se 2 sata na sobnoj temperaturi. Smeša se procedi, rastvarač se ukloni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Sirovi proizvod, bez prethodnog prečišćavanja, koristi se u sledećem reakcionom koraku.

#### Opšti postupak Wittig-ove reakcije

##### 3,3'-(*E* i *Z*)-Eten-1,2-diil-1-(2-brombenzen)-2-(4-hlorpiridin) (14)

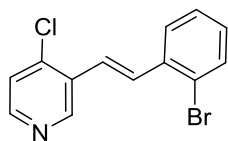
U suspenziju fosfonijum-soli **13** (338 mg, 0,660 mmol) u suvom THF (5 mL), u inertnoj atmosferi Ar, na sobnoj temperaturi, doda se sveže pripremljeni rastvor LDA u THF (0,40 mL, 0,78 mmol). Posle 30 minuta mešanja na sobnoj temperaturi, doda se 4-hlorpiridin-3-karbaldehid (92 mg, 0,65 mmol) i mešanje se nastavi na istoj temperaturi 18 sati. Reakcija se prekine dodavanjem zasićenog vodenog rastvora  $\text{NaHCO}_3$  i EtOAc. Slojevi se razdvoje i vodeni sloj ekstrahuje EtOAc ( $3 \times 10$  mL). Spojeni organski slojevi isperu se vodom i zasićenim vodenim rastvorom NaCl i suše iznad anhidrovanog  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Rastvarač se ukloni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Dry-flash hromatografijom na stubu (RP,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (PhMe)/MeOH = 7/3) odvoje se proizvodi (*Z*)-**14** (104 mg, 54%) i (*E*)-**14** (24 mg, 12%).

##### 3,3'-(*Z*)-Eten-1,2-diil-1-(2-brombenzen)-2-(4-hlorpiridin) ((*Z*)-14)



Svetložuta, čvrsta supstanca, TT = 40-41 °C. IR (ATR): 3084, 3057, 3031, 1572, 1544, 1459, 1400, 1076, 1044, 961, 820, 789, 751, 691  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,29 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,61-7,56 (m, 1H), 7,31 (d,  $J = 5,3$  Hz, 1H), 7,12-7,03 (m, 2H), 6,98-6,90 (m, 1H), 6,93 (d,  $J = 12,0$  Hz, 1H), 6,75 (d,  $J = 12,0$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  151,2; 148,7; 143,2; 136,4; 133,4; 132,9; 131,5; 130,4; 129,2; 127,2; 124,8; 124,2; 123,9. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  293,96877 (greška 2,73 ppm).

### 3,3'-(E)-Eten-1,2-diil-1-(2-brombenzen)-2-(4-hlorpiridin) ((E)-14)

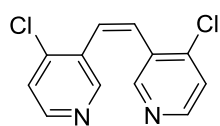


Bela, čvrsta supstanca, TT = 46-48 °C. IR (ATR): 3059, 2931, 2856, 1632, 1568, 1544, 1469, 1432, 1402, 1323, 1281, 1220, 1117, 1074, 1022, 958, 816, 750 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,92 (s, 1H), 8,40 (d, *J* = 5,3 Hz, 1H), 7,71 (dd, *J* = 7,8 Hz, *J* = 1,4 Hz, 1H), 7,62 (dd, *J* = 8,0 Hz, *J* = 0,9 Hz, 1H), 7,56 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,38-7,33 (m, 2H), 7,30 (d, *J* = 16,0 Hz, 1H), 7,22-7,16 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 149,0; 148,3; 142,4; 136,3; 133,1; 131,7; 131,5; 129,7; 127,6; 127,1; 124,5; 124,4; 124,1. GC/MS, RT 24,00 min (*m/z* (%)): 294,9 ([M]<sup>+</sup> (100)); 214,0 (78); 179,0 (74); 151,0 (67); 126,0 (14); 107,0 (17); 89,0 (12); 76,0 (29); 63,0 (15); 51,0 (9). (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 293,96765 (greška -1,09 ppm).

### 3,3'-(E ili Z)-Eten-1,2-diilbis(4-hlorpiridin) (15)

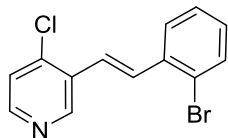
Prema postupku koji je opisan za dobijanje jedinjenja (Z)-14 i (E)-14 Wittig-ovom reakcijom, 4-hlorpiridin-3-karbaldehid (0,30 g, 2,1 mmol) i fosfonijum-so **9** (1,0 g, 2,1 mmol) pomoću LDA (2,0 mL, 4,0 mmol) transformišu se u (Z)-15 (0,23 g, 43%) i (E)-15 (12 mg, 2%).

### 3,3'-(Z)-Eten-1,2-diilbis(4-hlorpiridin) ((Z)-15)



Svetložuti prah, TT = 130-131 °C. IR (KBr): 3431, 3041, 2928, 2856, 1631, 1571, 1550, 1463, 1401, 1301, 1219, 1193, 1075, 972, 870, 816 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,34 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 8,14 (s, 2H), 7,34 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 6,90 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 150,7; 149,4; 143,4; 131,2; 127,6; 124,5. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + 2H]<sup>2+</sup> 126,00988 (greška -4,92 ppm), [M + H]<sup>+</sup> 251,01382 (greška 0,38 ppm).

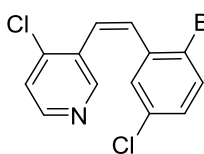
### 3,3'-(E)-Eten-1,2-diilbis(4-hlorpiridin) ((E)-15)



Bela čvrsta supstanca, TT = 127-129 °C. IR (ATR): 3098, 3048, 2958, 2930, 2866, 1896, 1636, 1573, 1549, 1474, 1408, 1315, 1223, 1175, 1073, 962, 839, 814, 740 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,91 (s, 2H), 8,44 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 7,45 (s, 2H), 7,37 (dd, *J* = 5,5 Hz, *J* = 0,5 Hz, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 149,6; 148,3; 142,8; 131,1; 125,9; 124,6. GC/MS, RT 23,29 min (*m/z* (%)): 249,9 ([M]<sup>+</sup> (100)), 214,9 (46); 188,0 (16); 179,0 (15); 152,0

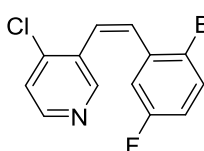
(14); 126,0 (13); 99,0 (9); 75,0 (12); 63,0 (10); 51,0 (7). (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[M + H]^+$  251,01343 (greška -1,18 ppm).

### 3-[(Z)-2-(2-Brom-5-hlorfenil)vinil]-4-hlorpiridin (16)



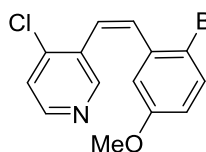
Prema postupku koji je opisan za dobijanje jedinjenja (**Z**)-**14** i (**E**)-**14** Wittig-ovom reakcijom, 2-brom-5-hlorbenzaldehyd (0,26 g, 1,2 mmol) i fosfonijum-so **9** (0,55 g, 1,2 mmol) pomoću  $KOt$ -Bu (0,16 g, 1,4 mmol) transformišu se u (**Z**)-**16** (0,27 g, 69%). Beli amorfni prah, TT = 65-67 °C. IR (ATR): 3107, 3081, 3054, 2967, 2928, 1754, 1732, 1639, 1572, 1546, 1471, 1449, 1404, 1386, 1309, 1267, 1224, 1204, 1166, 1109, 1087, 1023, 973, 936, 903, 882, 826  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,34 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H); 8,15 (s, 1H); 7,51 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H); 7,34 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H); 7,07 (dd,  $J = 2,0$  Hz,  $J = 9,0$  Hz, 1H); 6,92-6,89 (m, 1H); 6,84 (d,  $J = 11,5$  Hz, 1H); 6,79 (d,  $J = 12,0$  Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  150,9; 149,2; 143,3; 138,1; 134,0; 133,3; 132,2; 131,0; 130,1; 129,4; 126,0; 124,4; 121,8. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[M + H]^+$  327,92792 (greška -3,28 ppm).

### 3-[(Z)-2-(2-Brom-5-fluorfenil)vinil]-4-hloropiridin (17)



Prema postupku koji je opisan za dobijanje jedinjenja (**Z**)-**14** i (**E**)-**14** Wittig-ovom reakcijom, 2-brom-5-fluorbenzaldehyd (0,19 g, 0,96 mmol) i fosfonijum-so **9** (0,45 g, 0,96 mmol) pomoću  $KOt$ -Bu (0,13 g, 1,2 mmol) transformišu se u (**Z**)-**17** (196 mg, 65%). Beli amorfni prah, TT = 109-110 °C. IR (ATR): 3403, 3041, 2924, 2850, 1632, 1599, 1574, 1550, 1460, 1413, 1344, 1275, 1221, 1177, 1143, 1102, 1082, 1032, 962, 882, 819  $cm^{-1}$ .  $^1H$  NMR (500 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  8,33 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 8,16 (s, 1H), 7,54 (dd,  $J = 5,5$  Hz,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,34 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 6,90-6,75 (m, 3H), 6,64 (dd,  $J = 3,0$  Hz,  $J = 9,0$  Hz, 1H).  $^{13}C$  NMR (125 MHz,  $CDCl_3$ )  $\delta$  161,5 (d,  $J = 245,5$  Hz); 151,0; 149,2; 143,3; 138,2 (d,  $J = 8,1$  Hz); 134,2 (d,  $J = 8,1$ Hz); 132,5; 131,0; 125,9; 124,4; 118,2; 117,3 (d,  $J = 23,5$ ); 116,7 (d,  $J = 22,6$  Hz). (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[M + H]^+$  311,95854 (greška -2,14 ppm).

### 3-[(Z)-2-(2-Brom-5-metoksifenil)vinil]-4-hlorpiridin (**18**)

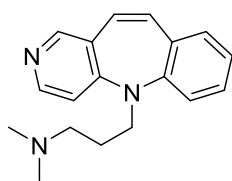


Prema postupku koji je opisan za dobijanje jedinjenja (**Z**)-**14** i (**E**)-**14** Wittig-ovom reakcijom, 2-brom-5-metoksibenzaldehid (65 mg, 0,30 mmol) i fosfonijum-so **9** (0,14 g, 0,30 mmol) pomoću KO*t*-Bu (40 mg, 0,36 mmol) transformišu se u (**Z**)-**18** (60 mg, 82%). Bezbojno ulje. IR (ATR): 3397, 3007, 2935, 2835, 2356, 1618, 1591, 1567, 1464, 1411, 1346, 1295, 1237, 1174, 1129, 1082, 1052, 1016, 934, 872, 821, 760, 691, 602 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,32 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H); 8,21 (s, 1H); 7,46 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H); 7,34 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H); 6,91 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H); 6,74 (d, *J* = 12,0 Hz, 1H); 6,69-6,64 (m, 1H); 6,46 (d, *J* = 3,0 Hz, 1H); 3,53 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158,6; 150,8; 148,4; 143,6; 137,0; 133,6; 133,6; 131,7; 124,8; 124,4; 115,7; 115,6; 114,3; 55,2. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 323,97699 (greška -4,76 ppm).

### Opšti postupak sinteze azepina reakcijom katalizovanom paladijumom

U spaljenu reakcionu kivetu, u atmosferi Ar, doda se Pd(OAc)<sub>2</sub> (5 mol%), JohnPhos (10 mol%) i NaO*t*-Bu (2,8 ekviv). Kiveta se zatvori septumom, napuni Ar i kroz septum se doda suvi toluen. Nakon 5 minuta mešanja na sobnoj temperaturi, doda se aril-halogenid (**Z**-izomer) (1 ekviv) i amin (3 ekviv), kiveta se napuni Ar i zatvori. Reakciona smeša se meša na 100 °C. Proizvodi se prečiste dry-flash hromatografijom na stubu SiO<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH(NH<sub>3</sub>) = 9/1).

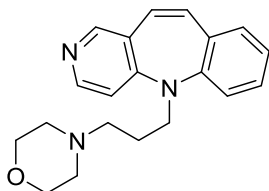
### **N,N**-Dimetil-3-(5*H*-pirido[4,3-*b*][1]benzazepin-5-il)propan-1-amin (**19**)



Prema opštoj proceduri, stilben **14** (24 mg, 0,080 mmol), pomoću 3-dimetilamino-1-propilamina (30 μL, 0,24 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,9 mg, 5 mol%), JohnPhos (2,4 mg, 10 mol%), NaO*t*-Bu (22 mg, 0,23 mmol) i toluena (1,5 mL) tokom 48 sati transformiše se u **19** (18 mg, 81%). Žuto ulje. IR (ATR): 3413, 3023, 2944, 2858, 2817, 2767, 1635, 1578, 1481, 1419, 1392, 1332, 1244, 1184, 1123, 1060, 919, 831, 794, 766 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,35 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 8,17 (s, 1H), 7,30-7,22 (m, 1H), 7,05-6,98 (m, 2H), 6,94 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 6,81 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 6,74 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 6,60 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 3,80-3,73 (m, 2H), 2,39-2,33 (m, 2H), 2,15 (s, 6H), 1,82-1,70 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 158,8; 150,5; 150,1; 149,1; 134,1; 133,6; 129,5;

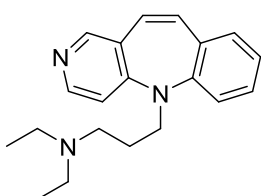
129,3; 129,2; 129,1; 124,1; 121,1; 114,7; 57,1; 48,2; 45,5; 25,4. (+)ESI-HRMS  $m/z$ : [M + H]<sup>+</sup> 280,18125 (greška 1,51 ppm). HPLC čistoća: metod A 95,15%; metod B 98,68%.

### 5-[3-(Morfolin-4-il)propil]-5H-pirido[4,3-b][1]benzazepin (20)



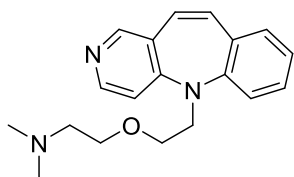
Prema opštoj proceduri, stilben **14** (24 mg, 0,080 mmol), pomoću *N*-(3-aminopropil)morfolina (36  $\mu$ L, 0,24 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,9 mg, 5 mol%), JohnPhos (2,4 mg, 10 mol%), NaO*t*-Bu (22 mg, 0,23 mmol) i toluena (1,5 mL) tokom 48 sati transformiše se u **20** (16 mg, 61%). Žuto ulje. IR (ATR): 3268, 3025, 2956, 2854, 2812, 2687, 1640, 1576, 1523, 1479, 1395, 1332, 1307, 1184, 1141, 1118, 1068, 914, 765, 735, 700 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,35 (d,  $J$  = 6,0 Hz, 1H), 8,17 (s, 1H), 7,29-7,24 (m, 1H), 7,05-7,00 (m, 2H), 6,94 (d,  $J$  = 8,5 Hz, 1H), 6,80 (d,  $J$  = 5,5 Hz, 1H), 6,73 (d,  $J$  = 11,5 Hz, 1H), 6,59 (d,  $J$  = 11,5 Hz, 1H), 3,80-3,75 (m, 2H), 3,70-3,60 (m, 4H), 2,47-2,40 (m, 2H), 2,39-2,30 (m, 4H), 1,80-1,70 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  158,8; 150,5; 150,1; 149,0; 134,1; 133,6; 129,5; 129,3; 129,2; 124,1; 121,1; 114,7; 66,9; 56,2; 53,7; 48,2; 24,2. (+)ESI-HRMS  $m/z$ : [M + H]<sup>+</sup> 322,19242 (greška 3,20 ppm). HPLC čistoća: metod A 96,52%; metod B 96,87%.

### *N,N*-Dietil-3-(5H-pirido[4,3-b][1]benzazepin-5-il)propan-1-amin (21)



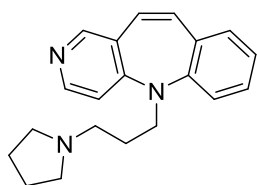
Prema opštoj proceduri, stilben **14** (24 mg, 0,080 mmol), pomoću 3-dietilamino-1-propilamina (38 $\mu$ L, 0,24 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,9 mg, 5 mol%), JohnPhos (2,4 mg, 10 mol%), NaO*t*-Bu (22 mg, 0,23 mmol) i toluena (1,5 mL) tokom 48 sati transformiše se u **21** (20 mg, 79%). Žuto ulje. IR (ATR): 3371, 3200, 2974, 1675, 1581, 1478, 1395, 1342, 1244, 1184, 1128, 794, 766, 651 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,36 (d,  $J$  = 5,5 Hz, 1H), 8,18 (s, 1H), 7,29-7,24 (m, 1H), 7,05-6,98 (m, 2H), 6,94 (d,  $J$  = 8,0 Hz, 1H), 6,81 (d,  $J$  = 6,0 Hz, 1H), 6,74 (d,  $J$  = 11,5 Hz, 1H), 6,60 (d,  $J$  = 11,0 Hz, 1H), 3,80-3,73 (m, 2H), 2,62-2,55 (m, 2H), 2,51-2,42 (m, 4H), 1,79-1,70 (m, 2H), 0,98-0,80 (m, 6H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  158,8; 150,4; 150,1; 149,0; 134,1; 133,6; 129,5; 129,3; 129,2; 129,1; 124,1; 121,2; 114,7; 49,6; 48,1; 46,8; 24,2; 11,3. (+)ESI-HRMS  $m/z$ : [M + 2H]<sup>2+</sup> 154,60980 (greška 0,62 ppm), [M + H]<sup>+</sup> 308,21276 (greška 2,05 ppm). HPLC čistoća: metod A 97,06%; metod B 98,84%.

### ***N,N*-Dimetil-2-[2-(5*H*-pirido[4,3-*b*][1]benzazepin-5-il)etoksi]etanamin (22)**



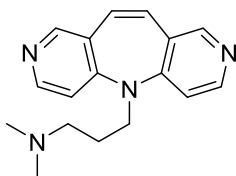
Prema opštoj proceduri, stilben **14** (24 mg, 0,080 mmol), pomoću 2-(2-dimetilamino-etoksi)-etilamina (35  $\mu$ L, 0,24 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,9 mg, 5 mol%), JohnPhos (2,4 mg, 10 mol%), NaO*t*-Bu (22 mg, 0,23 mmol) i toluena (1,5 mL) tokom 48 sati transformiše se u **22** (15 mg, 61%). Žuto ulje. IR (ATR): 3397, 3025, 2943, 2867, 2821, 2774, 1673, 1578, 1482, 1461, 1395, 1329, 1249, 1186, 1126, 1061, 916, 835, 769  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,36 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 8,18 (s, 1H), 7,30-7,25 (m, 1H), 7,06-7,01 (m, 2H), 6,97 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,84 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 6,74 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 6,60 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 4,00-3,93 (m, 2H), 3,64-3,59 (m, 2H), 3,54-3,49 (m, 2H), 2,50-2,45 (m, 2H), 2,25 (s, 6H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  158,6; 150,5; 150,1; 148,9; 134,2; 133,5; 129,6; 129,4; 129,1; 129,0; 124,3; 121,0; 114,6; 69,0; 68,2; 58,6; 50,0; 45,5. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 310,19001 (greška -4,46 ppm). HPLC čistoća: metod A 99,16%; metod B 99,17%.

