

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DOROTEJA NOVAK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DOROTEJA NOVAK

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA NOVIH ZAVIRALCEV PODENOTE A
BAKTERIJSKE DNA GIRAZE**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF NOVEL BACTERIAL DNA
GYRASE A INHIBITORS**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm.

Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in v Centru za masno spektroskopijo na Inštitutu Jožef Stefan.

Zahvala

Hvala vsem, ki ste tako ali drugače pripomogli k nastanku te naloge.

Mentorju, prof. dr. Marku Anderluhu, mag. farm., iskrena hvala za izkazano zaupanje, strokovno pomoč in vodenje, prijaznost in nasvete.

Hvala tistim, ki ste naredili ta leta vredna in lepa. Dekleta, hvala za vse pogovore in spodbudne besede. Anja, tebi iz srca najlepša hvala za trdno prijateljstvo, čas in vse kave, ki spadajo zraven.

Globoko hvaležna sem svoji družini – že zato, ker ste in ker verjamete vame, ko sama ne. To je za vas.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm.

Doroteja Novak

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Mitja Kos, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Nina Kočevar Glavač, mag. farm.

Vsebina

1	Uvod.....	1
1.1	Topoizomeraze.....	2
1.2	DNA giraza	4
1.3	Podenota GyrA	5
1.4	Znani zaviralci podenote GyrA.....	6
1.5	Novi zaviralci podenote A bakterijske DNA giraze (NBTI)	8
2	Namen dela.....	13
3	Materiali in metode	16
3.1	Materiali.....	16
3.1.1	Reagenti in topila.....	16
3.1.2	Aparature	16
3.2	Metode	17
3.2.1	Tankoplastna kromatografija (TLC).....	17
3.2.2	Kolonska kromatografija	17
3.2.3	¹ H in ¹³ C jedrska magnetna resonanca (NMR).....	17
3.2.4	Masna spektroskopija (MS).....	17
3.2.5	Infrardeča spektroskopija (IR).....	18
3.2.6	Določanje temperature tališča	18
4	Ekperimentalni del.....	19
4.1	Reakcijske sheme.....	19
4.2	Sintezni postopki in analizni rezultati.....	21
4.2.1	Sinteza (1R,4R)-4-((t-butoksikarbonil)amino)cikloheksankarboksilne kisline (34) 21	
4.2.2	Sinteza t-butil ((1R,4R)-4-karbamoilcikloheksil)karbamata (35)	22
4.2.3	Sinteza t-butil ((1R,4R)-4-((6-meoksikinolin-4-il)karbamoil)cikloheksil)karbamata	23
4.2.4	Sinteza (1R,4R)-4-((6-metoksikinolin-4-il)karbamoil)cikloheksanaminijevega klorida.....	25
4.2.5	Poskus sinteze (1R, 4R)-N-(6-metoksikinolin-4-il)-4-(((1-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)amino)cikloheksankarboksamida z uporabo NaCNBH ₃	26

4.2.6	Sinteza (1R, 4R)-N-(6-metoksikinolin-4-il)-4-(((1-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)amino)cikloheksankarboksamida iz alkohola preko tvorbe metansulfona	28
4.2.7	Sinteza (1R,4R)-N-(6-metoksikinolin-4-il)-4-(((1-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)amino)cikloheksankarboksamida z uporabo NaBH(OAc) ₃	29
4.2.8	Sinteza (1R, 4R)-N-(6-metoksikinolin-4-il)-4-(((1-metil-1H-benzo[d]imidazol-2-il)metil)amino)cikloheksankarboksamida z uporabo NaBH ₄	31
4.2.9	Sinteza (1R, 4R)-4-(((1-(4-fluorofenil)-1H-pirazol-4-il)metil)amino)-N-(6-metoksikinolin-4-il)cikloheksankarboksamida	33
4.2.10	Sinteza (1R, 4R)-N-(6-metoksikinolin-4-il)-4-(((1-fenil-1H-pirazol-4-il)methyl)amino)cikloheksankarboksamida	34
4.2.11	Sinteza (1R, 4R)-4-(((2,8-dimetilimidazo[1,2-a]piridin-3-il)metil)amino)-N-(6-metoksikinolin-4-il)cikloheksankarboksamida	36
4.2.12	Sinteza 8-ciano-N-((1R, 4R)-4-((6-metoksikinolin-4-il)karbamoil)cikloheksil)imidazo[1,2-a]piridin-2-karboksamida	38
4.2.13	Poskus sinteze 2-(hidroksimetil)imidazo[1,2-a]piridin-8-karbonitrila.....	40
5	Razprava.....	42
5.1.1	Razprava k uvedbi zaščitne skupine Boc za amine	42
5.1.2	Razprava k pretvorbi karboksilne kisline v primarni amid	43
5.1.3	Razprava k tvorbi vezi med aril bromidom in karboksamidom z uporabo in situ tvorjenega katalizatorja Pd(BINAP).....	43
5.1.4	Razprava k selektivni odščiti zaščitne skupine Boc	44
5.1.5	Razprava k sintezi sekundarnega amina iz alkohola preko tvorbe metansulfona	45
5.1.6	Razprava k sintezi končnih spojin preko reakcije reduktivnega aminiranja .	46
5.1.7	Razprava k tvorbi amidne vezi z uporabo sklopitvenega reagenta TBTU	48
5.1.8	Razprava k poskusu redukcije aldehida do alkohola z uporabo NaBH ₄ in I ₂	50
6	Sklep.....	51
7	Literatura	52

Kazalo slik

<i>Slika 1: Model konformacijskih sprememb v katalitičnem ciklu DNA giraze pri uvajanju negativnih supernavojev.....</i>	<i>5</i>
<i>Slika 2: Struktura DNA giraze.....</i>	<i>6</i>
<i>Slika 3: Vezava kinolonov.....</i>	<i>7</i>
<i>Slika 4: Strukture spojin nekaterih predstavnikov NBTI.....</i>	<i>8</i>
<i>Slika 5: Vezava NBTI in strukture nekaterih predstavnikov.....</i>	<i>9</i>
<i>Slika 6: Vezava različnih zaviralcev DNA giraze in pomembni aminokislinski preostanki za razvoj rezistence.</i>	<i>10</i>
<i>Slika 7: Najpogosteje zastopani fragmenti posameznih delov NBTI v literaturi.</i>	<i>12</i>
<i>Slika 8: Spojine zadetki pri in silico načrtovanju na osnovi strukture (1. del).</i>	<i>13</i>
<i>Slika 9: Spojine zadetki pri in silico načrtovanju na osnovi strukture (2. del).</i>	<i>14</i>
<i>Slika 10: Splošna shema načrtovanih končnih spojin.....</i>	<i>14</i>
<i>Slika 11: Strukture zelenih končnih spojin.</i>	<i>15</i>
<i>Slika 12: Sintezna shema 1.</i>	<i>19</i>
<i>Slika 13: Sintezna shema 2.</i>	<i>20</i>
<i>Slika 14: Mehanizem uvedbe Boc-zaščite na spojino 1.....</i>	<i>42</i>
<i>Slika 15: Mehanizem nastanka neželenega produkta, mešanega anhidrida, pri uporabi Boc-anhidrida za zaščito amino skupine.</i>	<i>43</i>
<i>Slika 16: Shematski prikaz in situ tvorbe Pd(BINAP) katalizatorja in katalitičnih ciklov tvorbe vezi med aril bromidom in karboksamidom.</i>	<i>44</i>
<i>Slika 17: Mehanizem odščite Boc-zaščitne skupine z uporabo HCl/AcOH.....</i>	<i>45</i>
<i>Slika 18: Mehanizem tvorbe sekundarnega amina iz alkohola, ki smo ga predhodno aktivirali za nukleofilni napad s pretvorbo v metansulfon.</i>	<i>46</i>
<i>Slika 19: Mehanizem reakcije reduktivnega aminiranja prikazan za tvorbo spojine 9.</i>	<i>47</i>
<i>Slika 20: Mehanizem nastanka amidne vezi z uporabo sklopitvenega reagenta TBTU.....</i>	<i>49</i>
<i>Slika 21: Mehanizem nastanka gvanidinijevih spojin kot stranskih produktov pri uporabi uronijevih sklopitvenih reagentov.</i>	<i>50</i>