### **5-[3-(Pirolidin-1-il)propil]-5*H*-pirido[4,3-*b*][1]benzazepin (23)**



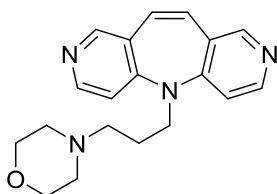
Prema opštoj proceduri, stilben **14** (24 mg, 0,080 mmol), pomoću 3-(pirolidin-1-il)propan-1-amina (31  $\mu$ L, 0,24 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,9 mg, 5 mol%), JohnPhos (2,4 mg, 10 mol%), NaO*t*-Bu (22 mg, 0,23 mmol) i toluena (1,5 mL) tokom 48 sati transformiše se u **23** (17 mg, 68%). Žuto ulje. IR (ATR): 3340, 3023, 2960, 2874, 2792, 1635, 1577, 1480, 1418, 1393, 1329, 1241, 1184, 1142, 1125, 1058, 912, 830  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,35 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 8,17 (s, 1H), 7,29-7,23 (m, 1H), 7,05-6,98 (m, 2H), 6,94 (d, *J* = 8,0 Hz, 1H), 6,81 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 6,74 (d, *J* = 11,0 Hz, 1H), 6,60 (d, *J* = 11,5 Hz, 1H), 3,81-3,73 (m, 2H), 2,57-2,50 (m, 2H), 2,46-2,37 (m, 4H), 1,85-1,77 (m, 2H), 1,76-1,69 (m, 4H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  158,8; 150,4; 150,1; 149,1; 134,1; 133,6; 129,5; 129,3; 129,2; 129,1; 124,0; 121,1; 114,7; 54,2; 53,9; 48,5; 26,7; 23,4. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 306,19553 (greška -3,09 ppm). HPLC čistoća: metod A 98,89%; metod B 99,36%.

### 3-(5*H*-Dipirido[4,3-*b*:3',4'-*f*]azepin-5-il)-*N,N*-dimetilpropan-1-amin (24)



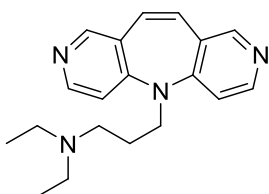
Prema opštoj proceduri, stilben **15** (150 mg, 0,597 mmol), pomoću 3-dimetilamino-1-propilamina (225  $\mu$ L, 1,80 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (6,7 mg, 5 mol%), JohnPhos (18 mg, 10 mol%), NaO*t*-Bu (161 mg, 1,68 mmol) i toluena (7,5 mL) tokom 24 sata transformiše se u **24** (146 mg, 87%). Žuto ulje. IR (film): 3382, 2948, 2864, 2823, 2780, 1641, 1579, 1479, 1398, 1335, 1248, 1176, 1062, 972, 932, 840  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,39 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 8,16 (s, 2H), 6,77 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 6,64 (s, 2H), 3,78-3,69 (m, 2H), 2,39-2,33 (m, 2H), 2,16 (s, 6H), 1,81-1,72 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  157,1; 150,7; 150,7; 131,1; 128,6; 115,4; 56,7; 47,8; 45,5; 25,0. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + 2H]<sup>2+</sup> 141,09229 (greška 4,33 ppm), [M + H]<sup>+</sup> 281,17638 (greška 1,10 ppm). HPLC čistoća: metod A 95,02%; metod B 95,17%.

### 5-[3-(Morfolin-4-il)propil]-5*H*-dipirido[4,3-*b*:3',4'-*f*]azepin (25)



Prema opštoj proceduri, stilben **15** (40 mg, 0,16 mmol), pomoću *N*-(3-aminopropil)morfolina (70  $\mu$ L, 0,48 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (1,8 mg, 5 mol%), JohnPhos (4,8 mg, 10 mol%), NaO*t*-Bu (43 mg, 0,45 mmol) i toluena (2,5 mL) tokom 24 sata transformiše se u **25** (36 mg, 69%). Žuto ulje. IR (ATR): 3627, 3386, 3028, 2954, 2854, 2812, 2687, 1672, 1638, 1576, 1480, 1397, 1334, 1252, 1178, 1140, 1117, 1064, 920, 843, 780, 735  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,39 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 8,16 (s, 2H), 6,76 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 6,63 (s, 2H), 3,81-3,76 (m, 2H), 3,66-3,57 (m, 4H), 2,48-2,41 (m, 2H), 2,40-2,34 (m, 4H) 1,82-1,74 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  157,1; 150,8; 131,2; 128,7; 115,4; 66,9; 55,8; 53,8; 47,8; 24,0. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + 2H]<sup>2+</sup> 162,09687 (greška -0,55 ppm), [M + H]<sup>+</sup> 323,18606 (greška -1,79 ppm). HPLC čistoća: metod A 99,41%; metod B 97,70%.

### 3-(5*H*-Dipirido[4,3-*b*:3',4'-*f*]azepin-5-il)-*N,N*-dietilpropan-1-amin (26)

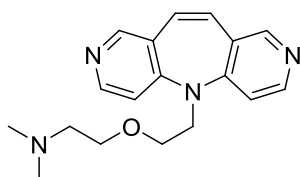


Prema opštoj proceduri, stilben **15** (20 mg, 0,080 mmol), pomoću 3-dietilamino-1-propilamina (38  $\mu$ L, 0,24 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,9 mg, 5 mol%), JohnPhos (2,4 mg, 10 mol%), NaO*t*-Bu (22 mg, 0,23 mmol) i toluena (1,5 mL) tokom 24 sata



transformiše se u **26** (12 mg, 47%). Žuto ulje. IR (ATR): 3354, 3166, 2821, 1652, 1470, 1398, 1154, 1050, 1007, 878, 830  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,39 (d,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 8,16 (s, 2H), 6,76 (d,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 6,64 (s, 2H), 3,80-3,74 (m, 2H), 2,56-2,49 (m, 2H), 2,48-2,39 (m, 4H), 1,78-1,64 (m, 2H), 0,98-0,90 (m, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  157,2; 150,8; 150,8; 131,2; 128,7; 115,5; 49,6; 47,8; 47,1; 24,6; 11,7. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  309,20590 (greška -4,78 ppm). HPLC čistoća: metod A 76,80%; metod B 87,19%.

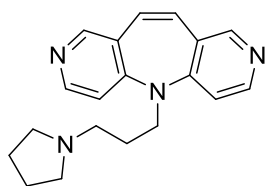
### 2-[2-(5H-Dipirido[4,3-b:3',4'-f]azepin-5-il)etoksi]-N,N-dimetiletanamin (27)



Prema opštoj proceduri, stilben **15** (20 mg, 0,080 mmol), pomoću 2-(2-dimetilamino-etoksi)-etilamina (35  $\mu\text{L}$ , 0,24 mmol),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (0,9 mg, 5 mol%), JohnPhos (2,4 mg, 10 mol%),  $\text{NaO}t\text{-Bu}$  (22 mg, 0,23 mmol) i toluena (1,5 mL)

tokom 24 sata transformiše se u **27** (13 mg, 54%). Žuto ulje. IR (ATR): 3408, 2947, 2873, 2825, 2781, 1665, 1581, 1485, 1400, 1333, 1254, 1176, 1127, 1064, 929, 844, 800, 738  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,40 (d,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 8,17 (s, 2H), 6,78 (d,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 6,64 (s, 2H), 3,99-3,94 (m, 2H), 3,68-3,62 (m, 2H), 3,53-3,47 (m, 2H), 2,46-2,41 (m, 2H), 2,22 (s, 6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156,9; 150,9; 150,8; 131,2; 128,6; 115,3; 69,4; 67,8; 58,8; 49,6; 45,8. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$  156,09666 (greška -1,90 ppm),  $[\text{M} + \text{H}]^+$  311,18522 (greška -4,55 ppm). HPLC čistoća: metod A 96,85%; metod B 97,43%.

### 5-[3-(Pirolidin-1-il)propil]-5H-dipirido[4,3-b:3',4'-f]azepin (28)

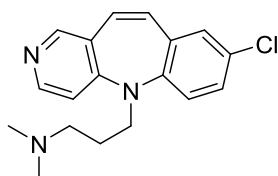


Prema opštoj proceduri, stilben **15** (20 mg, 0,080 mmol), pomoću 3-(pirolidin-1-il)propan-1-amina (31  $\mu\text{L}$ , 0,24 mmol),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (0,9 mg, 5 mol%), JohnPhos (2,4 mg, 10 mol%),  $\text{NaO}t\text{-Bu}$  (22 mg, 0,23 mmol) i toluena (1,5 mL) tokom 24 sata transformiše se

u **28** (17 mg, 69%). Žuto ulje. IR (ATR): 3330, 3028, 2958, 2858, 2803, 1732, 1645, 1580, 1483, 1398, 1335, 1248, 1178, 1063, 929, 831  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,39 (d,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 8,16 (s, 2H), 6,76 (d,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 6,64 (s, 2H), 3,82-3,75 (m, 2H), 2,58-2,52 (m, 2H), 2,47-2,39 (m, 4H), 1,86-1,79 (m, 2H), 1,78-1,71 (m, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  157,1; 150,8; 150,7; 131,2; 128,7; 115,4; 54,2; 53,6;

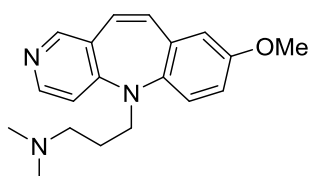
48,1; 26,4; 23,4. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[M + H]^+$  307,19048 (greška -4,04 ppm). HPLC čistoća: metod B 96,15%; metod D 96,73%.

### 3-(8-Hlor-5H-pirido[4,3-*b*][1]benzazepin-5-il)-*N,N*-dimetilpropan-1-amin (29)



Prema opštoj proceduri, stilben **16** (26 mg, 0,080 mmol), pomoću 3-dimetilamino-1-propilamina (30  $\mu$ L, 0,24 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,9 mg, 5 mol%), JohnPhos (2,4 mg, 10 mol%), NaOt-Bu (22 mg, 0,23 mmol) i toluena (1,5 mL) tokom 48 sati transformiše se u **29** (18 mg, 70%). Žuto ulje. IR (ATR): 3387, 3026, 2944, 2858, 2817, 2768, 1682, 1578, 1472, 1391, 1327, 1241, 1184, 1132, 1101, 1058, 920, 841  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,37 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 8,18 (s, 1H), 7,21 (dd,  $J = 2,5$  Hz,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 6,99 (d,  $J = 2,5$  Hz, 1H), 6,86 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 6,80 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 6,64 (s, 2H), 3,79-3,70 (m, 2H), 2,41-2,30 (m, 2H), 2,25-2,11 (m, 6H), 1,76-1,68 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  158,6; 150,6; 150,4; 147,5; 135,3; 132,7; 130,5; 129,4; 129,0; 129,0; 128,7; 122,3; 114,7; 56,9; 48,3; 45,5; 25,2. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[M + H]^+$  314,14336 (greška 4,81 ppm). HPLC čistoća: metod A 97,92%; metod B 98,44%.

### 3-(8-Metoksi-5H-pirido[4,3-*b*][1]benzazepin-5-il)-*N,N*-dimetilpropan-1-amin (30)

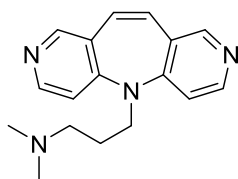


Prema opštoj proceduri, stilben **18** (26 mg, 0,080 mmol), pomoću 3-dimetilamino-1-propilamina (30  $\mu$ L, 0,24 mmol), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,9 mg, 5 mol%), JohnPhos (2,4 mg, 10 mol%), NaOt-Bu (22 mg, 0,23 mmol) i toluena (1,5 mL) tokom 48 sati transformiše se u **30** (10 mg, 40%). Žuto ulje. IR (ATR): 3381, 2944, 2858, 2819, 2768, 1674, 1634, 1578, 1480, 1394, 1322, 1276, 1244, 1206, 1038, 972, 938, 876  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,34 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 8,17 (s, 1H), 6,87 (d,  $J = 9,0$  Hz, 1H), 6,85-6,78 (m, 2H), 6,71 (d,  $J = 11,5$  Hz, 1H), 6,62 (d,  $J = 11,5$  Hz, 1H), 6,57 (d,  $J = 3,0$  Hz, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,73-3,68 (m, 2H), 2,44-2,36 (m, 2H), 2,18 (s, 6H), 1,79-1,70 (m, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  159,4; 156,1; 150,5; 150,0; 141,7; 134,8; 133,7; 129,7; 128,8; 122,0; 114,7; 114,4; 114,1; 57,1; 55,5; 48,3; 45,5; 25,4. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[M + H]^+$  310,19142 (greška 0,09 ppm). HPLC čistoća: metod A 97,17%; metod B 96,46%.

### Opšti postupak sinteze azepina nukleofilnom aromatičnom supstitucijom

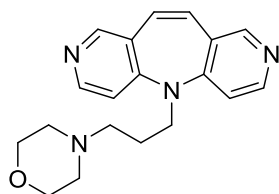
U rastvor 3,3'-(*Z*)-eten-1,2-diilbis(4-hlorpiridin) u *N*-metil-2-pirolidonu (NMP) (0,15 M), doda se amin (10 ekviv). Kiveta se zatvori i nakon toga se postavi u Biotage Initiator 2.5 mikrotalasni reaktor, na 150 °C. Posle 3 sata, reakciona smeša se ohladi, rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom, a proizvod se prečisti dry-flash hromatografijom na stubu SiO<sub>2</sub> (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH(NH<sub>3</sub>) = 9/1).

#### **3-(5*H*-Dipirido[4,3-*b*:3',4'-*f*]azepin-5-il)-*N,N*-dimetilpropan-1-amin (24)**



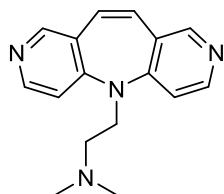
Prema opštoj proceduri, polazeći iz jedinjenja **15** (20 mg, 0,080 mmol) i 3-dimetilamino-1-propilamina (100  $\mu$ L, 0,80 mmol), u NMP (0,5 mL), dobija se azepin **24** (14 mg, 61%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,39 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 8,18 (s, 2H), 6,78 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 6,66 (s, 2H), 3,82-3,75 (m, 2H), 2,46-2,39 (m, 2H), 2,22 (s, 6H), 1,84-1,76 (m, 2H). (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 281,17612 (greška 0,16 ppm).

#### **5-[3-(Morfolin-4-il)propil]-5*H*-dipirido[4,3-*b*:3',4'-*f*]azepin (25)**



Prema opštoj proceduri, polazeći iz jedinjenja **15** (20 mg, 0,080 mmol) i *N*-(3-aminopropil)morfolina (90  $\mu$ L, 0,80 mmol), u NMP (0,5 mL), dobija se azepin **25** (16 mg, 62%). <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,39 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 8,16 (s, 2H), 6,76 (d, *J* = 6,0 Hz, 2H), 6,63 (s, 2H), 3,81-3,76 (m, 2H), 3,66-3,57 (m, 4H), 2,46-2,39 (m, 2H), 2,40-2,34 (m, 4H) 1,84-1,76 (m, 2H). (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 323,18700 (greška 1,14 ppm).

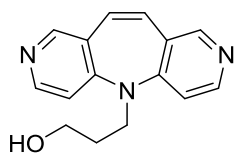
#### **2-(5*H*-Dipirido[4,3-*b*:3',4'-*f*]azepin-5-il)-*N,N*-dimetiletanamin (31)**



Prema opštoj proceduri, polazeći iz jedinjenja **15** (20 mg, 0,080 mmol) i *N,N*-dimetiletan-1,2-diamina (75  $\mu$ L, 0,80 mmol), u NMP (0,5 mL), dobija se azepin **31** (12 mg, 56%). Žuto ulje. IR (ATR): 3393, 2946, 2867, 2827, 2780, 1674, 1579, 1480, 1399, 1172, 1053, 928, 840 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,41 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 8,18 (s, 2H), 6,79 (d, *J* = 5,5 Hz, 2H), 6,65 (s, 2H), 3,90-3,83 (m, 2H), 2,60-2,52 (m, 2H), 2,28 (s,

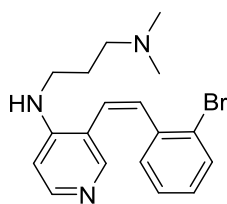
6H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156,9; 150,9; 150,8; 131,2; 128,6; 115,2; 56,4; 48,5; 45,8. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  267,16018 (greška -0,90 ppm).

### 3-(5*H*-Dipirido[4,3-*b*:3',4'-*f*]azepin-5-il)propan-1-ol (**32**)



Prema opštoj proceduri, polazeći iz jedinjenja **15** (20 mg, 0,080 mmol) i 3-(dimetilamino)propan-1-ola (60  $\mu\text{L}$ , 0,80 mmol), u NMP (0,5 mL), dobija se azepin **32** (9 mg, 45%). Žuto ulje. IR (ATR): 3172, 2920, 2867, 2480, 1660, 1569, 1477, 1399, 1323, 1249, 1168, 1071, 908, 844, 789, 755, 729  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,39 (d,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 8,17 (s, 2H), 6,79 (d,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 6,66 (s, 2H), 3,94-3,86 (m, 2H), 3,82-3,74 (m, 2H), 1,93-1,84 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  156,9; 150,7; 150,7; 131,2; 128,7; 115,4; 60,0; 46,6; 29,5. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  254,12827 (greška -2,05 ppm).

### *N'*-{3-[(*Z*)-2-(2-bromfenil)vinil]piridin-4-il}-*N,N*-dimetilpropan-1,3-diamin (**33**)



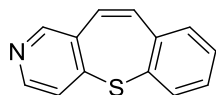
Prema opštoj proceduri sinteze azepina nukleofilnom aromatičnom supstitucijom, polazeći iz jedinjenja **14** (30 mg, 0,102 mmol) i 3-dimetilamino-1-propilamina (130  $\mu\text{L}$ , 1,02 mmol), u NMP (0,6 mL), dobija se jedinjenje **33** (23 mg, 64%). Žuto ulje. IR (ATR): 3324, 2940, 2858, 2819, 2781, 1700, 1594, 1570, 1519, 1464, 1404, 1338, 1061, 1025, 757  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,10 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 7,90 (s, 1H), 7,56-7,51 (m, 1H), 7,10-7,06 (m, 1H), 7,05-7,01 (m, 1H), 6,84 (d,  $J = 11,5$  Hz, 1H), 6,47 (d,  $J = 11,5$  Hz, 1H), 6,39 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 3,19-3,13 (m, 2H), 2,37-2,31 (m, 2H), 2,22 (s, 6H), 1,70-1,64 (m, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  150,9; 149,3; 149,2; 136,8; 132,60; 132,2; 130,1; 129,0; 127,1; 124,9; 123,8; 117,2; 104,3; 58,2; 45,4; 42,3; 25,8. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  360,10654 (greška -1,25 ppm).

### Opšti postupak sinteze tiepina reakcijom katalizovanom paladijumom

U spaljenu kivetu, u atmosferi argona, doda se tris(dibenzilidenaceton)dipaladijum ( $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ , 5 mol%), dppf (10 mol%),  $\text{NaOt-Bu}$  (1,2 ekviv) i toluen. Posle 5 minuta mešanja na sobnoj temperaturi, doda se aril-halogenid (1 ekviv) i kalijum-tioacetat (1,2 ekviv). Kiveta se napuni Ar i postavi u Biotage Initiator 2.5 mikrotalasni reaktor na 170  $^\circ\text{C}$ . Posle 60 minuta zagrevanja, reakciona smeša se ohladi, procedi kroz hifl i ispere

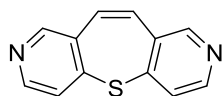
CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom, a proizvod se prečisti dry-flash hromatografijom na stubu SiO<sub>2</sub> (heksan/EtOAc = 8/2).

#### [1]Benzotiepino[3,2-*c*]piridin (**34**)



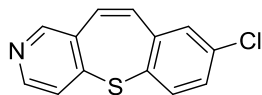
Prema opštem postupku za sintezu tiepina, jedinjenje **14** (35 mg, 0.12 mmol) pomoću KSCoCH<sub>3</sub> (16 mg, 0.14 mmol), NaO*t*-Bu (14 mg, 0.14 mmol), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (5.4 mg, 5 mol %), dppf (6.6 mg, 10 mol %) i PhMe (1.5 mL) transformiše se u **34** (13 mg, 51 %). Bela, čvrsta supstanca, TT = 80-82 °C. IR (ATR): 3056, 3025, 2927, 2855, 1738, 1629, 1563, 1538, 1471, 1442, 1416, 1389, 1306, 1275, 1174, 1056, 885, 836 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.48-8.44 (m, 2H), 7.48-7.44 (m, 1H), 7.36-7.28 (m, 3H), 7.28-7.24 (m, 1H), 7.13 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H), 6.99 (d, *J* = 12.5 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 149.9; 149.8; 144.7; 139.7; 136.1; 135.4; 133.0; 132.7; 130.4; 129.9; 129.7; 128.7; 126.3. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 212.05209 (greška -3.58 ppm). HPLC čistoća: metod A 95.16%; metod B 98.30%.

#### Pirido[3',4':6,7]tiepino[3,2-*c*]piridin (**35**)



Prema opštem postupku za sintezu tiepina, jedinjenje **15** (30 mg, 0.12 mmol) pomoću KSCoCH<sub>3</sub> (16 mg, 0.14 mmol), NaO*t*-Bu (14 mg, 0.14 mmol), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (5.4 mg, 5 mol %), dppf (6.6 mg, 10 mol %) i PhMe (1.5 mL) transformiše se u **35** (15 mg, 60 %). Bela, čvrsta supstanca, TT = 139-140 °C. IR (film): 3024, 2930, 1565, 1542, 1473, 1390, 1294, 1268, 1178, 1047, 885, 835 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8.51 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 8.47 (s, 2H), 7.32 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H), 7.08 (s, 2H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 150.6; 150.3; 142.9; 134.9; 132.8; 126.6. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 213.04721 (greška -4.14 ppm). HPLC čistoća: metod A 95.02%; metod B 99.57%.

#### 8-Hlor[1]benzotiepino[3,2-*c*]piridin (**36**)

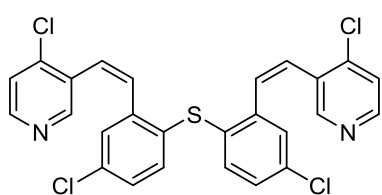


Prema opštem postupku za sintezu tiepina, jedinjenje **16** (29 mg, 0.088 mmol) pomoću KSCoCH<sub>3</sub> (12 mg, 0.11 mmol), NaO*t*-Bu (10 mg, 0.11 mmol), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (4.0 mg, 5 mol %), dppf (4.9 mg, 10 mol %) i PhMe (1.1 mL) transformiše se u **36** (6.8 mg, 32 %). Bela, čvrsta supstanca, TT = 132-136 °C. IR (ATR): 3965, 3356, 3080, 3048, 3021, 2959, 2928, 2855, 2024, 1989, 1952, 1919,

1894, 1852, 1812, 1754, 1676, 1630, 1569, 1546, 1468, 1395, 1362, 1306, 1273, 1195, 1163, 1099, 1053, 1027, 976, 946  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,48 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1H), 8,46 (s, 1H), 7,38 (d,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 7,34 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1H), 7,29 (dd,  $J = 2,0$  Hz,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 7,25-7,22 (m, 1H), 7,03 (s, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  150,2; 150,0; 144,4; 141,1; 135,1; 134,9; 134,7; 134,1; 131,7; 131,1; 129,7; 129,3; 126,3. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  246,01318 (greška -2,80 ppm). HPLC čistoća: metod A 96,97%; metod B 97,42%.

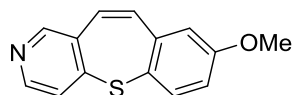
Kao sporedni proizvod izoluje se jedinjenje **39** (1,4 mg, 3%).

### 3, 3'-{Tiobis[(6-hlor-3,1-fenilen)(Z)eten-2,1-diil]}bis(4-hlorpiridin) (**39**)



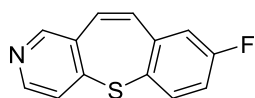
Prinos: Bezbojno ulje.  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,33 (d,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 8,14 (s, 2H), 7,34 (d,  $J = 5,5$  Hz, 2H), 7,14 (dd,  $J = 2,5$  Hz,  $J = 8,5$  Hz, 2H), 7,08 (d,  $J = 8,0$  Hz, 2H), 6,97 (d,  $J = 2,5$  Hz, 2H), 6,90 (d,  $J = 12,0$  Hz, 2H), 6,76 (d,  $J = 12,0$  Hz, 2H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  150,7; 149,1; 143,3; 138,9; 133,6; 133,1; 132,6; 131,1; 130,5; 129,8; 128,9; 126,3; 124,5. IR (ATR): 3039, 2969, 2926, 2853, 1574, 1546, 1467, 1451, 1402, 1266, 1222, 1195, 1159, 1100, 1080, 1047, 904, 883, 826  $\text{cm}^{-1}$ . (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + 2\text{H}]^{2+}$  264,99632 (greška -1,39 ppm),  $[\text{M} + \text{H}]^+$  528,98636 (greška 0,48 ppm).

### 8-Metoksi[1]benzotiepino[3,2-c]piridin (**37**)



Prema opštem postupku za sintezu tiepina, jedinjenje **18** (60 mg, 0.18 mmol) pomoću  $\text{KSCoCH}_3$  (25 mg, 0,22 mmol),  $\text{NaOt-Bu}$  (21 mg, 0,22 mmol),  $\text{Pd}_2\text{dba}_3$  (8,5 mg, 5 mol %),  $\text{dppf}$  (10,0 mg, 10 mol %) i  $\text{PhMe}$  (2,3 mL) transformiše se u **37** (8,4 mg, 19 %). Bezbojno ulje. IR (ATR): 3597, 3392, 3022, 2928, 2841, 1710, 1591, 1564, 1471, 1389, 1324, 1278, 1243, 1210, 1176, 1153, 1068, 1030, 926, 857, 829  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,49-8,42 (m, 2H), 7,38-7,32 (m, 2H), 7,08 (d,  $J = 12,5$  Hz, 1H), 6,98 (d,  $J = 12,0$  Hz, 1H), 6,87 (dd,  $J = 3,0$  Hz,  $J = 8,5$  Hz, 1H), 6,78 (d,  $J = 3,0$  Hz, 1H), 3,79 (s, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  160,1; 150,0; 149,7; 145,4; 140,9; 135,9; 135,4; 134,1; 130,7; 126,0; 123,7; 115,6; 114,7; 55,4. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  242, 06256 (greška -3,51 ppm). HPLC čistoća: metod A 95,03%; metod B 95,05%.

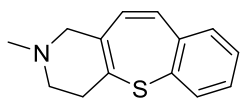
### 8-Fluor[1]benzotiepino[3,2-c]piridin (38)



Prema opštem postupku za sintezu tiepina, jedinjenje **17** (30 mg, 0.096 mmol) pomoću KSCoCH<sub>3</sub> (13 mg, 0,12 mmol), NaOt-Bu (11 mg, 0,12 mmol), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (4,4 mg, 5 mol %), dppf (5,3 mg, 10 mol %) i PhMe (1,2 mL) transformiše se u **38** (7,6 mg, 35 %). Bela, čvrsta supstanca, TT = 110-112 °C. IR (ATR): 3336, 2923, 2854, 1740, 1682, 1647, 1598, 1568, 1468, 1391, 1310, 1245, 1205, 1177, 1121, 1058. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,48 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 8,47 (s, 1H), 7,42 (dd, *J* = 5,5 Hz, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,35 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 7,09-7,01 (m, 3H), 6,96 (dd, *J* = 2,5 Hz, *J* = 9,0 Hz, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 163,0 (d, *J* = 247,2 Hz); 150,1; 150,0; 144,7; 141,7 (d, *J* = 8,1 Hz); 135,1; 134,9; 134,6 (d, *J* = 8,1 Hz); 131,5; 127,9; 126,2; 116,8 (d, *J* = 21,8 Hz); 116,2 (d, *J* = 22,5 Hz). (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 230,04321 (greška -0,94 ppm). HPLC čistoća: metod A 97,35%; metod B 99,69%.

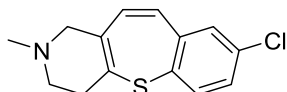
### Opšti postupak metilovanja i redukcije

#### 2-Metil-1,2,3,4-tetrahidro[1]benzotiepino[3,2-c]piridin (40)



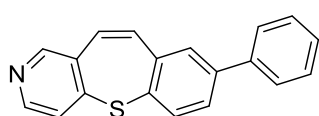
U rastvor **34** (17 mg, 0,080) u CH<sub>3</sub>CN (3 mL), doda se MeI (20 μL, 0,322 mmol, 4 ekviv). Posle 2 sata mešanja na temperaturi ključanja rastvarača, rastvarač se ukloni isparavanjem pod sniženim pritiskom, a čvrsti ostatak se rastvori u MeOH (3 mL) i doda se NaBH<sub>4</sub> (3,0 mg, 1 ekviv). Posle 15 minuta mešanja na sobnoj temperaturi, MeOH se ukloni isparavanjem pod sniženim pritiskom, a ostatak se rastvori u EtOAc (10 mL). U rastvor se doda voda, slojevi se razdvoje i organski sloj suši se iznad anhidrovanog Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Proizvod se prečisti dry-flash hromatografijom na stubu SiO<sub>2</sub> (EtOAc /MeOH = 1/1). Prinos proizvoda **40** je 15 mg (79%). Mrko ulje. IR (ATR): 3345, 3204, 3054, 3007, 2923, 2847, 2784, 2732, 2680, 1960, 1724, 1678, 1606, 1465, 1441, 1377, 1377, 1288, 1264, 1067, 1000, 973, 907, 784, 746 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 7,34-7,23 (m, 3H), 7,22-7,16 (m, 1H), 6,99 (d, *J* = 12,0, 1H), 6,23 (d, *J* = 12,0, 1H), 3,04 (s, 2H), 2,56 (s, 4H), 2,37 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 140,6; 135,1; 134,9; 133,9; 132,3; 132,0; 129,4; 129,2; 128,6; 127,9; 58,1; 52,0; 45,0; 34,2. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 230,09977 (greška -0,11 ppm). HPLC čistoća: metod A 92,09%; metod B 93,89%.

### 8-Hlor-2-metil-1,2,3,4-tetrahidro[1]benzotiepino[3,2-c]piridin (41)



Prema proceduri opisanoj za sintezu **40**, jedinjenje **36** (17 mg, 0,068 mmol) pomoću MeI (25  $\mu$ L, 0,27 mmol), CH<sub>3</sub>CN (3 mL), NaBH<sub>4</sub> (6,0 mg, 0,13 mmol) i MeOH (3 mL) transformiše se u **41** (11,8 mg, 66 %). Žuto ulje. IR (ATR): 3012, 2922, 2844, 2784, 2384, 1735, 1636, 1575, 1546, 1461, 1375, 1290, 1263, 1188, 1150, 1128, 1097, 1065, 813 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  7,28-7,22 (m, 2H), 7,16 (s, 1H), 6,88 (d, *J* = 12,5, 1H), 6,27 (d, *J* = 12,0, 1H), 2,99 (s, 2H), 2,52 (s, 4H), 2,34 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  142,0; 135,7; 133,9; 133,4; 133,4; 133,33; 132,5; 129,7; 129,2; 128,2; 58,3; 52,1; 45,2; 34,5. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 264,06121 (greška 1,45 ppm). HPLC čistoća: metod A 95,61%; metod B 95,31%.

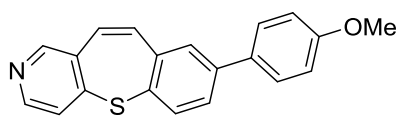
### 8-Fenil[1]benzotiepino[3,2-c]piridin (42)



U spaljenu reakcionu kivetu, u atmosferi argona, doda se Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,9 mg, 1 mol %), SPhos (1,7 mg, 2 mol %), fenilboronska kiselina (29,8 mg, 0,244 mmol, 1,2 ekviv) i anhidrovani K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (86,2 mg, 0,406 mmol, 2,0 ekviv). Kiveta se zatvori septumom, napuni Ar i kroz septum se doda suvi toluen (2,5 mL). Posle 2 minuta mešanja na sobnoj temperaturi, doda se 8-hlor[1]benzotiepino[3,2-c]piridin (50,0 mg, 0,203 mmol). Kiveta se napuni Ar i zatvori. Posle 18 sati mešanja na 100 °C, reakciona smeša se ohladi, doda se CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i dobijena suspenzija se procedi kroz hifl. Rastvarač se ukloni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Dry-flash hromatografijom na stubu SiO<sub>2</sub> (heksan/EtOAc = 8/2) izoluje se proizvod **42** (29 mg, 50 %). Beli film. IR (ATR): 3389, 3026, 2925, 2852, 1670, 1565, 1542, 1470, 1389, 1265, 1174, 1069, 1045, 836 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  8,51-8,44 (m, 2H), 7,59-7,34 (m, 9H), 7,19 (d, *J* = 12,5, 1H), 7,03 (d, *J* = 12,0, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  150,0; 149,9; 144,7; 142,0; 140,0; 139,7; 136,1; 135,4; 133,4; 131,6; 130,7; 128,9; 128,5; 128,4; 127,9; 127,0; 126,3. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 288,08543 (greška 4,46 ppm). HPLC čistoća: metod A 99,91%; metod B 95,82%.

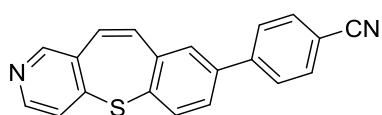


#### 8-(4-Metoksifenil)[1]benzotiepino[3,2-*c*]piridin (**43**)



U spaljenu reakcionu kivetu, u atmosferi argona, doda se Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,3 mg, 1 mol %), SPhos (1,0 mg, 2 mol %), 4-metoksifenilboronska kiselina (22,3 mg, 0,146 mmol, 1,2 ekviv) i anhidrovani K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (51,8 mg, 0,224 mmol, 2,0 ekviv). Kiveta se zatvori septumom, napuni Ar i kroz septum se doda suvi toluen (1,5 mL). Posle 2 minuta mešanja na sobnoj temperaturi, doda se 8-hlor[1]benzotiepino[3,2-*c*]piridin (30,0 mg, 0,122 mmol). Kiveta se napuni Ar i zatvori. Posle 18 sati mešanja na 100 °C, reakciona smeša se ohladi, doda se CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i dobijena suspenzija se procedi kroz hi fl. Rastvarač se ukloni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Dry-flash hromatografijom na stubu SiO<sub>2</sub> (heksan/EtOAc = 8/2) izoluje se proizvod **43** (24,0 mg, 62%). Bela, čvrsta supstanca, TT = 133-134 °C. IR (ATR): 3023, 2959, 2842, 1607, 1567, 1543, 1510, 1467, 1390, 1301, 1265, 1242, 1171, 1025, 835, 806 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,50-8,42 (m, 2H), 7,52-7,44 (m, 4H), 7,42-7,38 (m, 1H), 7,36-7,33 (m, 1H), 7,16 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H), 7,02-6,93 (m, 3H), 3,83 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159,5; 149,9; 149,8; 144,7; 141,5; 139,9; 136,1; 135,4; 133,8; 132,7; 130,8; 130,5; 128,0; 128,0; 127,9; 126,2; 114,3; 55,3. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 318,09491 (greška 0,63 ppm). HPLC čistoća: metod C 95,27%; metod D 97,08%.

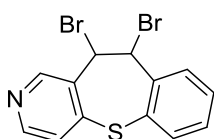
#### 4-[1]Benzotiepino[3,2-*c*]piridin-8-ilbenzonitril (**44**)



U spaljenu reakcionu kivetu, u atmosferi argona, doda se Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,3 mg, 1 mol %), SPhos (1,0 mg, 2 mol %), 4-cijanofenilboronska kiselina (21,4 mg, 0,146 mmol, 1,2 ekviv) i anhidrovani K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (51,8 mg, 0,224 mmol, 2,0 ekviv). Kiveta se zatvori septumom, napuni Ar i kroz septum se doda suvi toluen (2,0 mL). Posle 2 minuta mešanja na sobnoj temperaturi, doda se 8-hlor[1]benzotiepino[3,2-*c*]piridin (30,0 mg, 0,122 mmol). Kiveta se napuni Ar i zatvori. Posle 18 sati mešanja na 100 °C, reakciona smeša se ohladi, doda se CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> i dobijena suspenzija se procedi kroz hi fl. Rastvarač se ukloni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Dry-flash hromatografijom na stubu SiO<sub>2</sub> (heksan/EtOAc = 8/2) izoluje se proizvod **44** (14,0 mg, 36%). Svetložuto ulje. IR (ATR): 3311, 2954, 2921, 2851, 2226, 1771, 1735, 1651, 1561, 1540, 1519, 1465, 1373, 1266, 1178, 824, 737 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,52-8,45 (m,

2H), 7,76-7,70 (m, 2H), 7,68-7,61(m, 2H), 7,59-7,50 (m, 2H), 7,47-7,44 (m, 1H), 7,37 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1H), 7,18 (d,  $J = 12,0$  Hz, 1H), 7,06 (d,  $J = 12,0$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  150,1; 150,0; 144,4; 144,1; 140,3; 139,8; 135,6; 135,2; 133,7; 133,4; 132,7; 131,3; 128,4; 127,6; 126,3; 118,6; 111,6. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  313,07895 (greška -1,42 ppm). HPLC čistoća: metod C 95,11%; metod D 95,18%.