Povzetek

Iskanje novih protibakterijskih učinkovin, ki bi bile učinkovite zlasti proti multirezistentnim sevom, ostaja ena izmed poglavitnih nalog sodobne medicine. Zaradi svoje esencialne vloge v bakterijskih celicah je DNA giraza še vedno privlačna klinično validirana tarča. V zadnjih letih poteka intenziven razvoj obetavnih novih zaviralcev podenote A bakterijske DNA giraze (NBTI), ki zaradi inovativnega mehanizma delovanja ne izkazujejo navzkrižne rezistence s fluorokinoloni, trenutno edinimi zaviralci DNA giraze v klinični uporabi.

V okviru magistrske naloge smo načrtovali in sintetizirali NBTI z literaturno znanim metoksikinolinskim delom LHS in aminocikloheksanskim distančnikom ter novimi fragmenti RHS. Kot osnova za načrtovanje so služili rezultati predhodno opravljenega *in silico* načrtovanja na podlagi strukture, kjer so se izbrani fragmenti RHS izkazali kot najboljše sidrani v globok hidrofobni žep vseh preiskovanih mutiranih modelov DNA giraze *S. aureus*. Večinoma gre za biciklične *N*-aromatske strukture s pirazolnim in imidazolnim obročem, ki naj bi preko van der Waalsovih interakcij zagotavljale ustrezno vezavo.

V magistrski nalogi opisujemo sintezo in optimizacijo posameznih stopenj sinteze načrtovanih spojin, kar bo lahko v pomoč pri sintezi podobnih NBTI. Zaradi odsotnosti rezultatov biološkega testiranja celokupne uspešnosti načrtovanja in sinteze spojin zaenkrat še ni mogoče oceniti.

Ključne besede: DNA giraza, metoksikinolin, NBTI, RHS, topoizomeraza

Abstract

The search for new antibacterial agents, which would be effective particularly against multiresistant strains, remains one of the main tasks of the modern medicine. The DNA gyrase is still an attractive and clinically validated target for the drug development due to its essential role in bacterial cells. A promising novel type of the bacterial DNA gyrase A inhibitors (NBTI) has been intensively developed in recent years. Since NBTIs inhibit the enzyme by a novel mode of action they do not exhibit cross-resistance with fluoroquinolones, which are currently the only DNA gyrase inhibitors in clinical use.

In our thesis, we have planned and synthesized NBTIs with the literally known methoxyquinoline as LHS, the aminocyclohexane linker and some novel RHS fragments. RHS fragments were obtained from the results of previously performed *in silico* structure based design, where these RHS fragments were identified as properly docked within the deep hydrophobic binding pocket of all investigated *S. aureus* GyrA mutant models. Most of them are pyrazole- or imidazole-based bicyclic *N*-heteroaromatic structures, and are expected to provide appropriate binding via van der Waals interactions.

The described synthesis and optimization of individual stages can be of great help in the synthesis of similar NBTIs. We believe that the synthesized compounds will be a good basis for further optimizations and will contribute to better understanding of the structure-activity relationship of RHS of the compounds with inhibitory activity against bacterial DNA gyrase A despite the absence of biological testing results.

Key words: DNA gyrase, methoxyquinoline, NBTI, RHS, topoisomerase

Seznam okrajšav

ACN	acetonitril	ekv	ekvivalent
AcOH	ocetna kislina	Et ₃ N	trietilamin
ADP	adenozin-5'-difosfat	EtOAc	etilacetat
ADPNP	5'-adenilil-β,γ- imidodifosfat	EtOH	etanol
Ala	alanin	Glu	glutaminska kislina
Asp	asparaginska kislina	Gly	glicin
ATP	adenozin-5'-trifosfat	GSK	GlaxoSmithKline
ATR	oslabljen popoln odboj	GyrA	podenota A DNA giraze
BINAP	2,2'-bis(difenilfosfino)- 1,1'-binaftil	GyrB	podenota B DNA giraze
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil	HBTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil- <i>O</i> - (1 <i>H</i> -benzotriazol-1- il)uronijev
Boc ₂ O	di- <i>tert</i> -butil dikarbonat		heksafluorofosfat
CDCl ₃	devteriran kloroform	hERG	gen, ki kodira α podenoto kalijevega kanala K _v 11.1 (<i>human ether-a-go-go-</i> <i>related gene</i>)
CTD	C-terminalna domena		
d	dublet	Hex	heksan
dba	dibenzilidenaceton	HOBt	1-hidroksibenzotriazol
dd	dublet dubleta	HRMS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
DKM	diklorometan	IC ₅₀	srednja zaviralna koncentracija
DMSO-d ₆	devteriran dimetilsulfoksid	IR	infrardeča spektroskopija
DNA	deoksiribonukleinska kislina	<i>J</i>	sklopitvena konstanta
dsDNA	dvojnovijska DNA		
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>		

Leu	levcin		delovanjem (quantitative structure-activity relationship)
LHS	levi del strukture NBTI (left-hand side)		
Lys	lizin	Rf	retencijski faktor
m	multiplet	RHS	desni del strukture NBTI (right-hand side)
Me	metil	s	singlet
MeOH	metanol	<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Met	metionin	Ser	serin
MF	mobilna faza	T	temperatura
Mr	molska masa	<i>t</i>	<i>terc</i>
MS	masna spektroskopija	t	triplet
NBTI	novi zaviralci podenote A bakterijske giraze	TBTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-O-(1H-benzotriazol-1-il)uronijev tetrafluoroborat
NMR	jedrska magnetna resonanca	td	triplet dubleta
NTD	N-terminalna domena	THF	tetrahidrofuran
ParC/ParE	podenota topozomeraze IV	TLC	tankoplastna kromatografija
Ph	fenil	tt	triplet tripleta
QRDR	regija kinolonskih odpornostnih determinant (Quinolone Resistance-Determining Region)	UV	ultravijolično valovanje
QSAR	kvantitativno razmerje med strukturo in	ZDA	Združene države Amerike
		δ	kemijski premik (ppm)
		η	izkoristek
		ν	frekvenca (cm ⁻¹)

1 Uvod

Odkritje in uporaba antibiotikov predstavljata eno najpomembnejših medicinskih odkritij, vendar sta njihova prekomerna in napačna raba povzročili selekcijo in globalno širjenje rezistentnih sevov bakterij (1). Že Alexander Fleming je leta 1945 opozoril na razvoj rezistentnih »mutantnih oblik« *S. aureus* ob nepravilni rabi penicilina. Imel je prav in po letu razširjene uporabe penicilina so se pojavili številni odporni sevi, le nekaj let kasneje pa je bilo nanj občutljivih manj kot 50 % sevov (2). Po navedbah Svetovne zdravstvene organizacije antibiotična rezistenca danes predstavlja resno grožnjo dosežkom moderne medicine (3), na kar opozarja tudi poročilo iz leta 2017 o prvi smrti pacientke v ZDA, ki je umrla zaradi okužbe z Gram negativno bakterijo, odporno na vse razpoložljive antibiotike (4).