#### 10,11-dibrom-10,11-dihidro[1]benzotiepino[3,2-*c*]piridin (**45**)



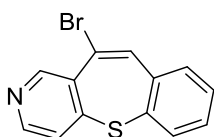
U rastvor **34** (4,2 mg, 0.020 mmol) u  $\text{CCl}_4$  (0,1 mL), doda se rastvor  $\text{Br}_2$  u  $\text{CCl}_4$  (0,2 mL, 1,1 ekviv, 0,1M). Posle 16 sati mešanja na sobnoj temperaturi, reakciona smeša se ispere zasićenim vodenim rastvorom  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  i vodom, i suši nad anhidrovanim  $\text{MgSO}_4$ . Rastvarač se ukloni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Kristalizacijom iz EtOH dobija se **45** (7,3 mg, 100%). Svetlocrveni kristali, TT = 138-140 °C. IR (ATR): 3405, 3169, 3043, 2958, 2928, 2852, 2585, 2361, 1714, 1626, 1574, 1513, 1458, 1263, 1099, 1021, 805, 765, 735, 699, 619  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,45 (s, 1H), 8,34 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1H), 7,44 (dd,  $J = 7,8$  Hz,  $J = 1,8$  Hz, 1H), 7,38-7,26 (m, 3H), 7,23 (d,  $J = 5,5$  Hz, 1H), 5,79 (d,  $J = 7,0$  Hz, 1H), 5,71 (d,  $J = 7,0$  Hz, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  153,0; 148,2; 145,4; 136,6; 132,8; 132,6; 131,4; 129,8; 129,3; 127,4; 122,0; 52,7; 50,8. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  369,88848 (greška -2,81 ppm).

#### 11-Brom[1]benzotiepino[3,2-*c*]piridin (**46**) i

#### 10-brom[1]benzotiepino[3,2-*c*]piridin (**47**)

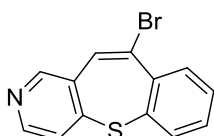
U rastvor vicinalnog dibromida **45** (61,0 mg, 0,164 mmol) u suvom *terc*-butanolu (2,2 mL), doda se  $\text{KO}t\text{-Bu}$  (22,1 mg, 0,197 mmol, 1,2 ekviv). Posle 2 sata mešanja na temperaturi ključanja, reakciona smeša se izlije u smešu led/voda, a potom se rastvarač ukloni isparavanjem pod sniženim pritiskom. U suvi ostatak doda se dietil-etar i voda, slojevi se razdvoje i organski sloj se ispere zasićenim vodenim rastvorom  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  i vodom, i suši nad anhidrovanim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Rastvarač se ukloni isparavanjem pod sniženim pritiskom. Dry-flash hromatografijom na stubu  $\text{SiO}_2$  (heksan/EtOAc = 9/1), odvoje se proizvodi **46** (37,7 mg, 78%) i **47** (5,7 mg, 12%).

#### 11-Brom[1]benzotiepino[3,2-c]piridin (46)



Bezbojno ulje. IR (ATR): 3362, 3048, 2924, 2852, 1729, 1604, 1561, 1535, 1467, 1432, 1396, 1271, 1166, 1055, 910, 830, 768, 749  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,97 (s, 1H), 8,49 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1H), 7,82 (s, 1H), 7,51-7,46 (m, 1H), 7,38-7,35 (m, 1H), 7,35-7,30 (m, 2H), 7,28-7,24 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  152,2; 150,5; 146,1; 138,7; 138,3; 136,0; 133,4; 133,0; 129,8; 129,2; 128,9; 126,2; 122,8. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  289,96339 (greška 0,11 ppm). HPLC čistoća: metod B 95,05%; metod E 95,14%.

#### 10-Brom[1]benzotiepino[3,2-c]piridin (47)

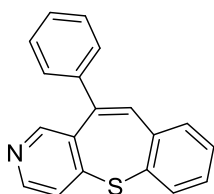


Bezbojno ulje. IR (ATR): 3359, 3056, 3026, 2924, 2852, 1732, 1612, 1565, 1539, 1492, 1469, 1444, 1396, 1367, 1260, 1239, 1177, 1056, 948, 924, 828, 772, 750, 739, 702  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,53-8,43 (m, 2H), 7,85-7,77 (m, 1H), 7,70 (s, 1H), 7,50-7,45 (m, 1H), 7,42-7,31 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  149,6; 149,4; 145,4; 140,2; 134,6; 134,2; 133,2; 131,4; 131,0; 129,0; 128,6; 126,3. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  289,96228 (greška - 3,71 ppm).

#### Opšti postupak Suzukijeve reakcije sa 11-brom[1]benzotiepino[3,2-c]piridinom (46) i 10-brom[1]benzotiepino[3,2-c]piridinom (47)

U rastvor  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (3 mol %) u suvom dimetoksi-etanu, doda se trifenilfosfin (12 mol %). Posle 10 minuta mešanja na sobnoj temperaturi, u atmosferi Ar, u rastvor se doda odgovarajući bromid (46 ili 47) i vodeni rastvor  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (2M). Posle 5 minuta mešanja na sobnoj temperaturi, doda se rastvor arilboronske kiseline (1,25 ekviv) u EtOH. Posle 18 sati mešanja na 90 °C, reakciona smeša se ohladi, doda se  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  i dobijena suspenzija se procedi kroz hifl. Rastvarač se ukloni isparavanjem pod sniženim pritiskom, a proizvod se prečisti dry-flash hromatografijom na stubu  $\text{SiO}_2$  (heksan/EtOAc = 8/2).

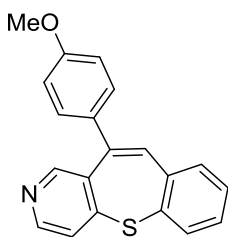
#### 11-Fenil[1]benzotiepino[3,2-c]piridin (48)



Prema opštem postupku za Suzukijevu reakciju, jedinjenje 46 (8,0 mg, 0,028 mmol) pomoću fenilboronske kiseline (4,2 mg, 0,034 mmol, 1,25 ekviv),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (0,2 mg, 3 mol%),  $\text{PPh}_3$  (0,9 mg, 12

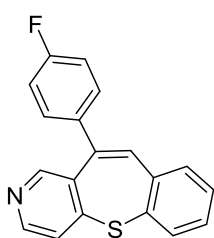
mol %), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (aq) (2M, 20 μL), EtOH (100 μL) i DME (150 μL) transformiše se u **48** (3,9 mg, 50%). Bela, čvrsta supstanca, TT = 134-135 °C. IR (ATR): 3055, 3028, 2924, 2852, 1608, 1563, 1538, 1493, 1469, 1445, 1394, 1369, 1272, 1068, 1032, 833, 762, 700 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,47 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 8,21 (s, 1H), 7,53-7,50 (m, 1H), 7,49-7,47 (m, 1H), 7,46-7,44 (m, 1H), 7,42-7,28 (m, 8H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 151,6; 149,5; 146,6; 143,4; 143,0; 139,8; 137,5; 134,1; 133,7; 132,6; 129,6; 129,1; 128,8; 128,6; 128,5; 128,2; 126,7. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 288,08333 (greška -2,58 ppm). HPLC čistoća: metod B 99,65%; metod E 95,48%.

#### 11-(4-Metoksifenil)[1]benzotiepino[3,2-*c*]piridin (**49**)



Prema opštem postupku za Suzukijevu reakciju, jedinjenje **46** (12,0 mg, 0,041 mmol) pomoću 4-metoksifenilboronske kiseline (7,8 mg, 0,052 mmol, 1,25 ekviv), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,3 mg, 3 mol%), PPh<sub>3</sub> (1,3 mg, 12 mol %), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (aq) (2M, 30 μL) i DME (220 μL) transformiše se u **49** (11,9 mg, 92%). Bela, čvrsta supstanca, TT = 153-155 °C. IR (ATR): 3278, 3033, 3003, 2954, 2926, 2851, 1734, 1605, 1565, 1511, 1468, 1394, 1370, 1294, 1252, 1181, 1034, 832, 752 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,46 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 8,23 (s, 1H), 7,52-7,46 (m, 2H), 7,42-7,26 (m, 6H), 6,97-6,89 (m, 2H), 3,85 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159,7; 151,7; 149,4; 146,5; 142,9; 140,0; 137,6; 135,5; 134,1; 132,6; 132,5; 130,0; 129,4; 128,9; 128,5; 126,7; 114,0; 55,4. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 318,09501 (greška 0,95 ppm). HPLC čistoća: metod B 96,94%; metod E 97,85%.

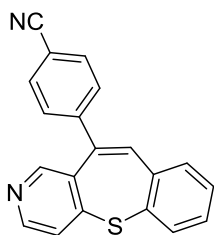
#### 11-(4-Fluorfenil)[1]benzotiepino[3,2-*c*]piridin (**50**)



Prema opštem postupku za Suzukijevu reakciju, jedinjenje **46** (20,0 mg, 0,069 mmol) pomoću 4-fluorfenilboronske kiseline (12,0 mg, 0,086 mmol, 1,25 ekviv), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,5 mg, 3 mol%), PPh<sub>3</sub> (2,2 mg, 12 mol %), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (aq) (2M, 60 μL), EtOH (300 μL) i DME (450 μL) transformiše se u **50** (12,6 mg, 60%). Bela, čvrsta supstanca, TT = 131-133 °C. IR (ATR): 3301, 3223, 3048, 2923, 2852, 1734, 1600, 1564, 1539, 1507, 1468, 1394, 1268, 1232, 1160, 834, 740 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,48 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 8,19 (s, 1H), 7,54-7,47 (m, 2H), 7,43-7,28 (m, 6H), 7,14-7,05 (m, 2H).

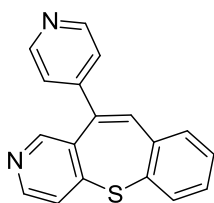
$^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  162,8 (d,  $J = 246,5$  Hz); 151,5; 149,6; 146,6; 142,3; 139,6; 139,1; 137,3; 134,1; 133,7; 132,7; 130,5 (d,  $J = 8,0$  Hz); 129,5; 129,2; 128,6; 126,8; 115,6 (d,  $J = 20,8$  Hz). (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  306,07480 (greška 0,23 ppm). HPLC čistoća: metod B 99,31%; metod E 97,85%.

#### 4-[1]Benzotiepino[3,2-*c*]piridin-11-ilbenzonitril (**51**)



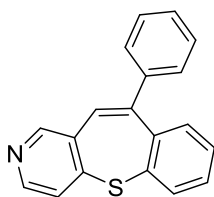
Prema opštem postupku za Suzukijevu reakciju, jedinjenje **46** (40,0 mg, 0,138 mmol) pomoću 4-cijanofenilboronske kiseline (25,3 mg, 0,172 mmol, 1,25 ekviv),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (0,9 mg, 3 mol%),  $\text{PPh}_3$  (4,4 mg, 12 mol %),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (aq) (2M, 120  $\mu\text{L}$ ), EtOH (600  $\mu\text{L}$ ) i DME (1,0 mL) transformiše se u **51** (24,9 mg, 58%). Svetložuto ulje. IR (ATR): 3056, 2926, 2679, 2227, 1606, 1566, 1540, 1508, 1470, 1433, 1396, 1274, 1171, 1062, 836, 772, 749, 701  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,51 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1H), 8,13 (s, 1H), 7,74-7,68 (m, 2H), 7,56-7,50 (m, 4H), 7,50-7,47 (m, 1H), 7,42-7,32 (m, 3H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  151,0; 150,0; 147,3; 147,2; 141,6; 139,0; 136,6; 135,6; 134,2; 132,8; 132,5; 129,8; 129,8; 129,4; 128,7; 127,0; 118,5; 111,9. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  313,07878 (greška -1,96 ppm). HPLC čistoća: metod B 95,19%; metod E 95,60%.

#### 11-Piridin-4-il[1]benzotiepino[3,2-*c*]piridin (**52**)



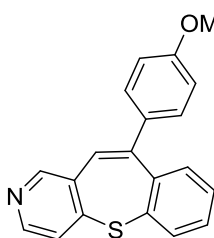
Prema opštem postupku za Suzukijevu reakciju, jedinjenje **46** (20,0 mg, 0,069 mmol) pomoću 4-piridinilboronske kiseline (10,6 mg, 0,086 mmol, 1,25 ekviv),  $\text{Pd}(\text{OAc})_2$  (0,5 mg, 3 mol%),  $\text{PPh}_3$  (2,2 mg, 12 mol %),  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (aq) (2M, 50  $\mu\text{L}$ ), EtOH (250  $\mu\text{L}$ ) i DME (700  $\mu\text{L}$ ) transformiše se u **52** (10,6 mg, 53%). Beli film. IR (KBr): 3426, 3028, 2922, 2852, 1730, 1632, 1593, 1564, 1541, 1469, 1400, 1276, 1100, 821, 754, 615, 549  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,70-8,65 (m, 2H), 8,52 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1H), 8,17 (s, 1H), 7,56-7,52 (m, 2H), 7,51 (d,  $J = 5,0$  Hz, 1H), 7,42-7,31 (m, 5H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  151,0; 150,3; 150,1; 150,0; 147,3; 140,8; 139,0; 136,2; 135,6; 134,3; 132,9; 129,9; 129,8; 128,7; 127,0; 123,2. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  289,07948 (greška 0,29 ppm). HPLC čistoća: jedinjenje nije uspešno eluirano sa kolone.

### 10-Fenil[1]benzotiepino[3,2-c]piridin (53)



Prema opštem postupku za Suzukijevu reakciju, jedinjenje **47** (20,0 mg, 0,069 mmol) pomoću fenilboronske kiseline (10,5 mg, 0,086 mmol, 1,25 ekviv), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,5 mg, 3 mol%), PPh<sub>3</sub> (2,2 mg, 12 mol %), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (aq) (2M, 50 μL), EtOH (250 μL) i DME (700 μL) transformiše se u **53** (12,7 mg, 64%). Bela, čvrsta supstanca, TT = 134 °C. IR (ATR): 3054, 3021, 2919, 2851, 1562, 1539, 1464, 1390, 1236, 1174, 916, 864, 825, 748, 691, 636, 551, 518 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,59 (s, 1H), 8,44 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,61-7,55 (m, 1H), 7,47-7,36 (m, 6H), 7,35-7,28 (m, 2H), 7,23-7,17 (m, 1H), 7,05-7,00 (m, 1H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 150,0; 149,0; 148,6; 145,9; 143,6; 141,7; 135,7; 135,0; 133,3; 131,2; 129,8; 128,9; 128,4; 128,4; 128,3; 128,1; 126,0. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 288,08472 (greška 1,98 ppm). HPLC čistoća: metod C 95,35%; metod D 95,69%.

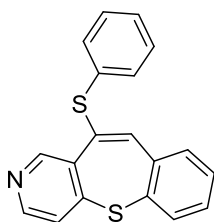
### 10-(4-Metoksifenil)[1]benzotiepino[3,2-c]piridin (54)



Prema opštem postupku za Suzukijevu reakciju, jedinjenje **47** (20,0 mg, 0,069 mmol) pomoću 4-metoksifenilboronske kiseline (13,1 mg, 0,086 mmol, 1,25 ekviv), Pd(OAc)<sub>2</sub> (0,5 mg, 3 mol%), PPh<sub>3</sub> (2,2 mg, 12 mol %), Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (aq) (2M, 50 μL), EtOH (250 μL) i DME (700 μL) transformiše se u **47** (20,3 mg, 93%). Bela, čvrsta supstanca, TT = 145-146 °C. IR (ATR): 3031, 2954, 2930, 2835, 1605, 1566, 1537, 1511, 1467, 1394, 1365, 1295, 1249, 1180, 1113, 1034, 833, 776, 750 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 8,58 (s, 1H), 8,43 (d, *J* = 5,5 Hz, 1H), 7,60-7,54 (m, 1H), 7,41-7,35 (m, 3H), 7,35-7,30 (m, 1H), 7,26 (s, 1H), 7,24-7,19 (m, 1H), 7,07-7,04 (m, 1H), 6,95-6,91 (m, 2H), 3,86 (s, 3H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 159,7; 150,0; 148,8; 148,1; 145,8; 141,9; 136,1; 135,9; 135,0; 133,3; 131,3; 130,0; 129,8; 128,3; 127,2; 126,0; 113,8; 55,4. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 318,09449 (greška -0,70 ppm). HPLC čistoća: metod C 96,11%; metod D 97,44%.

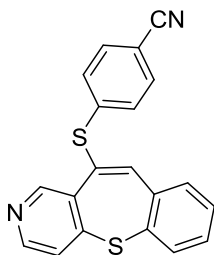
## Opšti postupak formiranja C-S veze reakcijom katalizovanom paladijumom

### 11-(Feniltio)[1]benzotiepino[3,2-c]piridin (55)



U spaljenu kivetu, u atmosferi argona, doda se tris(dibenzilidenacetone)dipaladijum ( $\text{Pd}_2(\text{dba})_3$ , 5,5 mg, 5 mol %), dppf (6,7 mg, 10 mol%),  $\text{NaO}t\text{-Bu}$  (13,9 mg, 0,145 mmol, 1,2 ekviv) i toluen (2,5 mL). Kiveta se napuni Ar. Posle 10 minuta mešanja na sobnoj temperaturi, doda se 11-brom[1]benzotiepino[3,2-c]piridin (35,0 mg, 0,121 mmol) i tiofenol (13  $\mu\text{L}$ , 0,133 mmol, 1,1 ekviv). Posle 18 sati mešanja na 90 °C, reakciona smeša se ohladi, procedi kroz hifl i ispere  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Rastvarač se ukloni pod sniženim pritiskom. Dry-flash hromatografijom na stubu  $\text{SiO}_2$  (heksan/EtOAc = 9/1) izoluje se **55** (30,0 mg, 77%). Žuta, čvrsta supstanca, TT = 108-110 °C. IR (ATR): 3056, 3023, 1712, 1562, 1466, 1388, 1266, 1184, 1081, 1026, 948, 883, 832, 742, 697, 619  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  9,03 (s, 1H), 8,36 (d,  $J$  = 5,0 Hz, 1H), 7,7 (s, 1H), 7,52-7,47 (m, 1H), 7,43-7,37 (m, 2H), 7,35-7,32 (m, 1H), 7,32-7,28 (m, 2H), 7,25-7,19 (m, 3H), 7,16-7,11 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  151,0; 150,1; 146,7; 139,0; 138,7; 136,9; 135,1; 134,1; 134,0; 132,7; 130,1; 129,5; 129,2; 129,0; 128,7; 127,1; 126,4. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  320,05694 (greška 2,24 ppm). HPLC čistoća: metod B 95,24%; metod E 95,32%.

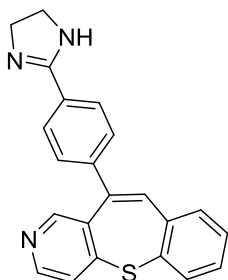
### 4-([1]Benzotiepino[3,2-c]piridin-11-iltio)benzonitril (56)



Prema postupku opisanom za sintezu **55**, jedinjenje **46** (70,0 mg, 0,241 mmol) pomoću 4-merkaptobenzonitrila (50,0  $\mu\text{L}$ , 0,366 mmol, 1,5 ekviv),  $\text{NaO}t\text{-Bu}$  (28,6 mg, 0,289 mmol, 1,2 ekviv),  $\text{Pd}_2\text{dba}_3$  (11,0 mg, 5 mol %), dppf (11,9 mg, 10 mol %) i PhMe (5,0 mL) transformiše se u **56** (55,6 mg, 67 %). Žuta, čvrsta supstanca, TT = 158-160 °C. IR (ATR): 3072, 3041, 2936, 2320, 1589, 1558, 1464, 1428, 1396, 1269, 1188, 1082, 951, 825, 753  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  8,99 (s, 1H), 8,41 (d,  $J$  = 5,0 Hz, 1H), 7,92 (s, 1H), 7,56-7,52 (m, 1H), 7,46-7,33 (m, 7H), 7,32-7,29 (m, 1H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  150,6; 150,5; 146,7; 143,4; 142,2; 138,5; 134,9; 134,2; 133,2; 132,9; 132,4; 130,3; 129,2; 128,9; 127,9; 126,5; 118,4; 109,5. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  345,04998 (greška -4,30 ppm). HPLC čistoća: metod C 96,15%; metod D 95,15%.

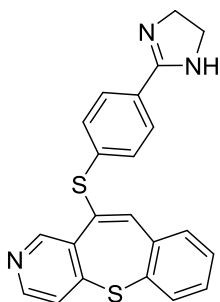
## Opšti postupak sinteze 4,5-dihidro-1*H*-imidazolskih derivata

### 11-[4-(4,5-dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil][1]benzotiepino[3,2-*c*]piridin (**57**)



Rastvor sumpora (1,2 mg, 0,038 mmol) i **51** (12,0 mg, 0,038 mmol) u etilen-diaminu (0,5 mL), postavi se u Biotage Initiator 2.5 mikrotalasni reaktor na 110 °C, 80 minuta. Reakciona smeša se ohladi i izlije u vodu, a faze se odvoje centrifugiranjem. Talog se ispere vodom (3 × 1,5 mL) i nakon toga se osuši pod sniženim pritiskom. Prinos proizvoda **57** je 12,0 mg (88%). Žuti film. IR (ATR): 3302, 3197, 3025, 2929, 2874, 1670, 1605, 1562, 1514, 1468, 1395, 1347, 1272, 979, 844, 758 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, *d*-DMSO) δ 8,77 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 8,38 (s, 1H), 8,16 (d, *J* = 6,0 Hz, 1H), 8,00 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,91 (s, 1H), 7,72 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,61-7,56 (m, 1H), 7,55-7,50 (m, 1H), 7,44-7,38 (m, 2H), 3,98 (s, 4H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, *d*-DMSO) δ 163,3; 150,7; 150,0; 146,1; 144,1; 141,7; 139,3; 136,6; 134,1; 133,4; 132,5; 130,4; 130,2; 129,7; 129,0; 128,4; 127,5; 126,9; 54,9. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 356.12178 (greška 0,51 ppm). HPLC čistoća: metod B 96,48%; metod E 95,99%.

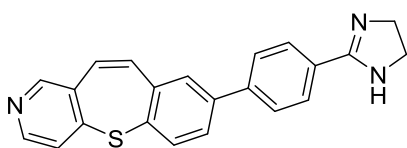
### 11-{[4-(4,5-Dihidro-1*H*-imidazol-2-il)fenil]tio}[1]benzotiepino[3,2-*c*]piridin (**58**)



Prema postupku opisanom za sintezu **57**, jedinjenje **56** (22,0 mg, 0,064 mmol) se, pomoću sumpora (2,0 mg, 0,064 mmol) i etilen-diamina (0,8 mL), transformiše u **58** (21,1 mg, 85%). Žuta, čvrsta supstanca, TT = 156-158 °C. IR (ATR): 3439, 3323, 3247, 3138, 3062, 2917, 2869, 1704, 1605, 1557, 1466, 1392, 1351, 1272, 1180, 1122, 1092, 831, 756 cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H NMR (500 MHz, *d*-DMSO, CF<sub>3</sub>COOD) δ 9,00 (s, 1H), 8,53 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 8,19 (s, 1H), 7,78 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H), 7,71 (d, *J* = 5,0 Hz, 1H), 7,61-7,58 (m, 1H), 7,58-7,45 (m, 5H), 3,94 (s, 4H). <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, *d*-DMSO, CF<sub>3</sub>COOD) δ 164,5; 149,2; 148,6; 148,3; 144,7; 143,3; 143,3; 138,3; 135,7; 133,1; 131,8; 131,2; 130,2; 129,6; 129,4; 127,8; 127,6; 120,0; 44,5; 44,4. (+)ESI-HRMS *m/z*: [M + H]<sup>+</sup> 388.09197 (greška -4,38 ppm). HPLC čistoća: jedinjenje nije uspešno eluirano sa kolone.



## 8-[4-(4,5-Dihidro-1H-imidazol-2-il)fenil][1]benzotiepino[3,2-c]piridin (59)



Prema postupku opisanom za sintezu **57**, jedinjenje **44** (8,5 mg, 0,025 mmol) se, pomoću sumpora (0,8 mg, 0,025 mmol) i etilen-diamina (0,5 mL), transformiše u **59** (7,0 mg, 80%). Žuti film. IR (KBr): 3429, 2924, 1618, 1565, 1518, 1466, 1388, 1275, 1243, 1196, 1021, 827, 669, 617  $\text{cm}^{-1}$ .  $^1\text{H}$  NMR (500 MHz, *d*-DMSO,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ )  $\delta$  8,91 (s, 1H), 8,80 (d,  $J = 6,0$  Hz, 1H), 8,06–7,97 (m, 5H), 7,95–7,90 (m, 2H), 7,62 (d,  $J = 8,0$  Hz, 1H), 7,49 (d,  $J = 12,5$  Hz, 1H), 7,23 (d,  $J = 12,5$  Hz, 1H), 4,02 (s, 4H).  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz, *d*-DMSO,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ )  $\delta$  164,7; 152,5; 144,2; 143,8; 143,0; 139,8; 139,7; 138,2; 137,5; 134,0; 131,1; 129,6; 129,3; 129,2; 128,8; 127,6; 121,7; 121,6; 44,6; 44,4. (+)ESI-HRMS  $m/z$ :  $[\text{M} + \text{H}]^+$  356,12141 (greška -0,52 ppm). HPLC čistoća: jedinjenje nije uspešno eluirano sa kolone.

## 4.2. Ispitivanje biološke aktivnosti

### 4.2.1. Određivanje antimikrobne aktivnosti

#### Test-mikroorganizmi

Ispitivane su antibakterijske i antifungalne osobine sintetisanih derivata prema bakterijskim sojevima i sojevima gljiva iz Nacionalne kolekcije kultura (NCTC) i Američke kolekcije kultura (ATCC) uključujući Gram-pozitivne bakterije *Clostridium sporogenes* (ATCC 19404), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Micrococcus luteus* (ATCC 10240), *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Micrococcus luteus* (ATCC 4698) i *Staphylococcus aureus* (NCTC 6571), Gram-negativne bakterije *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Proteus hauseri* (ATCC 13315), *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Enteritidis (ATCC 13076), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) i *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (NCTC 10332) i sojeve gljiva *Candida albicans* (ATCC 10231), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 9763), *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) i *Candida parapsilosis* C27 [klinički izolat rezistentan na vorikonazol; iz kolekcije Nacionalna referentna laboratorija za uzročnike mikoza (Institut za za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu, Beograd)].

### **Disk-difuzioni esej**

Antimikrobne aktivnosti sintetisanih derivata ispitivane su disk-difuzionom metodom, prema proceduri definisanoj od strane američkog Nacionalnog komiteta za kliničke laboratorijske standarde, M2-A6 (National Committee for Clinical Laboratory Standards (1997), M2-A6, Wayne, PA, USA).

Za određivanje antibakterijske aktivnosti, u svaku Petrijevu šolju, prečnika 90 mm, dodato je 22 mL hranljivog agara (Hi Media, Mumbai, India) i 100  $\mu$ L suspenzije bakterija ( $10^6$  kolonija/mL, koncentracija podešena prema McFarland standardima). Ispitivana jedinjenja rastvorena su u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (10 mg/mL), a zatim je 100  $\mu$ L pripremljenog rastvora naneto na sterilne celulozne diskove prečnika 8 mm i diskovi su ostavljeni na sobnoj temperaturi da se osuše. Diskovi su stavljani na površinu Petrijevih solja i ostavljeni 30 minuta na sobnoj temperaturi, kako bi došlo do difuzije jedinjenja. Kao pozitivna kontrola, upotrebljen je amikacin (30  $\mu$ g po disku), a negativnu kontrolu predstavljao je  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100  $\mu$ L po disku). Šolje su ostavljene 24 sata na 37 °C. Zone inhibicije izražene su u mm.

Za određivanje antifungalne aktivnosti, u svaku sterilnu Petrijevu šolju, prečnika 90 mm, dodato je 22 mL pripremljenog agara i 100  $\mu$ L suspenzije gljive ( $10^5$  kolonija/mL). Ispitivana jedinjenja rastvorena su u  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ . Finalne koncentracije bile su 1000, 500, 250, 125, 62,5 i 31,3  $\mu$ g po disku. Rastvori su naneti na diskove filterhartije, prečnika 8 mm i diskovi su ostavljeni da se osuše. Pozitivna kontrola bio je nistatin (30  $\mu$ g po disku), a negativna kontrola  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (100  $\mu$ L po disku). Šolje su ostavljene 48 sati na 28 °C. Zone inhibicije izražene su u mm, uključujući i prečnik diska.

### **Odredjivanje minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) - esej u tečnom medijumu**

Antimikrobne aktivnosti azepinskih derivata ispitivane su upotrebom eseja u tečnom medijumu, prema proceduri definisanoj od strane američkog Nacionalnog komiteta za kliničke laboratorijske standarde, M07-A5 (National Committee for Clinical Laboratory Standards (2000), M07-A5, Villanova, PA, USA). Minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) određena je metodom serijskog razblaženja, na sterilnim mikrotitar pločama (sa 96 bunara). Upotrebljeni su sveže Mueller-Hinton podloga (za bakterije) i

Saburo dektrozna podloga (za gljive). Ispitivana jedinjenja rastvorena su u dimetil-sulfoksidu (DMSO), a zatim je napravljena serija rastvora u opsegu koncentracije 10000 µg/mL do 4,9 µg/mL. Kao pozitivna kontrola za bakterije upotrebljeni su amikacin (AMK) i hloramfenikol (CHL), a kao pozitivna kontrola za gljive upotrebljeni su nistatin (NYT) i flukonazol (FLC). Rastvarač u kome su propremljena razblaženja (DMSO), upotrebljen je kao negativna kontrola. U svakom bunaru, inokulisano je 10 µL bakterijske kulture ( $10^6$  kolonija/mL) za određivanje antibakterijske aktivnosti i 10 µL fungalne kulture ( $10^5$  spora/mL). Mikrotitar ploče su ostavljene 24 sata na 37 °C za bakterije, a 48 sati na 28 °C za gljive. MIC je definisan kao najniža koncentracija supstance na kojoj test organizam u kulturi ne pokazuje rast. Rast test organizma određivan je na osnovu opaženog zamućenja, pomoću biokularnog mikroskopa.

Antifungalna aktivnost tiepinskih derivata ispitivana je upotrebom eseja u tačnom medijumu, u RPMI medijumu (Sigma-Aldrich, Minhen, Nemačka), prema literaturno poznatoj proceduri definisanoj od strane Nacionalnog komiteta za kliničke laboratorijske standarde (M07-A8) za bakterije i prema standardima Evropskog komiteta za testiranje antimikrobne osetljivosti (EDef7.1.).<sup>87</sup> Pripremljeni su rastvori različitih koncentracija testiranih jedinjenja u DMSO, a najviša koncentracija bila je 500 µg/mL. Pripremljeni su inokulumi  $10^5$  kolonija/mL za bakterije i  $10^4$  kolonija/mL za *Candida* sojeve.

## **Mikroskopija**

Kako bi se proučio uticaj odabranih tiepina na ćelije *C. albicans* tokom vremena, fungalna kultura koja je uzgajana preko noći u RPMI medijumu (Sigma-Aldrich), kojoj je dodata 2% glukoza i 10% serum telećeg fetusa (FCS – fetal calf serum), razblažena je do optičke gustine  $OD_{600} = 0,5$  i dodati su tiepini ili DMSO u MIC koncentracijama. Kultura je ostavljena na 37 °C i alikvoti su analizirani mikroskopijom posle 1, 5 i 24 sata. Alikvoti kulture bojeni su FUN 1 bojom za ćelije kvasaca ([2-hlor-4-(2,3-dihidro-3-metil-(benzo-1,3-tiazol-2-il)-metiliden)-1-fenilhinolinijum-jodidom]), prema uputstvu proizvođača (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, USA) i posmatrani fluorescentnim mikroskopom (Olympus BX51, Applied Imaging Corp., San Jose, CA, USA) koji uveličava 40 puta.

## Esej hemolize

Eritrociti ovce, suspendovani u PBS puferu, pH = 7,4 (1% v/v, Torlak, Beograd, Srbija)<sup>88</sup> i jedinjenja, u MIC ili IC<sub>50</sub> koncentracijama, ostavljeni su 1 sat na 37 °C. Apsorbanca hemoglobina merena je na 405 nm (Tekan Infinite 200 Pro multiplate reader; Tecan Group Ltd., Männedorf, Švajcarska). Procenat hemolize izračunat je prema jednačini: hemoliza (%) = 100[(Abs405 nm (tretirani) – Abs405 nm (netretirani)) / (Abs405 nm (0,1% Triton-X- 100 lizirani) – Abs405 nm (netretirani))].

## Odredjivanje *in vitro* interakcije sa DNK

Genomska DNK (gDNA) iz *Candida albicans* prečišćena je pomoću kompleta opreme QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Nemačka). Kvalitet i koncentracija DNK određeni su merenjem UV apsorbance pomoću NanoVue Plus spektrofotometra (GE Healthcare, Frajburg, Nemačka). Sposobnost testiranih jedinjenja da vežu gDNK iz *C. albicans* ispitana je agaroznom gel-elektroforezom. U gDNA (500 ng) dodata su jedinjenja (finalna koncentracija 25 µg/mL) u fosfatnom puferu (pH = 7,4) i sadržaj je inkubiran 12 sati na 37 °C. Potom je izvedena gel-elektroforeza na 0,8% (w/v) agaroznom gelu, koji je sadržao 0,1 µg/mL etidijum-bromida u TAE puferu (40 mm Tris acetat/1 mm EDTA, pH = 7,4), na 60 V tokom 2 sata.

### 4.2.2. Odredjivanje toksičnosti prema embrionima zebra-ribica

Toksičnost (letalitet i teratogenost) izabranih tiepina prema embrionima zebrice (*Danio rerio*) procenjena je prema opštim pravilima OECD Smernica za testiranje hemikalija (OECD, 2013). Svi eksperimenti izvedeni su u skladu sa Evropskom direktivom 86/609/EEC i etičkim smernicama Vodiča za brigu i korišćenje laboratorijskih životinja Instituta za molekularnu genetiku i genetsko inženjerstvo, Univerziteta u Beogradu. Odrasle zebrice (*Danio rerio*, divlji soj) čuvane su u ribljem medijumu (2 mm CaCl<sub>2</sub>, 0,5 mm MgSO<sub>4</sub>, 0,7 mm NaHCO<sub>3</sub>, 0,07 mm KCl) na 27 ± 1 °C, sa 14 sati svetlo/10 sati mrak ciklusima i redovno su hranjene dva puta dnevno komercijalnom suvom hranom sa dodatkom *Artemia nauplii* (TetraMin™ flakes; Tetra, Melle, Nemačka). Jaja su 6 nakon oplodjenja (hpf), su tretirana različitim koncentracijama tiepina (1, 5, 10, 25, 50 i 75 µg/mL) i 0,15% (V/V) DMSO kao negativnom kontrolom. Embrioni su prebačeni u ploče sa 24 bunara, koje su sadržale

1000  $\mu\text{L}$  testiranog rastvora i 10 embriona po bunaru. Ploče su inkubirane na 28 °C. Eksperimenti su ponovljeni dva puta, sa 30 embriona za svaku koncentraciju jedinjenja. Apikalne tačke za procenu toksičnosti su zabeležene nakon 24, 48, 72, and 96 hpf pomoću invertnog mikroskopa (CKX41; Olympus, Tokio, Japan). Pre posmatranja embriona 96 sati nakon oplodjenja, embrioni su anestetizirani dodatkom 0,1% (w/v) rastvora trokaina (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), fotografisani i uništeni zamrzavanjem na -20 °C tokom 24 ili više sati.

## 5. ZAKLJUČAK

U ovoj doktorskoj disertaciji, opisana je nova metoda za sintezu azepinskih i tiepinskih derivata, zasnovana na dvostrukom *N*- i *S*-arilovanju katalizovanom kompleksima paladijuma. Određena je antibakterijska i antifungalna aktivnost sintetisanih azepinskih i tiepinskih jedinjenja. Testirani tiepinski derivati pokazali su selektivnost prema gljivama u odnosu na bakterije. Zatim je ispitana njihova toksičnost, a urađeni su i preliminarni eksperimenti s ciljem određivanja mehanizma antifungalnog dejstva.

### Azepini

Derivati iminostilbena (*5H*-dibenz[*b,f*]azepina) pokazuju različite biološke aktivnosti, a ovo heterociklično jezgro je i osnova strukture nekoliko odobrenih lekova koji deluju na CNS. Pregled literature ukazuje na to da i dalje postoji značajno interesovanje za pronalaženje novih načina sinteze *5H*-diaril[*b,f*]azepina i njihovu primenu u medicinskoj hemiji.

Pod uslovima Buchwald-Hartwig-ove reakcije aminovanja, pomoću Pd(OAc)<sub>2</sub>, JohnPhos kao liganda i NaOt-Bu kao baze, polazeći iz *o,o'*-dihalogensupstituisanog stilbenskog derivata (**Z**)-**14**, dobijen je *5H*-dipirido[*b,f*]azepin **19** u visokom prinosu. Opisani reakcioni uslovi primenjeni su za sintezu različito supstituisanih *5H*-diaril[*b,f*]azepina. Na osnovu rezultata ispitivanja reakcionog mehanizma može se zaključiti da je, pod primenjenim reakcionim uslovima (toluen, 100 °C), za odvijanje reakcije neophodno prisustvo kompleksa paladijuma. Međutim, reakcioni mehanizam nije potpuno razjašnjen, pa je neophodno dalje istraživanje. Na povišenoj temperaturi (150 °C) u NMP kao rastvaraču, azepinski prsten *5H*-dipirido[*b,f*]azepina formiran je dvostrukom nukleofilnom aromatičnom supstitucijom, reakcijom primarnog alifatičnog amina i odgovarajućeg stilbena. Prednost ove metode je što se reakcija odvija bez prisustva katalizatora, a reakciono vreme značajno je skraćeno primenom mikrotalasnih reakcionih uslova.