Prihodnost moderne medicine sloni na učinkovitih antibiotikih. Med leti 1930 in 1962 je tržišče doseglo 20 novih razredov antibiotikov, ki so bili učinkoviti približno naslednjih 50 let. Po grobi napovedi bi tako potrebovali najmanj 20 novih razredov, ki bi vzdrževali medicino do leta 2050 (5). Od leta 2000 pa do konca leta 2015 je trg doseglo 5 novih razredov antibiotikov, vsi pa so učinkoviti le proti Gram pozitivnim bakterijam (6).

Težave pri odkrivanju novih protibakterijskih učinkovin zajemajo med drugim tudi izbiro ustrezne tarče. Pri njeni izbiri je priporočljivo upoštevati, da je za bakterije esencialna, zato zaviranje encima ali omejitev funkcije encima vodi v zaustavitev rasti ali celo smrt bakterije. Struktura tarče mora biti med bakterijskimi vrstami dovolj dobro ohranjena, da zagotavlja dovolj širok spekter antibiotičnega delovanja, hkrati pa mora biti zaviranje strukturnih homologov z enako ali podobno funkcijo v sesalskih celicah čim manjše, da se v čim večji meri izognemo toksičnosti. Na tarčnem encimu ali strukturi morajo obstajati mesta, ki omogočajo vezavo majhnih molekul in s tem izvršitev biološkega učinka (»drugability« tarče). Poleg omenjenega tarča ne sme biti podvržena hitremu razvoju rezistence, potencialne učinkovine pa morajo posedovati še ustrezno kemijsko strukturo, ki zagotavlja zadosten prehod v bakterijo in izogib efluksu, kar je še posebej pomembno pri Gram negativnih bakterijah (7).

Večina obstoječih antibiotikov deluje na biokemijske procese, v katerih so udeleženi bakterijska celična stena, DNA ali ribosomi. Zaviranje teh procesov vodi v zaustavitev

celične rasti in delitve ali njeno smrt (8). Eden takih procesov je tudi podvojevanje genskega materiala in učinkovito zaviranje kateregakoli esencialnega encima, ki sodeluje pri tem, bo negativno vplivalo na preživetje celice. Ključno vlogo pri replikaciji imajo encimi, imenovani topoizomeraze, ki so odgovorni za modulacijo topologije DNA – življenjsko funkcijo pri sintezi proteinov, podvojevanju, popravilu in dekatenciji DNA (9).

1.1 Topoizomeraze

Antiparalelna konfiguracija dveh medsebojno navitih komplementarnih verig DNA zagotavlja genetsko stabilnost in zaščito, vendar hkrati povzroča tudi topološke težave (10), zlasti pri procesih, ki zahtevajo dostop do nukleotidnega zaporedja (11). Te se pojavljajo tudi zaradi dolžine verige DNA, ki je lahko nekaj tisočkrat večja od premera celice, v kateri se nahaja, in posledično vodi v supernavitje genskega materiala (12) in omejeno rotacijo (10). Pri procesih transkripcije, rekombinacije in replikacije, ki zahtevajo začasno ali trajno ločitev komplementarnih verig dvojnega heliksa (12, 13), tako prihaja do nakopičenja pozitivnih supernavojev pred premikajočo se polimerazo in negativnih navojev za mestom delovanja polimeraze (12). Prekomerno navitje verige DNA lahko povzroči mutagene ali citotoksične prekinitve verige (11), zato se v celicah nahajajo encimi iz skupine topoizomeraz, ki z dvema zaporednima reakcijama transesterifikacije spreminjajo topološko stanje DNA (14) ter tako nadzorujejo njeno supernavitje in ohranjajo topološko homeostazo (10).

Vse topoizomeraze imajo v katalitičnem mestu nukleofilni tirozin, ki sodeluje pri prekinitvi verige (11). Ta se vrši z nastankom začasne kovalentne povezave med tirozinom in fosfatom verige DNA in sočasno prekinitvijo fosfodiesterske vezi v verigi DNA. Tako se ustvari prostor za premik ene verige DNA ali dsDNA. V končni stopnji poteče cepitev kovalentnega adukta DNA-encim in ponovni nastanek fosfodiesterske vezi (14). Začasna prekinitve lahko poteče na eni ali obeh komplementarnih verigah DNA, kar je tudi osnova za delitev topoizomeraz v dva razreda. Topoizomeraze tipa I uvajajo prekinitve na enojni verigi DNA, medtem ko topoizomeraze tipa II vršijo prekinitve dvojne verige. Glede na strukturo, mehanizem in evolucijo lahko oba tipa nadalje razdelimo na tipe IA, IB, IC, IIA in IIB (13).

Topoizomeraze tipa II omogočajo prehod ene dsDNA preko druge (14) in tako razrešijo topološke težave pri križanju dveh heliksov (12), npr. med katenacijo in dekatencijo

krožne dsDNA in relaksacijo pozitivno ali negativno supernavite DNA (14). Relativna učinkovitost posameznih encimov pri katalizi teh procesov je odvisna od strukture substrata DNA in nastalega kompleksa encim-DNA. DNA giraza, encim iz skupine topoizomeraz IIA, denimo preferenčno sprošča pozitivno supernavito DNA zaradi specifičnega položaja DNA verige med cepitvijo (14), hkrati pa ji to daje tudi edinstveno zmožnost uvajanja negativnih navojev v kovalentno zaprto strukturo dsDNA (14, 13).

V skupino topoizomeraz IIA poleg DNA giraze uvrščamo tudi topoizomerazo IV, ki sodeluje pri dekatenciji produktov replikacije, sprošča pozitivne in negativne navoje ter uvaja in razrešuje vozle (13). Oba encima sta heterotetramera, za razliko od evkariontskih topoizomeraz tipa II, ki so aktivne kot homodimeri. DNA girazo sestavljata dve podenoti GyrA in dve podenoti GyrB (A_2B_2), medtem ko je topoizomeraza IV paralog DNA giraze in je sestavljena iz dveh podenot ParC in dveh podenot ParE (C_2E_2), ki sta homologni podenotama DNA giraze (15). GyrA in ParC sta podenoti s tirozinom v aktivnem mestu, zato sta udeleženi pri interakcijah z DNA in premiku verige, GyrB in ParE podenoti pa predstavljata ATP-azni domeni (15, 16).

Topoizomeraza IV in DNA giraza predstavljata ključna encima za viabilnost celic, kar skupaj s kompleksnostjo kataliziranih reakcij predstavlja mnoge možnosti za razvoj protibakterijskih učinkovin, ki bi obšle obstoječe mehanizme rezistence z vezavo na edinstvena vezavna mesta, z novimi strukturnimi razredi ali z novimi mehanizmi zaviranja. Zaviralci topoizomeraz tipa II navadno delujejo na oba encima, kar otežuje razvoj rezistence (15).

Bakterijske topoizomeraze tipa IIA so homologi človeške topoizomeraze II, ki predstavlja tarčo za razvoj protirakavih učinkovin. Topoizomeraze kot vir energije uporabljajo ATP, kar je pogosto tudi pri mnogih človeških encimih, npr. protein-kinazah. Zaradi možnih podobnosti vezavnih mest med bakterijskimi topoizomerazami IIA in človeškimi encimi morajo zaviralci izkazovati selektivnost za bakterijske encime (15).