Ispitana je antibakterijska i antifungalna aktivnost sintetisanih azepina prema pet Gram-negativnih bakterija, tri Gram-pozitivne bakterije i tri gljive. Sva ispitana jedinjenja ispoljila su manju antibakterijsku aktivnost u poređenju sa standardima, osim

najaktivnijeg derivata **19**, koji je pokazao veću aktivnost od hloramfenikola prema četiri bakterije. Ispitani azepinski derivati pokazali su slabu do umerenu antifungalnu aktivnost, a najaktivniji je takođe azepin **19**. Svi piridobenzazepinski derivati (**19-23**) prema svim ispitanim bakterijama i gljivama imaju višu aktivnost od odgovarajućih dipiridoazepinskih analoga (**24-28**).

## Tiepini

Mnogi derivati dibenzo[*b,f*]tiepina su biološki aktivna jedinjenja koja pokazuju antihistaminsku, antiinflamatornu i antikancersku aktivnost, a Zotepin, antipsihotik tiepinske strukture, koristi se u terapiji šizofrenije. U literaturi su opisane različite metode za sintezu diaril[*b,f*]tiepina, ali samo u jednoj sintezi tiepinski prsten nastaje reakcijom katalizovanom kompleksima paladijuma.

Prethodno opisana metodologija sinteze diaril[*b,f*]azepina, uspešno je primenjena za sintezu odgovarajućih tiepinskih derivata. Interesantno je da su dva sedmočlana heterociklična sistema (azepin i tiepin), dobijeni primenom iste sintetičke metodologije – dvostrukim *N*- ili *S*-arilovanjem katalizovanim kompleksima paladijuma. Međutim, selektivnost liganda prilikom sinteze bila je različita. Prilikom sinteze azepina, najefikasnijim su se pokazali kompleksi paladijuma sa biarilfosfanskim ligandima (JohnPhos i SPhos), a u reakciji sinteze tiepina efikasan je bio jedino ferocenski ligand (dppf). Takođe, za dobijanje dobrog prinosa tiepina bila je neophodna primena mikrotalasnog zračenja. Daljim strukturnim modifikacijama osnovnog tricikličnog tiepinskog sistema, sintetisani su novi tiepinski derivati.

Preliminarna ispitivanja antibakterijske i antifungalne aktivnosti sintetisanih tiepina, prema osam bakterija i tri gljive, pokazala su da ova jedinjenja imaju značajnu antifungalnu aktivnost i selektivna su prema gljivama u odnosu na bakterije. Zbog toga su dodatno ispitana njihova antifungalna svojstva. Određene su minimalne inhibitorne koncentracije, a zatim je ispitan uticaj najaktivnijih derivata ( $MIC \leq 31,2 \mu\text{g/mL}$ ) na rast hifa *C. albicans*. Derivati **48** i **49** stimulisali su formiranje hifa, a tiepin **42** nije pokazao značajan uticaj na njihov razvoj. Tiepini **36** i **59** sprečili su nastanak gljivičnih hifa. Ispitivan je mehanizam antifungalnog dejstva derivata **36**, **42** i **59**. Jedinjenja **36** i **42** u MIC koncentracijama pokazala su nizak procenat hemolize eritrocita, što znači da ćelijska membrana nije meta njihovog delovanja. Derivat **59** doveo je do hemolize 30-

40% ćelija, pa jedan od mehanizama njegovog antifungalnog dejstva može biti interakcija sa ćelijskom membranom. Rezultati eseja hemolize potvrđeni su mikroskopijom, koja je pokazala da jedinjenje **59** smanjuje broj ćelija *C. albicans* posle pet sati dejstva. Jedinjenja **36** i **42** smanjila su metaboličku aktivnost, ali ne i broj ćelija. Takođe, pokazano je da dolazi do interkalacije jedinjenja **36** i **59** sa DNK, pa se njihova aktivnost delimično može pripisati i interakciji sa ovim biomolekulom. Prilikom ispitivanja toksičnosti, u eksperimentima u kojima su korišćene zebra-ribice, derivati **36** i **42** ispoljili su veoma malu toksičnost. Samo jedinjenje **59** pokazuje visoku teratogenost, sa EC<sub>50</sub> vrednostima višim od MIC, i LC<sub>50</sub> vrednošću bliskoj vrednosti MIC prema *C. albicans*.

Na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja antifungalne aktivnosti i toksičnosti, može se zaključiti da bi testirani tiepini **36** i **42** mogli biti osnova za razvoj novih antifungalnih terapeutika. Trebalo bi detaljnije ispitati mehanizam antifungalnog dejstva ovih jedinjenja, posebno derivata **42**, koji ima najnižu vrednost MIC, ali ne utiče ni na jednu od ispitanih fungalnih meta (ćelijska membrana i DNK). Jedinjenje **59** pokazuje visoku teratogenost, ali efikasno inhibira rast hifa *C. albicans*. Zbog toga bi trebalo detaljno proučiti uticaj derivata **59** na biofilm pomenutih gljiva, kako bi se donela odluka da li ovo jedinjenje treba dalje ispitivati kao potencijalni antifungalni agens, posebno ako se zna da i vorikonazol, lek koji je u kliničkoj upotrebi, pokazuje izražen teratogeni efekat.



## 6. SUMMARY

Here we report a novel methodology for the synthesis of azepine and thiepine compounds, based on the palladium-catalyzed double *N*- and *S*-arylation reaction. The synthesized *N*- and *S*-tricyclic compounds were evaluated for their antibacterial and antifungal activities. Synthesized thiepines showed higher antifungal activity than antibacterial activity, indicating that they could be used as selective antimicrobials. The assessment of toxicity (lethality and teratogenicity) and preliminary tests of possible mechanism of action on the fungal cell of selected thiepines were performed.

### Azepines

Iminostilbene (*5H*-dibenz[*b,f*]azepine) is a fused tricyclic amine, whose derivatives have been reported as having different biological activities. It is a part of the registered anticonvulsant drug carbamazepine and the tricyclic antidepressant opipramol. Because of the medicinal value of *5H*-dibenz[*b,f*]azepine derivatives, considerable chemistry continues to be described for the synthesis of these heterocyclic molecules.

The synthesis of *5H*-dipyrdoazepine **19** is achieved in one reaction step, using the palladium-catalyzed amination-cyclization reaction of appropriate *ortho*-halogensubstituted *Z*-stilbene **14**. In this method, Pd(OAc)<sub>2</sub> was used as a palladium source, JohnPhos was used as a ligand and NaOt-Bu as a base. After optimizing reaction conditions, the iminostilbenes were subjected to coupling reactions with various amines, affording the desired azepines in fairly good yields. In the absence of palladium source, ligand and base, the reaction of stilbene **15** and *N,N*-dimethyl-propane-1,3-diamine in PhMe at 100 °C did not occur, which strongly supports our conclusion that palladium is needed for the formation of the desired product. However, the reaction mechanism is not fully explained, so additional experiments are needed. We also described the synthesis of *5H*-dipyrido[4,3-*b*][1]azepines based on double S<sub>N</sub>Ar reaction of 3,3'-(*Z*)-ethene-1,2-diylbis(4-chloropyridine) with primary aliphatic amines in NMP at 150 °C. Although the yields were lower than in previously reported Pd-catalyzed method, this procedure has the great advantages for being transition metal-free, and the time of the reaction was significantly shortened by microwave heating.

The synthesized azepine derivatives were screened for their antibacterial and antifungal activities against five Gram-negative bacteria, three Gram-positive bacteria and three fungal strains. All of the tested azepines exhibited lower antibacterial activity with respect to antibacterial standards, except for the compound **19**, which was more potent than chloramphenicol against four bacterial strains. The synthesized azepine derivatives exhibited weak antifungal activity and the most active compound was **19**. All pyridobenzazepine derivatives (**19-23**) showed higher inhibitory activity than the corresponding dipyridoazepine analogues (**24-28**) against all microbial strains.

### Thiepines

Notable biological activities have been described for the members of the dibenzo[*b,f*]thiepine series. Zotepine is a thiepine antipsychotic drug that has been used in clinical practice for the treatment of schizophrenia. The results published recently have shown that diaryl[*b,f*]thiepines also exhibit anticancer activity. Various methods have been reported in the literature to obtain thiepine derivatives, but only one involves palladium-catalyzed reactions.

As an expansion of the study of the synthetic methodology for the synthesis of azepines, the palladium-catalyzed reactions of *Z*-stilbenes with potassium thioacetate afforded the thiepine derivatives. Interestingly, no conversion was observed when stilbenes were subjected to the same reaction conditions as for the synthesis of the azepine analogues. However, when JohnPhos was replaced with dppf (ineffective in the amination reaction) the desired thiepines were isolated in low yields. To increase the yields, double palladium-catalyzed C–S bond formation reaction was performed under microwave irradiation. Structural modifications of the initial *S*-tricyclic core afforded a novel series of thiepine derivatives.

Preliminary screening of the synthesized thiepines for their antibacterial and antifungal activities against eight bacteria and three fungal strains showed that they exhibit higher antifungal activity than antibacterial activity, suggesting selectivity toward fungi. After determination of minimum inhibitory concentration, the effect of thiepines with antifungal MIC values  $\leq 31.2$   $\mu\text{g/mL}$  on the *C. albicans* hyphal growth has been evaluated. Thiepines **36** and **59** successfully prevented hyphal formation while compounds **48** and **49** showed the opposite effect, significantly stimulating hyphal

formation, which we considered as a negative trait that eliminated these two derivatives from further assessments. Thiepine **42** had no effect on hyphal growth. We next carried out assays to explore possible mode of antifungal action of the selected thiepines. Low hemolysis of erythrocytes was observed using **36** and **42**, which implied that membrane was not the primary target of these molecules. On the contrary, **59** efficiently caused between 30% and 40% hemolysis, thus possible activity on the fungal membrane was concluded for this thiepine. This was mirrored in the microscopic study, which showed that **59** efficiently caused reduction in total *C. albicans* cell numbers within first 5 h of treatment, while **36** and **42** caused reduction in metabolic activity, but no reduction in cell number cell numbers within first 5 h. Significant intercalation with DNA was exhibited by derivatives **36** and **59**, hence it was reasonable to attribute some of the activity of these compounds to interaction with this biomolecule. The toxicity of the most promising thiepines (the lethality and teratogenicity) was evaluated against Zebrafish. Obtained results revealed different toxicity profiles of tested compounds. From this test, only **59** showed undesirable high teratogenicity with EC<sub>50</sub> value higher than MIC against *C. albicans*.

These findings imply that thiepines **36** and **42** could be further developed for the antifungal treatment. Mechanism of the antifungal action of these compounds should be fully researched, since the most potent thiepine, **42**, showed no interaction with the cell membrane or the DNA. Compound **59** showed high toxicity but was the most successful in preventing hyphal formation. Additional tests of the effect of this compound on fungal biofilm are needed to evaluate whether this chemotype provides a good platform for further optimization, especially since it was shown that clinically used voriconazole exhibits high teratogenic effect.

## 7. LITERATURA

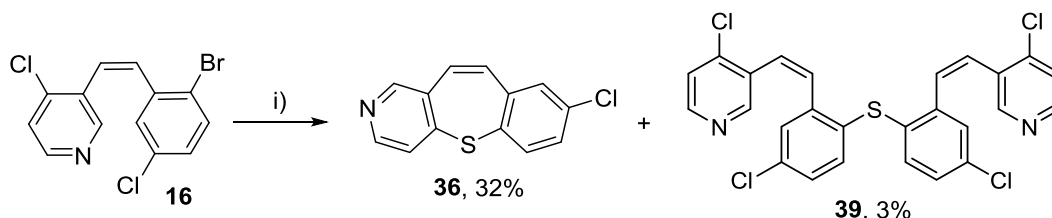
- <sup>1</sup> A CDC Framework for Preventing Infectious Diseases; <https://www.cdc.gov/oid/docs/id-framework-2pageoverview.pdf>
- <sup>2</sup> T. Nogrady, D. F. Weaver, *Medicinal Chemistry, A Molecular and Biochemical Approach, 3rd Edition*, **2005**, Oxford University Press, Inc.
- <sup>3</sup> G. L. Patrick, *An introduction to medicinal chemistry, 5th Edition*, **2013**, Oxford University Press.
- <sup>4</sup> S. M. Adl, A. G. B. Simpson, C. E. Lane, J. Lukeš, D. Bass, S. S. Bowser, M. W. Brown, F. Burki, M. Dunthorn, V. Hampl, A. Heiss, M. Hoppenrath, E. Lara, L. Le Gall, D. H. Lynn, H. Mcmanus, E. A. D. Mitchell, S. E. Mozley-Stanridge, L. W. Parfrey, J. Pawlowski, S. Rueckert, L. Shadwick, C. L. Schoch, A. Smirnov, F. W. Spiegel, *Eukaryot. Microbiol.*, **2012**, 59(5), 429.
- <sup>5</sup> R. E. Reese, R. F. Betts, *Antibiotic use: sulfonamides and trimethoprim-sulfamethoxazole*, u R. E. Rees, R. F. Betts, *Practical approach to infectious diseases, 3rd Edition*, **1991**, Boston: Little Brown.
- <sup>6</sup> A. Fleming, *Br. J. Exp. Pathol.*, **1929**, 10, 226.
- <sup>7</sup> E. Chain, H. W. Florey, A. D. Gardner, N. G. Heatley, M. A. Jennings, J. Orr-Ewing, A. G. Sanders, *Clin. Orthop. Relat. Res.*, **2005**, 23, 439.
- <sup>8</sup> C. Walsh, *Nature*, **2000**, 406, 775.
- <sup>9</sup> "Penicillin G" (pdf); <http://www.toku-e.com/Upload/Products/PDS/20120521008049.pdf>
- <sup>10</sup> L. Thomas, *Foye's principles of medicinal chemistry, 6th Edition*, **2008**, Lippincott Williams & Wilkins.
- <sup>11</sup> K. C. Nicolaou, C. N. C. Boddy, S. Bräse, N. Winssinger, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **1999**, 38, 2096.
- <sup>12</sup> W.K. Nichols, *Anti-infectives*, u A.R. Gennaro, *The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Vol. II*, **1995**, Mack.
- <sup>13</sup> E. Torok, E. Moran, F. Cooke, *Oxford Handbook of Infectious Diseases and Microbiology*, **2009**, OUP Oxford.
- <sup>14</sup> J.-H. Liang, X. Han, *Current Topics in Medicinal Chemistry*, **2013**, 13, 3131.
- <sup>15</sup> D. Shinabarger, *Expert Opinion on Investigational Drugs*, **1999**, 8(8), 1195.
- <sup>16</sup> M. I. Andersso, A. P. MacGowan, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **2003**, 51, 1.
- <sup>17</sup> H. G. Floss, T.-W. Yu, *Chem. Rev.*, **2005**, 105, 621.
- <sup>18</sup> Edited by K. Kavanagh, *Fungi: biology and applications, 2nd Edition*, **2011**, John Wiley & Sons, Ltd.
- <sup>19</sup> H. P. Rang, M. M. Dale, J. M. Ritter, P. K. Moore, *Farmakologija, 5. izdaje (1. srpsko izdanje)*, **2005**, Data Status.
- <sup>20</sup> J. C. Sardi, L. Scorzoni, T. Bernardi, A. M. Fusco-Almeida, M. J. Mendes Giannini, *J. Med. Microbiol.*, **2013**, 62, 10.
- <sup>21</sup> L. Ostrosky-Zeichner, A. Casadevall, J. N. Galgiani, F. C. Odds, J. H. Rex, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **2010**, 9, 719.
- <sup>22</sup> M. A. Ghannoum, A. B. Rice, *Clin. Microbiol. Rev.*, **1999**, 12, 501.
- <sup>23</sup> M. K. Kathiravan, A. B. Salake, A. S. Chothe, P. B. Dudhe, R. P. Watode, M. S. Mukta, S. Gadhwe, *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, 20, 5678.
- <sup>24</sup> G. P. Sarmiento, R. G. Vitale, J. Afeltra, G. Y. Moltrasio, A. G. Moglioni, *Eur. J. Med. Chem.*, **2011**, 46, 101.
- <sup>25</sup> N. Ryder, B. Favre, *Rev. Contemp. Pharmacother.*, **1997**, 8, 275.
- <sup>26</sup> T. A. Vincent, *Int. J. Antimicrob. Agents*, **2000**, 16, 317.
- <sup>27</sup> S. R. Walker, *Trends and Changes in Drug Research and Development*, **2012**, Springer Science & Business Media.
- <sup>28</sup> H. Merzendorfer, *European Journal of Cell Biology*, **2011**, 90, 759.
- <sup>29</sup> J. M. Domínguez, V. A. Kelly, O. S. Kinsman, M. S. Marriott, F. G. De Las Heras, J. J. Martín, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **1998**, 42(9), 2274.
- <sup>30</sup> R. Diasio, J. Bennett, C. Myers, *Biochem. Pharmacol.*, **1978**, 27, 703.
- <sup>31</sup> J. Kilmartin, *Biochemistry*, **1981**, 20, 3629.
- <sup>32</sup> J. Alvarez-Builla, J. J. Vaquero, J. Barluenga, *Modern Heterocyclic Chemistry: Vol 4*, 2011, John Wiley & Sons.
- <sup>33</sup> J. A. Joule, K. Mills, *Heterocyclic Chemistry, 5th Edition*, **2010**, John Wiley & Sons.
- <sup>34</sup> Edited by A. R. Katritzky, C. W. Rees, E. F.V. Scriven, *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, D. J. Le Count, Vol. 9, **1996**, Elsevier Science Ltd.
- <sup>35</sup> C. Dardonville, M. L. Jimeno, I. Alkorta, J. Elguero, *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, 2, 1587.
- <sup>36</sup> L. J. Kricka, A. Ledwith; *Chemical Reviews*, **1974**, 74, 101.

- <sup>37</sup> H. J. Möller, H. P. Voltz, I. W. Reimann, K. D. Stoll, *J. Clin. Psychopharmacol.*, **2001**, *21*, 59.
- <sup>38</sup> W. E. Müller, B. Siebert, G. Holoubek, C. Gentsch, *Pharmacopsychiatry*, **2004**, *37*, 189.
- <sup>39</sup> A. Knell, D. Monti, M. Maciejewski, A. Baiker, *Applied Catalysis A: General*, **1995**, *121*, 139.
- <sup>40</sup> G. P. Tokmakov, I. I. Grandberg, *Tetrahedron*, **1995**, *51*, 2091.
- <sup>41</sup> J. R. Patton, K. H. Dudley, *J. Heterocyclic chem.*, **1979**, *16*, 257.
- <sup>42</sup> E.-C. Elliott, E. R. Bowkett, J. L. Maggs, J. Bacsá, B. K. Park, S. L. Regan, P. M. O'Neill, A. V. Stachulski, *Org. Lett.*, **2011**, *13*, 5592.
- <sup>43</sup> L. A. Arnold, W. Luo, R. K. Guy, *Org. Lett.*, **2004**, *6*(17), 3005.
- <sup>44</sup> N. Della Ca', G. Maestri, M. Malacria, E. Derat, M. Catellani, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2011**, *50*, 12257.
- <sup>45</sup> D. Tselikhovsky, S. L. Buchwald, *J. Am. Chem. Soc.*, **2010**, *132*, 14048.
- <sup>46</sup> Y. Wang, Y. Chen, Q. He, Y. Xie, C. Yang, *Helvetica Chimica Acta*, **2013**, *96*, 296.
- <sup>47</sup> T. Stopka, L. Marzo, M. Zurro, S. Janich, E.-U. Würthwein, C. G. Daniliuc, J. Alemán, O. García Mancheño, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2015**, *54*, 5049.
- <sup>48</sup> A. Gini, O. García Mancheño, *Synlett*, **2016**, *2*, 526.
- <sup>49</sup> T. Matsuda, S. Sato, *J. Org. Chem.*, **2013**, *78*, 3329.
- <sup>50</sup> H. Christensen, C. Schjøth-Eskesen, M. Jensen, S. Sinning, H. H. Jensen, *Chem. Eur. J.*, **2011**, *17*, 10618.
- <sup>51</sup> X. Zhang, Y. Yang, Y. Liang, *Tetrahedron Letters*, **2012**, *53*, 6406.
- <sup>52</sup> C. C. Pye, J. D. Xidos, R. A. Poirier, D. J. Burnell, *J. Phys. Chem. A*, **1997**, *18*, 3371.
- <sup>53</sup> R. Gleiter, G. Krennrich, D. Cremer, K. Yamamoto, I. Murata, *J. Am. Chem. Soc.*, **1985**, *107*, 6874.
- <sup>54</sup> Editors-in-Chief: A. R. Katritzky, C. W. Rees, E. F.V. Scriven, *Comprehensive Heterocyclic Chemistry II*, K. Yamamoto, S. Yamazaki, Vol. 9, 1996, Elsevier Science Ltd.
- <sup>55</sup> I. Ueda, Y. Sato, S. Maeno, S. Umio, *Chem. Pharm. Bull.*, **1978**, *26*, 3058.
- <sup>56</sup> M. Protiva, *J. Heterocyclic. Chem.*, **1996**, *33*, 497.
- <sup>57</sup> M. I. Ansari, M. K. Hussain, A. Arun, B. Chakravarti, R. Konwar, K. Hajela, *Eur. J. Med. Chem.*, **2015**, *99*, 113.
- <sup>58</sup> J. D. Loudon, A. D. B. Sloan, L. A. Summers, *J. Chem. Soc.*, **1957**, 3814.
- <sup>59</sup> H. Shirani, T. Janosik, *J. Org. Chem.*, **2007**, *72*, 8984.
- <sup>60</sup> H. Shirani, J. Bergman, T. Janosik, *Tetrahedron*, **2009**, *65*, 8350.
- <sup>61</sup> M. Saito, T. Yamamoto, I. Osaka, E. Miyazaki, K. Takimiya, H. Kuwabara, M. Ikeda, *Tetrahedron Lett.*, **2010**, *51*, 5277.
- <sup>62</sup> T. H. Jepsen, M. Larsen, M. Joergensen, M. B. Nielsen, *Synlett*, **2012**, *23*, 418.
- <sup>63</sup> T. Migita, T. Shimizu, Y. Asami, J. Shiobara, Y. Kato, M. Kosugi, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **1980**, *53*, 1385.
- <sup>64</sup> N. Park, K. Park., M. Jang, S. Lee, *J. Org. Chem.*, **2011**, *76*, 4371.
- <sup>65</sup> M. A. Fernandez-Rodriguez, J. F. Hartwig, *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 2355.
- <sup>66</sup> M. Kuhn, F. C. Falk, J. Paradies, *Organic Letters*, **2011**, *13*, 4100.
- <sup>67</sup> M. P. Sadashiva, Basappa, S. NanjundaSwamy, F. Li, K. A. Manu, M. Sengottuvelan, D. S. Prasanna, N. C. Anilkumar, G. Sethi, K. Sugahara, K. S. Rangappa, *BMC Chemical Biology*, **2012**, *12*:5.
- <sup>68</sup> H. V. Kumar, N. Naik, *Eur. J. Med. Chem.*, **2010**, *45*(1), 2.
- <sup>69</sup> I. M. Opsenica, *Sinteza inhibitora botulinum neurotoksina i proliferacije parazita Plasmodium falciparum*, doktorska disertacija, **2011**, Hemijski fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- <sup>70</sup> Y. Takano, F. Shiga, J. Asano, N. Ando, H. Uchiki, K. Fukuchi, T. Anraku, *Bioorg. Med. Chem.*, **2005**, *13*, 5841.
- <sup>71</sup> a) A. D. Burrows, C. G. Frost, M. F. Mahon, C. Richardson, *Angew.Chem.Int. Ed.*, **2008**, *47*, 8482; b) S. Tu, L.-H. Xu, L.-Y. Ye, X. Wang, Y. Sha, Z.-Y. Xiao, *J. Agric. Food Chem.*, **2008**, *56*, 5247.
- <sup>72</sup> S. A. Snyder, T. C. Sherwood, A. G. Ross, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 5146.
- <sup>73</sup> E. C. Dunne, J. Coyne, P. B. Crowley, D. G. Gilheany, *Tetrahedron Lett.*, **2002**, *43*, 2449.
- <sup>74</sup> S. M. Milosavljević, *Strukturne instrumentalne metode*, **2004**, Hemijski fakultet, Beograd.
- <sup>75</sup> (a) D. S. Surry, S. L. Buchwald, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2008**, *47*, 6338; (b) D. S. Surry, S. L. Buchwald, *Chem. Sci.*, **2011**, *2*, 27.
- <sup>76</sup> a) J. P. Wibaut, F. W. Broekman, *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*, **1961**, *80*, 309; b) S. Hashimoto, S. Otani, T. Okamoto, K. Matsumoto, *Heterocycles*, **1988**, *27*, 319; c) Y.-K. Lee, D. J. Parks, T. Lu, T. V. Thieu, T. Markotan, W. Pan, D. F. McComsey, K. L. Milkiewicz, C. S. Crysler, N. Ninan, M. C. Abad, E. C. Giardino, B. E. Maryanoff, B. P. Damiano, M. R. Player, *J. Med. Chem.*, **2008**, *51*, 282; d) B. C. Pérez, C. Teixeira, I. S. Albuquerque, J. Gut, P. J. Rosenthal, J. R. B. Gomes, M. Prudêncio, P. Gomes, *J. Med. Chem.*, **2013**, *56*, 556.

- 
- <sup>77</sup> Jaguar, version 8.0, Schrödinger, LLC, New York, NY, **2013**.
- <sup>78</sup> W. Tochtermann, K. Oppenländer, M. Nguyen-Duong Hoang, *Justus Liebigs Ann. Chem.*, **1967**, 701, 117.
- <sup>79</sup> D. Maciejewska, J. Żabiński, P. Kaźmierczak, K. Wójciuk, M. Kruszewski, H. Kruszewska, *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2014**, 24, 2918.
- <sup>80</sup> P. E. Sudbery, *Nat. Rev. Microbiol.*, **2011**, 9, 737.
- <sup>81</sup> V. Ajdačić, L. Senerovic, M. Vranić, M. Pekmezović, V. Arsić-Arsnijić, A. Veselinović, J. Veselinović, B. A. Šolaja, J. Nikodinovic-Runic, I. M. Opsenica, *Bioorg. Med. Chem.*, **2016**, 24, 1277.
- <sup>82</sup> A. Knopik-Skrocka, J. Bielawski, *Cell. Mol. Biol. Lett.*, **2002**, 7, 31.
- <sup>83</sup> P. H. O. Abrão, R. B. Pizi, T. B. de Souza, N. C. Silva, A. M. Fregnan, F. N. Silva, L. F. Coelho, L. C. Malaquias, A. L. Dias, D. F. Dias, M. P. Veloso, D. T. Carvalho, *Chem. Biol. Drug Des.*, **2015**, 86, 459.
- <sup>84</sup> L. Racané, V. Tralić-Kulenović, S. Kraljević Pavelić, I. Ratkaj, P. Peixoto, R. Nhili, S. Depauw, M. -P. Hildebrand, M. -H. David-Cordonnier, K. Pavelić, G. Karminski-Zamola, *J. Med. Chem.*, **2010**, 53, 2418.
- <sup>85</sup> C. A. MacRae, R. T. Peterson, *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2015**, 14, 721.
- <sup>86</sup> D. R. Spring, S. Krishnan, H. E. Blackwell, S. L. Schreiber, *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, 124, 1354.
- <sup>87</sup> J. T. Casey, C. O’Cleirigh, P. K. Walsh, D. G. O’Shea, *Microbiol. Methods*, **2004**, 58, 327.
- <sup>88</sup> B. C. Evans, C. E. Nelson, S. S. Yu, K. R. Beavers, A. J. Kim, H. Li, H. M. Nelson, T. D. Giorgio, C. L. Duvall, *J. Vis. Exp.*, **2013**, 73, 50166.

## PRILOG 1: Određivanje strukture jedinjenja 36 i 39

Prilikom pokušaja zatvaranja tiepinskog prstena, polazeći iz etilenskog derivata **16**, dobijena su dva proizvoda: željeni tiepinski derivat **36** i sporedni proizvod **39**.



i) KSCoCH<sub>3</sub> (1,2 ekviv), Pd<sub>2</sub>dba<sub>3</sub> (5 mol%), dppf (10 mol%), NaOt-Bu (1,2 ekviv), PhMe, 170 °C,  $\mu$ W

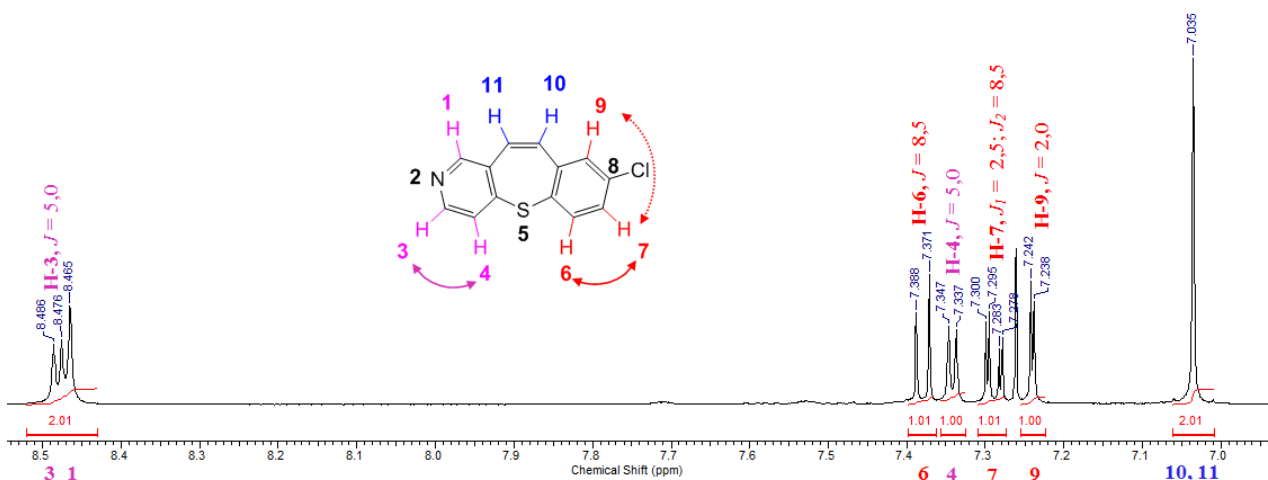
### Šema P1

Struktura dva proizvoda određena je pomoću podataka dobijenih iz 1D i 2D NMR spektara i masenog spektra visoke rezolucije.

### Struktura jedinjenja 36

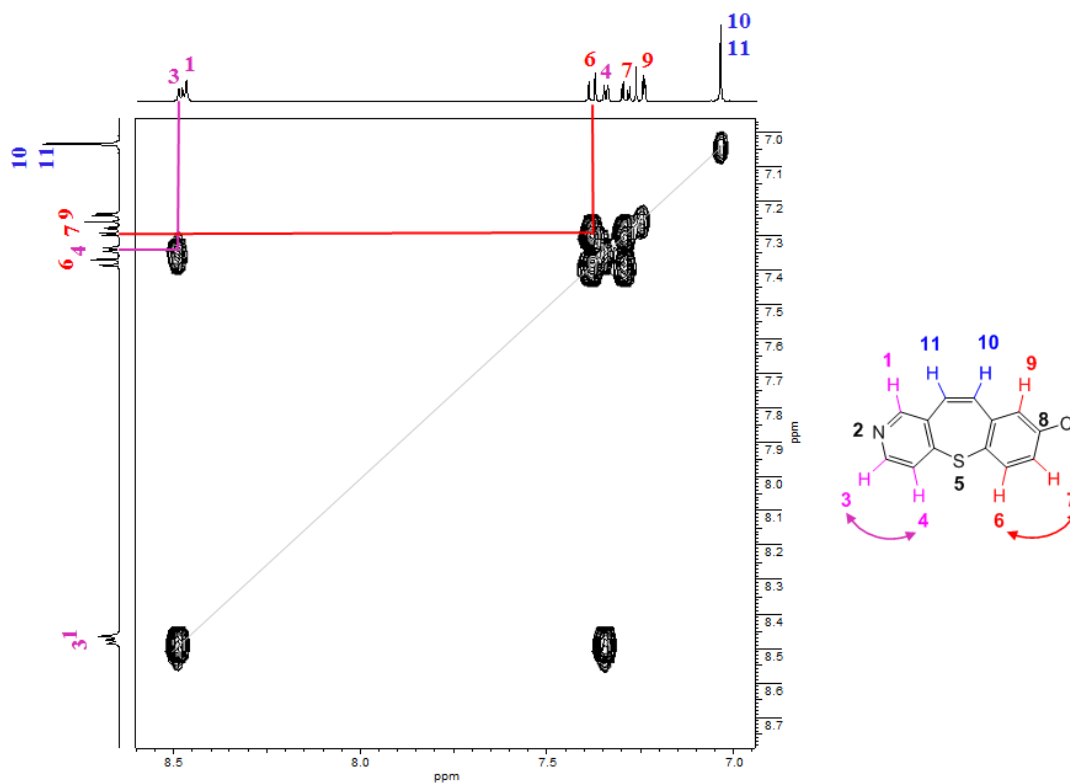
U <sup>1</sup>H NMR spektru jedinjenja **36** (slika P1), svakom protonu se može pridružiti odgovarajući signal. Vodonikov atom u položaju C-1 u susjedstvu nema druge atome vodonika, pa u spektru daje singlet, i to na visokom hemijskom pomeranju zbog susjednog azotovog atoma. Dublet na sličnom hemijskom pomeranju potiče od drugog atoma u susjedstvu azota, H-3. Konstanta kuplovanja ima vrednost 5,0 Hz i posledica je sprezanja H-3 sa vodonikovim atomom u *orto*-položaju, H-4. Signal koji potiče od H-4 takođe je dublet, sa identičnom konstantom kuplovanja. Signal protona u položaju C-6 je dublet, sa vrednošću konstante kuplovanja 8,5 Hz, zbog sprezanja sa atomom H-7 u *orto*-položaju. Atom H-7 daje dublet dubleta, jer pored *orto*-sprezanja sa H-6, ima i *meta*-sprezanje sa protonom H-9 ( $J = 2,5$  Hz). Može se primetiti da u <sup>1</sup>H NMR spektru derivata **36** nije prisutan par dubleta (ili AB kvartet), karakterističan za dva vicinalna protona centralne dvostruke veze semočlanog tiepinskog prstena. Signali dva protona (H-10 i H-11) nalaze se na identičnom hemijskom pomeranju i zbog toga na pomeranju 7,04 ppm formiraju singlet intenziteta 2. Ovaj zanimljiv rezultat posledica

je induktivnog efekta azota (kroz četiri veze) i hlora (kroz pet veza), koji imaju identičan uticaj na elektronsku okolinu odgovarajućih vodonikovih atoma.



Slika P1.  $^1\text{H}$  NMR spektar jedinjenja 36

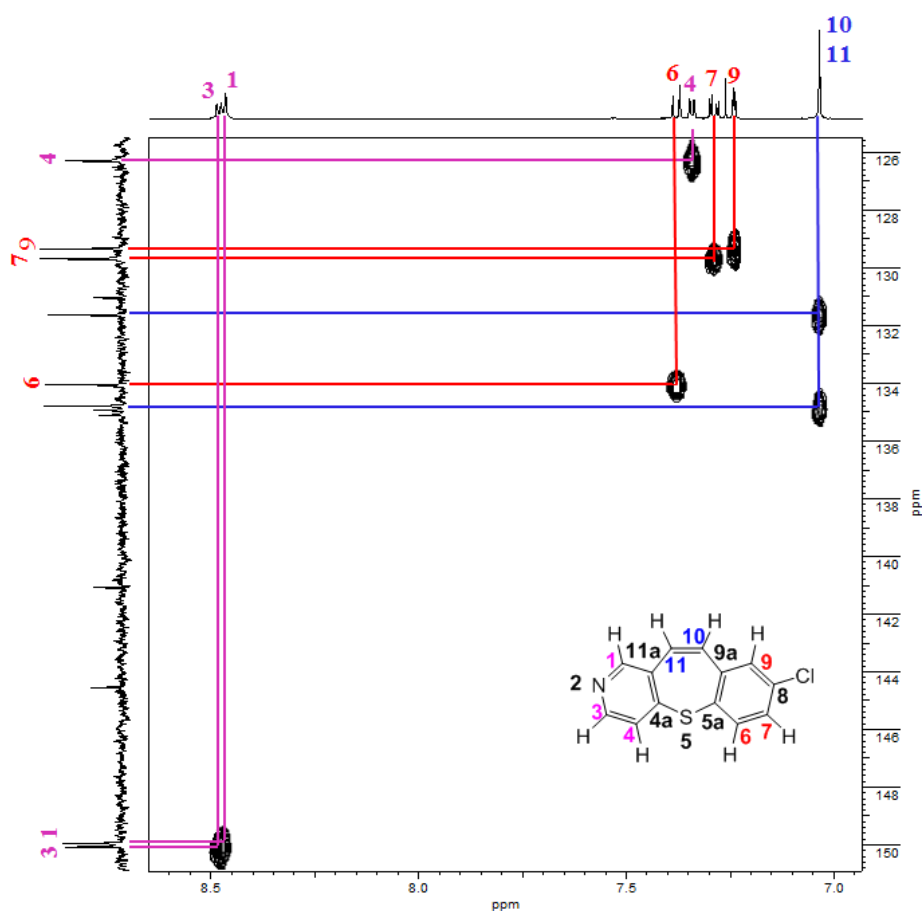
Analizom COSY 2D spektra (slika P2), može se videti da su vodonikovi atomi H-3 i H-4 vezani za susedne ugljenikove atome, što je zaključeno i na osnovu  $^1\text{H}$  NMR spektra. Par protona H-6/H-7 takođe se nalazi na susednim ugljenikovim atomima.