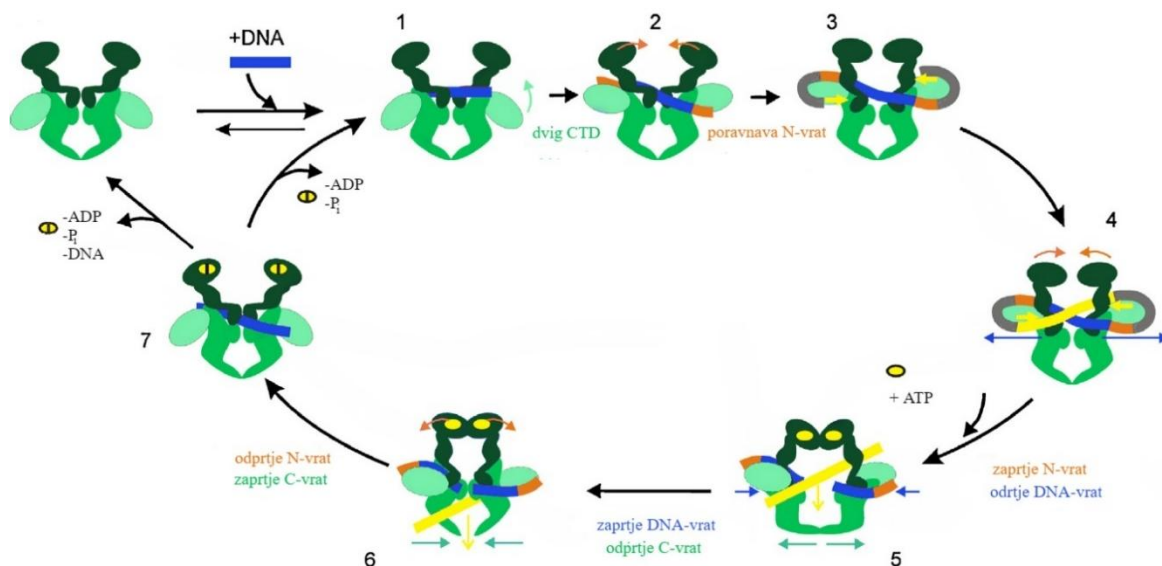
1.2 DNA giraza

DNA giraza je topoizomeraza tipa II, ki se od drugih razlikuje po edinstveni zmožnosti uvajanja negativnih supernavojev ob prisotnosti ATP, v njegovi odsotnosti pa lahko sprosti supernavoje po obratnem mehanizmu. Nahaja se v vseh bakterijah, odkrili so jo tudi v rastlinah in nekaterih parazitih, ne pojavlja pa se v evkariontih. Prav slednje in dejstvo, da gre za esencialen bakterijski encim, je razlog, da je tarča nekaterih protibakterijskih učinkovin (13).

Celotna kristalna struktura DNA giraze ali topoizomeraze IV zaenkrat še ni znana, vendar so določili kristalne strukture fragmentov obeh podenot encimov. Podenoto GyrB so kristalizirali v kompleksu z na hidrolizo odpornim analogom ATP ADPNP in več zaviralci, kristalno struktura GyrA pa so razrešili s kristalizacijo v kompleksu z zaviralci in DNA (15). Skupaj s kristalno strukturo človeških strukturnih homologov topoizomeraze II so identificirali tri vrata: N-vrata, DNA-vrata in C-vrata, ki z zaporednim odpiranjem in zapiranjem omogočijo prehod dsDNA med posameznimi fazami katalitičnega cikla DNA giraze (15). N-vrata tvori N-terminalna domena GyrB, DNA-vrata predstavljajo stik med GyrA, GyrB in DNA, kjer se DNA cepi, C-vrata pa predstavljajo C-terminalni konci zvitja verig (16). Podrobnejšo strukturo prikazuje slika 2 v poglavju 1.3.

Uvajanje negativnih supernavojev je kompleksen proces, ki še ni povsem pojasnjen, vendar v grobem poteka v sledečem vrstnem redu: G-segment DNA (cepljen segment) asociira z encimom, sledi navitje okoli 130 baznih parov dolgega segmenta okoli C-terminalnega konca giraze, kar v naslednji stopnji olajša T-segmentu DNA (transportiran segment), da doseže N-vrata. Ta se ob vezavi ATP zaprejo in tako ujamejo T-segment. Sledi cepitev G-segmenta DNA in prehod T-segmenta skozi odprta DNA-vrata, nato skozi cepljen G-segment in C-vrata ob sočasni vezavi in hidrolizi ATP. Hidroliza ATP in sprostitvev ADP odpre N-vrata in pripravi encim za naslednji cikel. En cikel uvede dva negativna navoja v molekulo DNA ob porabi dveh molekul ATP (16), za cepitev dsDNA pa sta potrebna še dva iona Mg^{2+} (13). Proces shematsko predstavlja slika 1.

Cikel uvedbe negativnih navojev predstavlja mnogo možnosti delovanja zaviralcev. Ti lahko interferirajo z vezavo ali cepitvijo DNA, prehodom verige ali hidrolizo ATP (16).

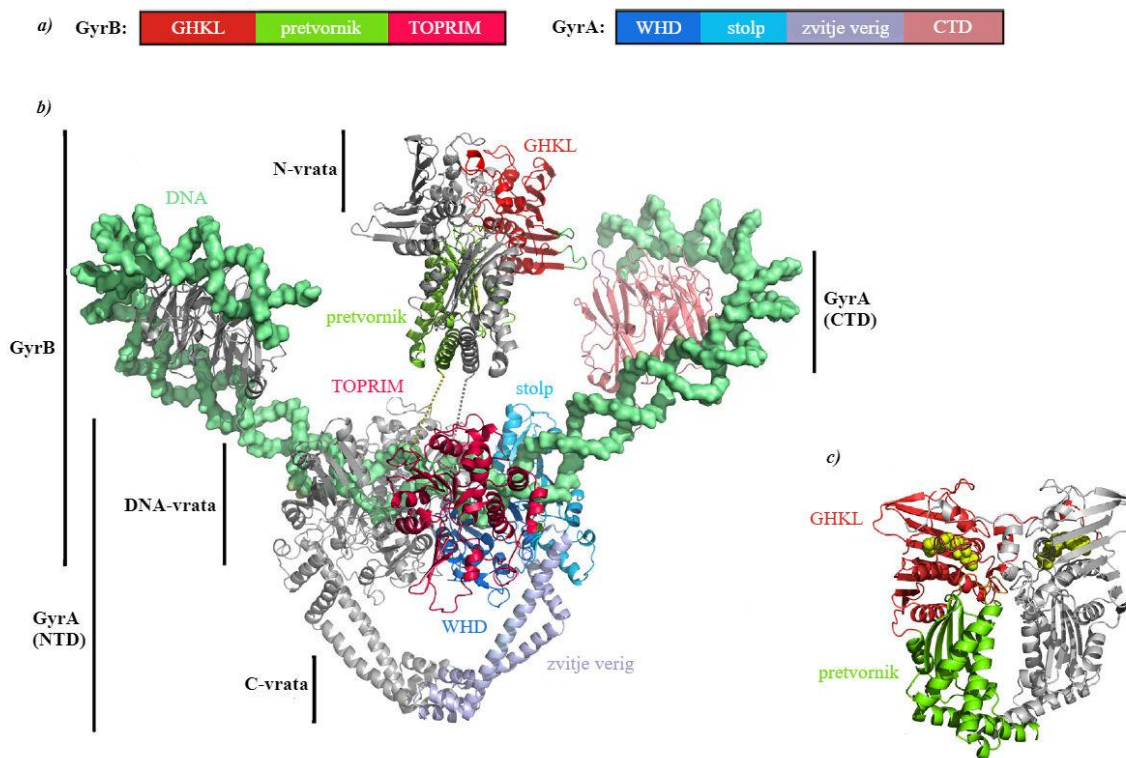


Slika 1: Model konformacijskih sprememb v katalitičnem ciklu DNA giraze pri uvajanju negativnih supernavojev. GyrB je na sliki označena temno zeleno, NTD GyrA zeleno in CTD GyrA svetlo zeleno. G-segment (modra) se veže na DNA-vrata (1). Prvi stik sosednje regije DNA (oranžna) s CTD povzroči dvig CTD (1 → 2). Sledi ovitje DNA (siva) okoli CTD, kar povzroči poravnava N-vrat (2 → 3) in pozicionira T-segment (rumeno) v zgornjo votlino DNA-giraze. Pri tem DNA-giraza orientira G- in T-segment za prehod verig. Vezava ATP (rumena) povzroči zaprtje N-vrat (4 → 5). Odprtje DNA vrat omogoča prehod T-segmenta (5). Sledi zaprtje DNA vrat, odprtje C-vrat in sprostitvev T-segmenta (5 → 6). Po hidrolizi ATP se N-vrata ponovno odprejo (6 → 7). Prirejeno po (18).

1.3 Podenota GyrA

Podenoto GyrA v DNA girazi *E. coli* sestavljata 59 kDa velika N-terminalna domena (NTD), ki je odgovorna za cepitev DNA, in 35 kDa velika C-terminalna domena (CTD) s pozitivno nabito površino (17), okoli katere se navije DNA. CTD ima ključno nalogo pri uvajanju negativnih supernavojev, njena odstranitev pa spremeni girazo v encim, ki zgolj relaksira DNA (13).

NTD je sestavljena iz treh poddomen: krilate heliksne domene (WHD), »stolp« domene (ang. »tower« domain) in domene zvitja verig (18). Pravzaprav gre za dimer s približno 30 Å veliko votlino, ki jo zgoraj omejujejo DNA-vrata, spodaj pa C-vrata. Na stiku med enotama dimera, ki je del DNA-vrat, se nahaja aktivno mesto s tirozinskim ostankom. Ta tvori kovalentno povezavo s fosfatom na 5'-koncu cepljene verige DNA. Del domene nad tem stikom predstavlja pozitivno nabito sedlo, ki olajša vezavo DNA (13). Strukturo DNA giraze podrobneje predstavlja slika 2.



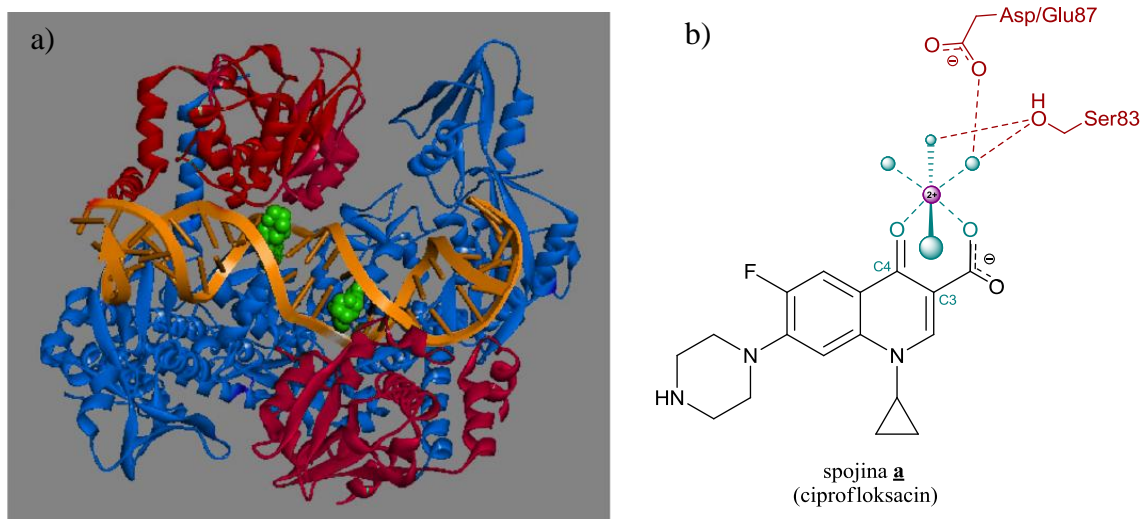
Slika 2: Struktura DNA giraze. a) Domene posameznih monomernih enot DNA giraze. b) Model aktivnega A_2B_2 heterotetramera z vezano DNA (130 bp), pridobljen s kombiniranjem kristalnih struktur posameznih podenot DNA giraze. Ena monomerna enota je obarvana sivo, druga pa ima obarvane posamezne domene v skladu z barvami na a). ATP-azna domena GyrB tvori N-vrata. DNA-vrata tvorijo domena GyrB TOPRIM, WHD in »stolp« domena GyrA. Majhen globularni del zvitja verig GyrA tvori C-vrata. c) N-vrata. Del GyrB, ki tvori N-vrata v kompleksu z ADPNP, katerega vezava povzroči zaprtje N-vrat. Prirejeno po (18).

1.4 Znani zaviralci podenote GyrA

Tako giraza kot tudi topoizomeraza IV z uvajanjem prekinitev v dsDNA izvršujeta esencialno fiziološko funkcijo za celično preživetje, vendar hkrati posedujeta tudi potencial za fragmentacijo genoma (19). Kinoloni, edini zaviralci DNA giraze in topoizomeraze IV v klinični uporabi (15), izkoriščajo ravno to potencialno smrtno lastnost in po primarnem mehanizmu povzročijo celično smrt s povečanjem koncentracije cepitvenega kompleksa med encimom in DNA. Dve molekuli kinolona se v aktivnem mestu interkalirata v obe cepljeni verigi DNA in istočasno nekovalentno interagirata z encimom. S tem se poveča koncentracija kompleksa, ki fizično preprečuje ponovno ligacijo. Ko podvojevalne vilice, transkripcijski kompleksi ali drugi sistemi trčijo ob stabiliziran kompleks med girazo ali topoizomerazo IV in DNA, jih spremenijo v trajne kromosomske prekinitve. To v nadaljevanju sproži popravljalne mehanizme, ki ob nakopičenju prekinitev niso več učinkoviti in vodijo v celično smrt. K toksičnosti prispeva tudi izguba katalitične aktivnosti

giraze in topoizomeraze IV (19), kar vodi npr. do poškodb DNA, sinteze nepopolnih proteinov, oksidativnih poškodb in sprožitve mehanizmov celične smrti (15).

Tako kot na večino drugih antibiotikov določeni sevi izkazujejo rezistenco na kinolone, ki je lahko povezana s kromosomskimi mutacijami, ki kodirajo za tarčno mesto na encimu, z mutacijami, ki povzročijo zmanjšano akumulacijo v celici z zmanjšanim privzemom ali povečanim efluksom, ali s prenosom plazmidov s kodirano kinolonsko rezistenco (20). Specifične mutacije v girazi ali topoizomerazi IV na omejeni regiji kinolonskih odpornostnih determinant (QRDR) povzročajo rezistenco, kar kaže na pomembnost interakcij med učinkovino in proteinom v stabilizacijskem kompleksu. Najpogostejši mutaciji na QRDR sta mutaciji na Ser83 (glede na oštevilčenje GyrA *E. coli*) in kislem aminokislinskem preostanku na mestu 87 (19). Mutacija na serinu DNA giraze *E. coli* povzroči 40-kratni porast vrednosti IC₅₀ za ciprofloksacin (spojina **a**, slika 3) (21). Omenjena aminokislinska preostanka posredno sodelujeta pri vezavi spojine preko nekatalitičnega Mg²⁺ iona, ki ga kelira C3/C4 ketokislina kinolona, na kar kažejo tudi kristalne strukture. Kovinski kation je dodatno koordiniran s štirimi molekulami vode, od katerih se dve nahajata dovolj blizu serinskega in kislega aminokislinskega preostanka, da lahko z njima tvorita vodikove vezi. Te najverjetneje preko kovinskega iona povezujejo molekulo učinkovine z encimom (19). Vezavo kinolonov na topoizomeraze tipa II prikazuje slika 3.