Slika P2. COSY spektar jedinjenja 36



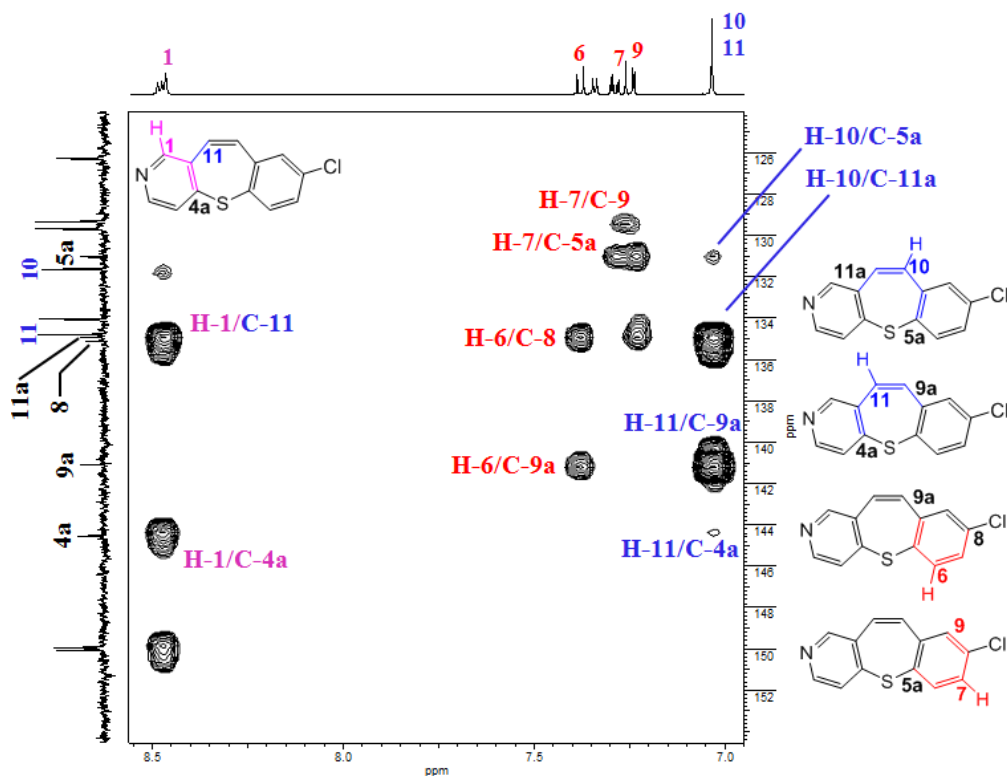
Na osnovu HSQC i HMBC spektra, svakom signalu u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru, pripisan je odgovarajući ugljenikov atom. Analiza HSQC spektra šematski je prikazana na slici P3. Na osnovu direktnih sprezanja vodonikovih atoma sa ugljenikovim atomima za koje su vezani, pridruženi su odgovarajući signali atomima C-1, C-3, C-4, C-6, C-7 i C-9. Dodatna potvrda pretpostavke da protoni H-10 i H-11 imaju isto hemijsko pomeranje je i što singlet na pomeranju 7,04 u  $^1\text{H}$  NMR spektru pokazuje direktno sprezanje sa dva ugljenikova atoma.



Slika P3. HSQC spektar jedinjenja **36**

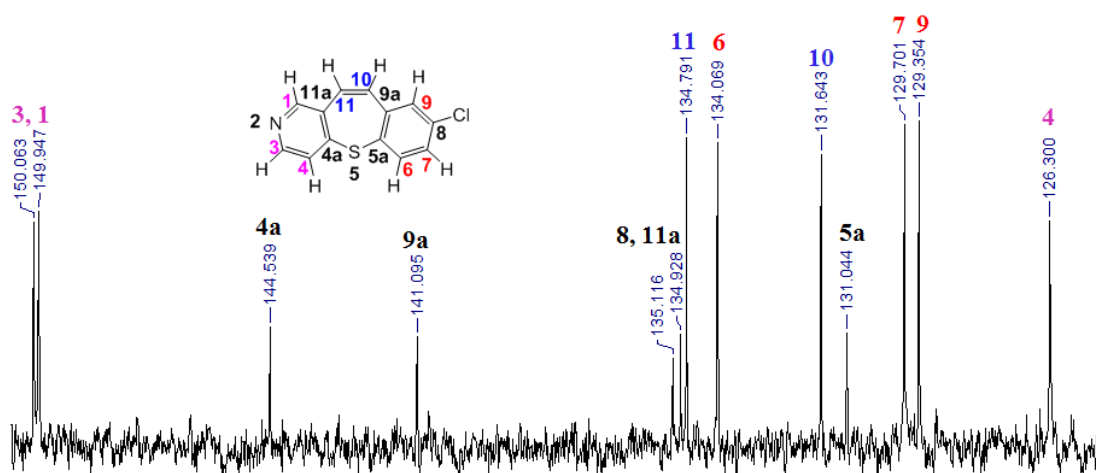
Asignacija kvaternernih ugljenikovih atoma, kao i C-10 i C-11 izvršena je analizom HMBC spektra (slika P4). Ugljenik C-11 identifikovan je na osnovu sprezanja preko tri veze sa vodonikovim atomom H-1. Drugi signal iz  $^{13}\text{C}$  koji u HSQC spektru pokazuje sprezanje sa singletom u  $^1\text{H}$  NMR na pomeranju 7,04, potiče od terciarnog ugljenikovog atoma C-10. Signal kvaternernog ugljenikovog atoma C-5a identifikovan je na osnovu sprezanja preko tri veze sa vodonikovim atomima H-7 i

H-10. Vodonikov atom H-6 spreže se preko tri veze sa dva kvaternerna ugljenika, C-8 i C-9a. Atomi C-8 i C-9a mogu se razlikovati jer se C-9a spreže i sa atomom H-11. Poslednji signal u  $^{13}\text{C}$  NMR spektru, pripada ugljenikovom atomu C-4a, što potvrđuje i sprezanje ovog atoma sa vodikom H-11.



Slika P4. HMBC spektar jedinjenja **36**

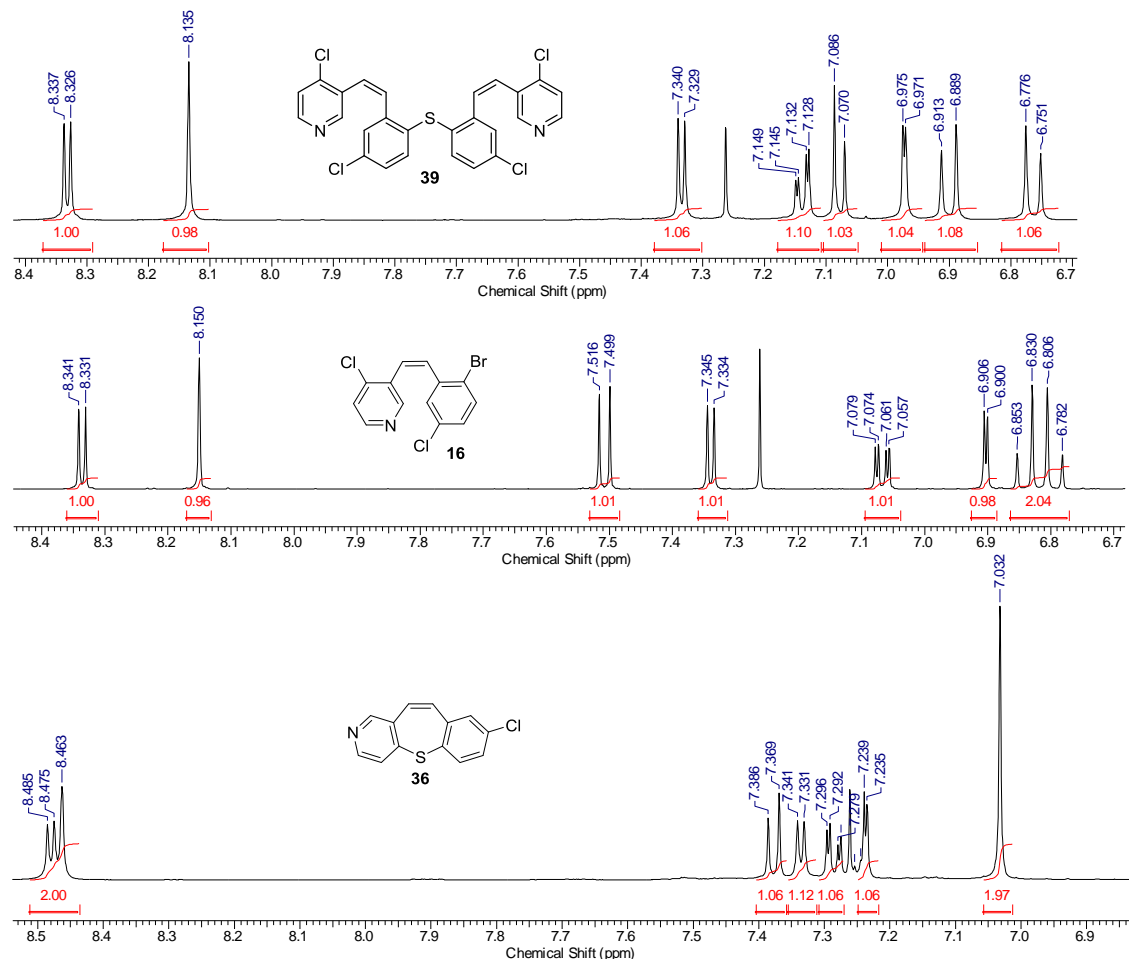
Na slici P5 prikazan je  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **36**, sa potpunom asignacijom svih signala.



Slika P5.  $^{13}\text{C}$  NMR spektar jedinjenja **36**

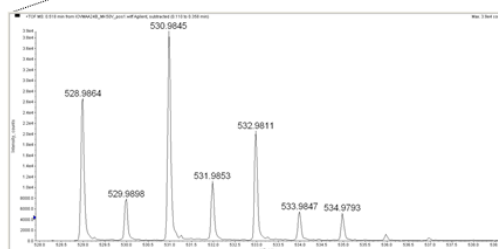
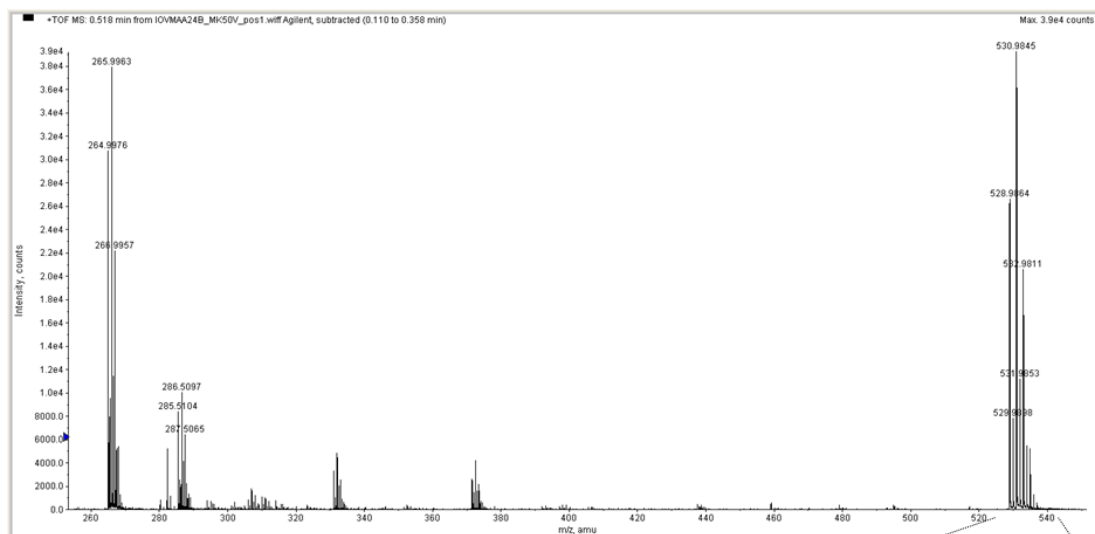
## Struktura jedinjenja 39

Poređenjem  $^1\text{H}$  NMR spektara, zaključeno je da je izolovano jedinjenje **39** po strukturi sličnije polaznom stilbenu **16**, nego tiepinu **36** (slika P6).



Slika P6. Poređenje  $^1\text{H}$  NMR spektara jedinjenja **39** i **36**

Pomoću masenog spektra visoke rezolucije, određena je tačna molekulska masa jedinjenja **39** (slika P7). U spektru se nalaze dva dominantna signala, koji potiču od molekulskog jona  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (530,9845) i dvostruko naelektrisanog molekulskog jona  $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$  (265,9963). Izotopska raspodela pokazuje da u jedinjenju postoje četiri atoma hlora, a nema atoma broma. Na osnovu  $^1\text{H}$  NMR spektra i podataka dobijenih pomoću masene spektrometrije, pretpostavljena je simetrična struktura molekula.



Slika P7. Maseni spektar jedinjenja **39**

## **PRILOG 2: Biografski podaci o kandidatu**

Nina Božinović rođena je 30. marta 1986. godine u Knjaževcu, Republika Srbija. Osnovnu i srednju školu završila je u Knjaževcu. Hemijski fakultet Univerziteta u Beogradu, smer diplomirani hemičar, upisala je 2005. godine. Diplomirala je 27. septembra 2010. godine, na Katedri za organsku hemiju, sa prosečnom ocenom 8,73 i ocenom 10 na diplomskom radu. Doktorske studije upisala je 2010. godine na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od 1. oktobra 2010. godine do 21. septembra 2011. godine bila je zaposlena kao istraživač pripravnik na Inovacionom centru Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Od 22. septembra 2011. godine, zaposlena je kao asistent na Katedri za organsku hemiju na Hemijskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Angažovana je na projektu „Sinteza aminohinolina i njihovih derivata kao antimalarika i inhibitora botulinum neurotoksina A“ (br. 172008), Ministarstva nauke, prosvete i tehnološkog razvoja. Pored osnovnog projekta Ministarstva, bila je angažovana na projektu „New Inhibitors of Botulinum Neurotoxins” – NATO project CBP, EAP.SFPP 983638. U periodu septembar-oktobar 2016. godine, boravila je u Centre de Recherche des Cordeliers, Université Pierre et Marie Curie, Pariz, Francuska, kao korisnik stipendije dobijene od Ambasade Francuske i Francuskog instituta u Srbiji.

Kandidatkinja je držala eksperimentalne i teorijske vežbe iz obaveznih predmeta Organska hemija 1, Organska hemija 2 (Praktikum iz organske hemije i Organska hemija po novoj akreditaciji) i Hemija heterocikličnih jedinjenja, kao i izbornog predmeta Odabrane oblasti organske hemije.

## PRILOG 3

### Izjava o autorstvu

Potpisana Nina S. Božinović

Broj upisa DH20/2010

### Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

**Razvoj metode za sintezu biološki aktivnih azepinskih i tiepinskih derivata – dvostruko *N*- i *S*-arilovanje katalizovano kompleksima paladijuma**

- 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 kršila autorska prava i koristila intelektualnu svojinu drugih lica.

Potpis doktoranda

---

U Beogradu,

---

## PRILOG 4

### Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora Nina S. Božinović

Broj upisa **DH20/2010**

Studijski program doktor hemijskih nauka

Naslov rada: **Razvoj metode za sintezu biološki aktivnih azepinskih i tiepinskih derivata – dvostruko N- i S-arilovanje katalizovano kompleksima paladijuma**

Mentori akademik Bogdan Šolaja  
dr Igor Opsenica, docent Hemijskog fakulteta Univerziteta u Beogradu

Potpisani \_\_\_\_\_

Izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao 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.

Potpis doktoranda

U Beogradu,  
\_\_\_\_\_

## PRILOG 5

### Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**Razvoj metode za sintezu biološki aktivnih azepinskih i tiepinskih derivata –  
dvostruko N- i S-arilovanje katalizovano kompleksima paladijuma**

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.

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

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci).

Potpis doktoranda

U Beogradu,



## PRILOG 6: Spisak radova i saopštenja koji su proistekli iz teze

### Naučni radovi:

#### ● Radovi objavljeni u istaknutim časopisima međunarodnog značaja (M22):

1. **Božinović N.**; Opsenica, I.; Šolaja, B. A. Double Palladium Catalyzed Synthesis of Azepines, *Synlett*, **2013**, 24, 0049–0052.
2. **Božinović, N.**; Šegan, S.; Vojnović, S.; Pavić, A.; Šolaja, B. A.; Nikodinovic-Runic, J.; Opsenica, I. M. Synthesis and anti-Candida Activity of Novel Benzothiepine[3,2-*c*]pyridine Derivatives, *Chem. Biol. Drug. Des.*, **2016**, 88, 795–806.

#### ● Radovi objavljeni u časopisima međunarodnog značaja (M23):

1. **Božinović, N.**; Novaković, I.; Kostić Rajačić, S.; Opsenica, I. M.; Šolaja, B. A. Synthesis and antimicrobial activity of azepine and thiepine derivatives, *J. Serb. Chem. Soc.*, **2015**, 80, 839–852.
2. **Božinović, N.**; Šolaja, B. A.; Opsenica, I. M. Microwave-assisted synthesis of azepines via nucleophilic aromatic substitution, *J. Serb. Chem. Soc.*, **2016**, 81, 1225–1230.

#### ● Радови саопштени на скуповима међународног значаја штампани у изводу (M34):

1. **Božinović, N. S.**; Vranić, M.; Tot, M.; Opsenica, I.; Šolaja, B. A. Double *N*- and *S*-arylation for synthesis of azepine and thiepine derivatives. 8th International Conference of the Chemical Societies of the South-East European Countries, Belgrade, Serbia, June 27-29, **2013**, izvodi radova O 01 BS-Sy, str. 11. ISBN 978-86-7132-053-5.

#### ● Радови саопштени на скуповима националног значаја штампани у изводу (M64):

1. **Božinović, N.**; Mitrić, M.; Opsenica, D. M.; Šolaja, B. A. Sinteza i antimalarijska aktivnost novih 4-aminohinolinskih derivata holne kiseline, 49. Savetovanje

Srpskog hemijskog društva, Kragujevac, 13. i 14. maj **2011**, izvodi radova OH26-P, str. 144; ISBN 978-86-7132-045-0.

2. **Božinović, N. S.**; Opsenica, I.; Šolaja, B. A. Novi postupak za sintezu diaril[*b,f*]azepina, 50. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Beograd, 14. i 15. jun **2012**, izvodi radova OH O1, str. 142; ISBN 978-86-7132-048-1.
3. **Božinović, N. S.**; Vranić, M.; Opsenica, I.; Šolaja, B. A. Sinteza novih tiepinskih derivata, 51. Savetovanje Srpskog hemijskog društva, Niš, 5-7. jun **2014**, izvodi radova OH P19, str. 109; ISBN 978-86-7132-054-2.
4. **Božinović, N. S.**; Nikodinović-Runić, J.; Opsenica, I. M.; Šolaja, B. A. Sinteza tiepinskih derivata kao potencijalnih antifungalnih agenasa reakcijom Suzukijevog kuplovanja, Treća konferencija mladih hemičara Srbije, Beograd, 24. oktobar **2015**, izvodi radova HS P 14, str. 41; ISBN 978-86-7132-059-7.