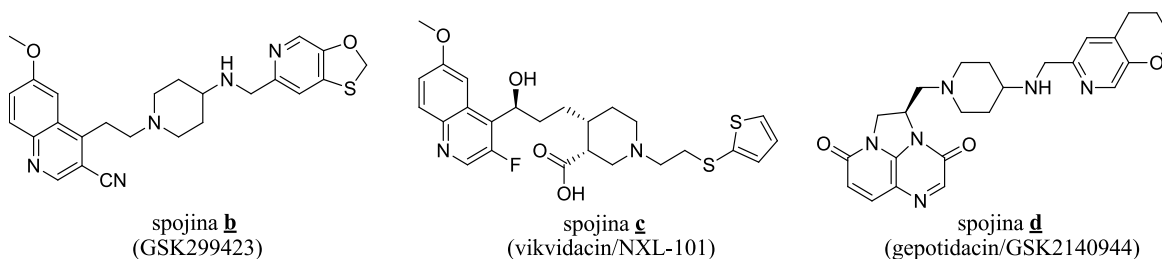


Slika 3: Vezava kinolonov. a) Kristalna struktura topoizomeraze IV *Acinetobacter baumannii* z vezanimi molekulama moksifloksacina. Podenoti topoizomeraze IV sta prikazani z modro in roza, DNA je oranžne barve, molekuli moksifloksacina pa sta obarvani zeleno. Pogled od »zgoraj,« skozi N-vrata. b) Poenostavljen prikaz H-vezi ciprofloksacina preko molekul vode in kovinskega iona. Prirejeno po (19).

1.5 Novi zaviralci podenote A bakterijske DNA giraze (NBTI)

Z namenom izognitve navzkrižni bakterijski rezistenci morajo novi zaviralci delovati na nove tarče ali se vezati na nova mesta na že znanih tarčah. Iskanje novih tarč ostaja prioriteta, vendar ne smemo zanemariti klinično validiranih tarč, kot sta DNA giraza in topoizomeraza IV (22).

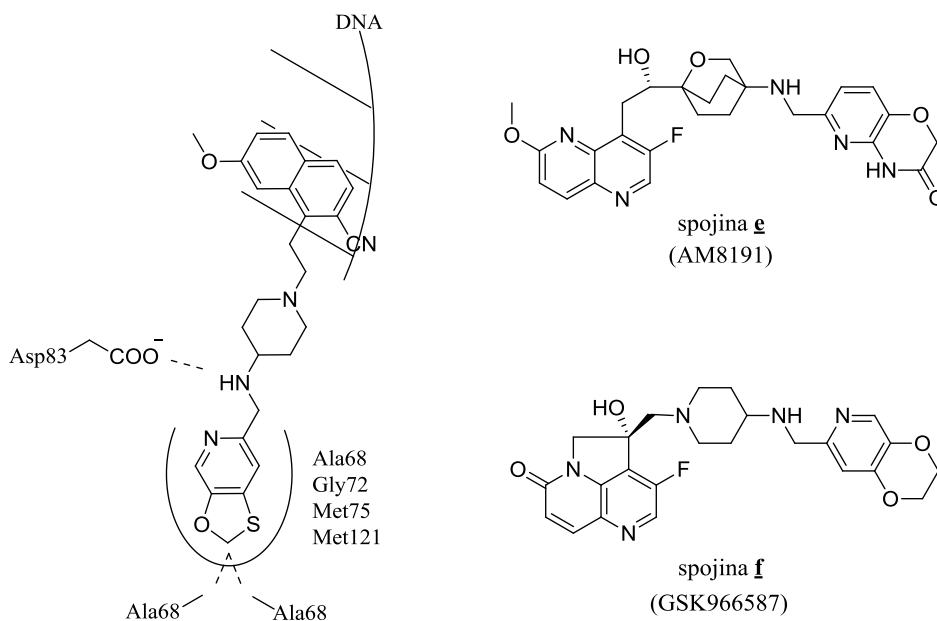
Pred leti so v podjetjih GSK in Novoxel odkrili molekuli GSK299423 in NXL-101 (spojini **b** in **c**, slika 4), ki imata odlične antibakterijske lastnosti, ne izkazujeta navzkrižne rezistence s fluorokinoloni in sta učinkovita zaviralca DNA giraze in/ali topoizomeraze IV (22). Vrednost IC_{50} za zaviranje DNA giraze iz *S. aureus* znaša za spojino **b** 14 ± 5 nM, kar je več kot 2000-krat manj, kot znaša ta vrednost za ciprofloksacin (IC_{50} , 31 ± 10 μ M). Za DNA girazo iz *E. coli* je vrednost IC_{50} 100 nM, mutacija Ser83 pa nanjo ni vplivala. Vikvidacin (spojina **c**), ki je približno 70-krat šibkejši zaviralec DNA giraze iz *S. aureus* kot spojina **b** (21), predstavlja prvo učinkovino iz razreda novih zaviralcev bakterijske topoizomeraze tipa II (NBTI), ki je vstopila v klinične raziskave. Raziskave so predčasno prekinili, ker spojina povzroča podaljšanje dobe QT (22). V letu 2017 so pri GSK uspešno zaključili drugo fazo kliničnih raziskav z učinkovino gepotidacin (spojina **d**, slika 4), ki bi jo lahko uporabljali za zdravljenje kožnih infekcij z rezistentimi sevi *S. aureus* (23).



Slika 4: Strukture spojin nekaterih predstavnikov NBTI. Prirejeno po (21, 22).

Leta 2010 so s kristalografijo nedvoumno določili vezavno mesto spojine **b** na stiku DNA in DNA giraze iz *S. aureus*, za katerega se je izkazalo, da ni enako kot pri fluorokinolonih (21, 22). Veže se med obe aktivni mesti, s kinolinskim delom med baznima paroma verige DNA, s piridinskim delom pa zasede nekatalitični žep, ki nastane med obema podenotama GyrA (21, 24). Stik proteina, ki tvori vezavni žep NBTI, je sestavljen iz dveh nasprotno si ležečih WHD (25). Struktura nakazuje, da spojina ne zavira reakcije cepitve in ponovne ligacije neposredno, ker se ne veže v aktivno mesto, temveč stabilizira kompleks med dsDNA in encimom pred samo cepitvijo in zaustavi razdružitev verig DNA. Hidrofobni

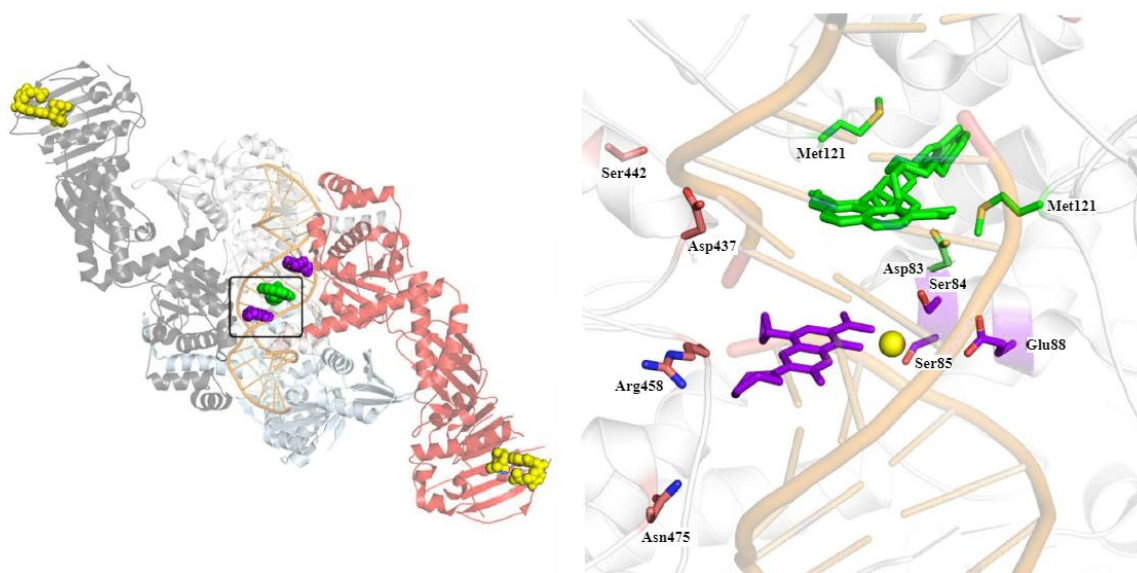
žep, ki nastane med podenotama GyrA in ga zaseda oksatiolnopiridinska skupina, predstavljajo aminokislinski preostanki Ala68, Gly72, Met75 in Met121, ki preko van der Waalsovih interakcij interagirajo s spojino. Metilenska skupina med kisikovim in žvepovim atomom deluje kot netipični donor vodikove vezi s karbonilnim kisikom Ala68, na kar nakazuje tudi dejstvo, da so spojine z elektron privlačnimi skupinami ob metilenski skupini močnejši zaviralci. Pri vstopu v proteinski žep bazični dušik interagira z Asp83. Sekvenčne analize kažejo, da je hidrofobni žep dobro ohranjen v GyrA in ParC topoizomeraze IV med Gram negativnimi in Gram pozitivnimi bakterijami, ne pa tudi v evkariontih. To je ključno za doseganje širokega spektra delovanja, delovanja na dve tarči in zmanjšanje toksičnosti (21, 24). Praktično identično vezavo opisujejo tudi Singh in sodelavci za spojino AM8191 (spojina **e**, slika 5) (26) ter Miles in sodelavci za spojino GSK966587 (spojina **f**, slika 5) (27). Pri vezavi spojine **f** so opazili dodatno vodikovo vez med OH skupino in amino skupino adenozina DNA (27). Shematska predstavitev vezave NBTI prikazuje slika 5.



Slika 5: Vezava NBTI in strukture nekaterih predstavnikov. a) Shematska predstavitev vezave NBTI. b) Strukturni spojini predstavnikov NBTI. Prirejeno po (21, 26, 27).

Mutaciji aminokislinskih preostankov *S. aureus* Asp83 in Met121 povzročata rezistenco na NBTI in sta postali markerja rezistence za spojine iz tega strukturnega razreda zaviralcev. Pogosti mutaciji *S. aureus*, ki vodita v kinolonsko rezistenco (Ser84Leu in Glu88Lys) na regiji QRDR, sta locirani na istem heliksu WHD, ki vsebuje tudi aminokislinske preostanke, pomembne za vezavo NBTI. Asp83 se v primarnem aminokislinskem

zaporedju nahaja poleg Ser84, vendar sta preostanka orientirana v dva različna proteinska žepa. Ta se nahajata na nasprotujočih si straneh heliksa – fluorokinolinski preostanek je orientiran proti cepitvenemu mestu DNA, NBTI preostanek pa proti stiku dimera, kar vodi v odsotnost navzkrižne rezistence med obema vrstama zaviralcev (25). Primerjavo vezave NBTI in fluorokinolonov ter orientacijo ključnih aminokislinskih preostankov za pojav rezistence prikazuje slika 6.



Slika 6: Vezava različnih zaviralcev DNA giraze in pomembni aminokislinski preostanki za razvoj rezistence. a) Položaj različnih zaviralcev DNA giraze/topoizomeraze IV. Rumeno sta obarvani molekuli novobiocina, aminokumarinskega antibiotika z delovanjem na GyrB, molekuli ciprofloksacina sta vijoličaste barve, molekula predstavnika NBTI pa zelene barve. Oranžno je obarvana molekula DNA, rdeče GyrB in svetlo modro GyrA enega monomera. b) Orientacija aminokislinskih preostankov, katerih mutacije so ključne pri pojavu rezistence na fluorokinolone in NBTI. Oštevilčenje glede na DNA girazo *S. aureus*. Prirejeno po (28).

Strukturo NBTI lahko razdelimo na tri dele: aromatski biciklični »levi« del (LHS), šest do osem atomov velik ciklični oz. biciklični distančnik in aromatski heterociklični »desni« del (RHS) (29). Raziskave modifikacij posameznih delov, ki jih opisuje znanstvena literatura, so usmerjene v povečanje jakosti in razširitev spektra delovanja NBTI ter zmanjšanje toksičnosti zaradi delovanja na hERG kanale, kar je posledica bazične strukture in relativno visoke lipofilnosti (30).

Del LHS se zaradi planarne aromatske narave vrine med bazna para cepljene verige DNA in kompleks stabilizira preko interakcij π - π (29). Singh in sodelavci (31) so proučevali vpliv substitucije 1,5-naftiridina kot dela LHS na biološko aktivnost, kjer se je izkazalo, da je za protibakterijsko jakost in spekter delovanja najugodnejša substitucija s halogenom, ciano ali hidroksilno skupino na mestu 2, medtem ko imajo ostale polarne skupine na tem

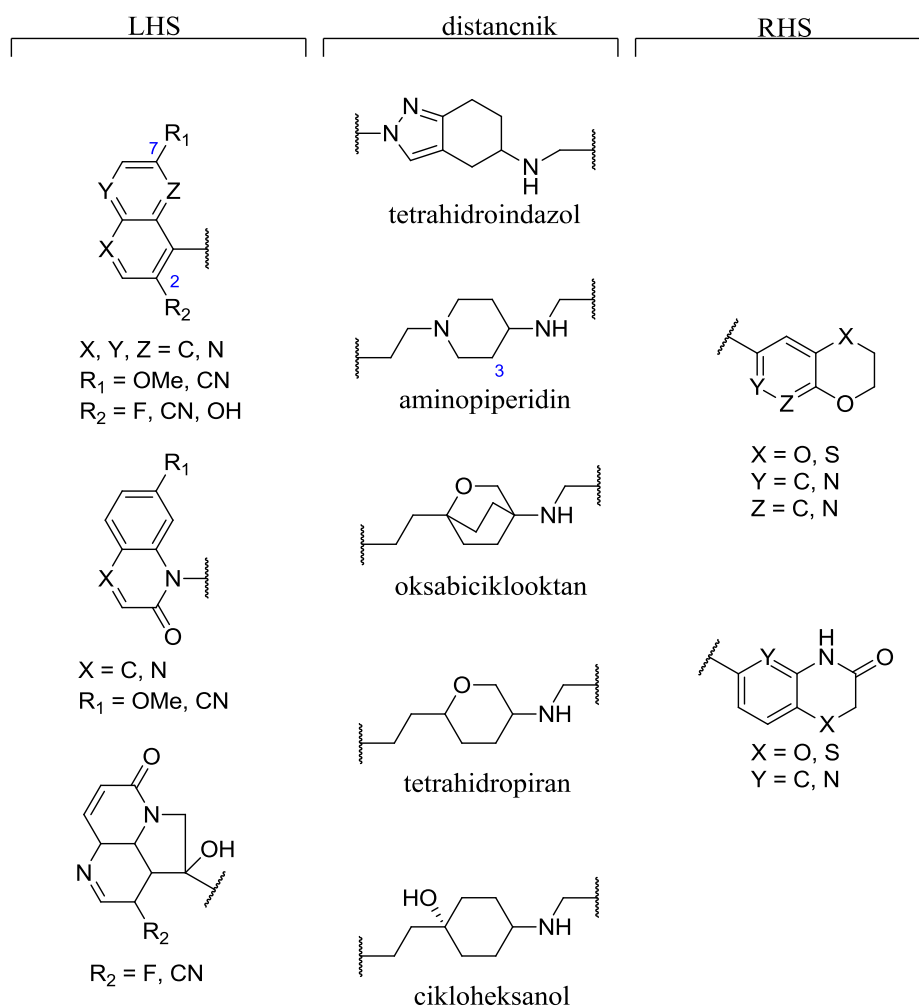
mestu negativen vpliv na aktivnost. Zamenjave metilnega etra na mestu 7 so se večinoma izkazale za neugodne, z izjemo ciano analoga z minimalno zmanjšano aktivnostjo. Substitucija aromata na drugih mestih povzroči izgubo ali značilen upad protibakterijske aktivnosti (31).

Del RHS se mora orientirati pravokotno glede na del LHS, da zasede hidrofobni žep, saj je vezava dela RHS na izbrane aminokislinske preostanke GyrA ključna za biološko aktivnost NBTI (29). Modifikacije dela RHS so omejene z velikostjo žepa in večino znanih fragmentov predstavljajo biciklični aromatski sistemi (24). Pri sistematičnem vrednotenju povezave med strukturo in delovanjem dveh najpogostejših zvrsti delov RHS, piridodioksanskih in piridooksazinonskih fragmentov, so ugotovili, da substitucija obroča večinoma negativno vpliva na aktivnost z izjemo zamenjave kisika z žveplovim atomom. Piridodioksanskim fragmentom so sicer uspeli zmanjšati aktivnost hERG, vendar se je z modifikacijami zmanjšala tudi jakost in zožal spekter delovanja, so pa bili bolj učinkoviti kot piridooksazinonski fragmenti (32). Večje fragmente bi lahko uporabili z namenom povečanja jakosti zaviralcev Gram negativnih bakterij, saj je pri večini teh bakterij hidrofobni žep zaradi zamenjave Met121 z izolevcinom ali levcinom nekoliko večji kot pri *S. aureus* (24). Glede na rentgenski posnetek kristalne strukture spojin **b** in **e** je distančnik v večji meri izpostavljen toplilu in ne kaže interakcij z encimom, kar pomeni, da k vezavni energiji večinoma prispevajo van der Waalsove interakcije delov LHS in RHS (32). Ni torej presenetljivo, da so do leta 2010 v literaturi predstavili preko 100 primerov delov LHS in distančnikov ter preko 550 delov RHS (24).

Distančnik ima pomembno vlogo pri ustrezni prostorski orientiranosti delov LHS in RHS in posredno vpliva na vezavo in aktivnost NBTI. Bazičen dušik distančnika pripomore k povečani afiniteti preko interakcije z Asp83 (29). Z izbiro in spremembami distančnika lahko poleg ustrezne geometrije vplivamo tudi na zmanjšanje toksičnosti hERG in izboljšanje farmakokinetičnih lastnosti spojine. Hidroksilacija distančnika je pri spojini **e** zmanjšala toksičnost hERG za 30-krat in povečala topnost za stokrat z minimalno izgubo protibakterijske učinkovitosti v primerjavi z nehidroksilirano spojino, vendar hidroksilna skupina ni bila neposredno udeležena pri vezavi spojine (26). Reck in sodelavci (33) so z vezavo elektron privlačne skupine na mesto 3 piperidina aminopiperidinskega distančnika dosegli zmanjšanje zaviranja hERG. Ta je najverjetneje posledica zmanjšanja vrednosti pKa in s tem znižanja afinitete vezave, vendar pa je ob zmanjševanju pKa potrebno

upoštevati tudi sočasno povečanje vrednosti logD, ki povečuje zaviranje hERG. Z modifikacijami distančnika spreminjamo tudi položaj delov LHS in RHS ter pozicijo bazičnega dušika, kar lahko vpliva na vezavo (33). Med najpogostejšimi različicami distančnikov, opisanih v literaturi, so v zadnjem času aminopiperidin, tetrahydroindazol, oksabiciklooktan in tetrahidropiran (29).

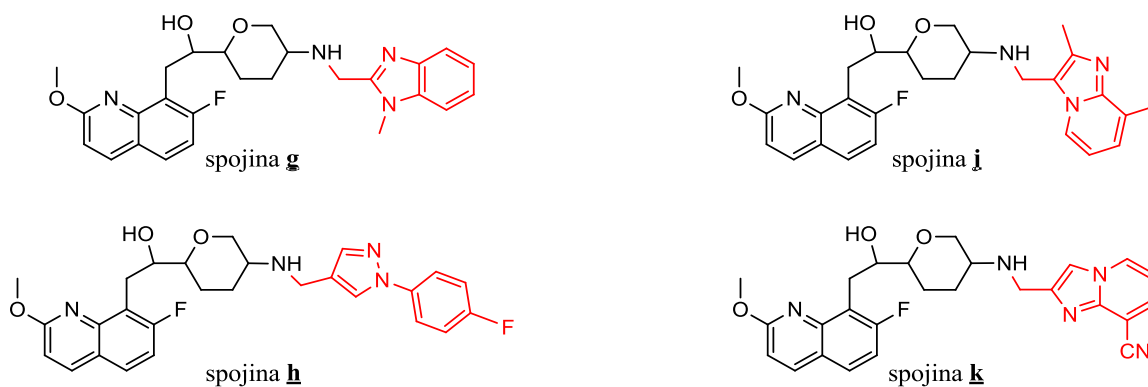
Na sliki 7 predstavljamo najpogosteje zastopane fragmente posameznih delov NBTI, ki se pojavljajo v literaturi in izkazujejo dobro aktivnost proti GyrA.



Slika 7: Najpogosteje zastopani fragmenti posameznih delov NBTI v literaturi. Prirejeno po (22, 26, 29, 31, 32, 33, 37, 50).

2 Namen dela

V okviru magistrske naloge bomo poskušali pripraviti nove potencialne zaviralce bakterijske GyrA. Kot osnovo za načrtovanje spojin bomo uporabili strukture spojin, ki so jih predhodno ustvarili na Kemijskem inštitutu z virtualno kombinatorično sintezo pri *in silico* načrtovanju na podlagi strukture in so se izkazale za potencialne nove zaviralce iz razreda NBTI proti različnim mutiranim sevom *S. aureus*. Kolarič in Minovski sta pri *in silico* napovedovanju biološke aktivnosti kombinatoričnih analogov NBTI uporabila serijo spojin z nespremenjenim delom LHS in že znanimi strukturami distančnika (oksabiciklooktanski, tetrahidroindazolski in tetrahidropiranski distančniki) ter različnim RHS. Fragmente RHS je predstavljal nabor karbonilnih in karboksilnih spojin, ki so bile strukturno podobne v literaturi že opisanim RHS. Z upoštevanjem omejitev Lipinski/Weber za doseganje ustreznih fizikalnih in kemijskih lastnosti sta na podlagi postavljenega in validiranega modela QSAR identificirala 548 kombinatoričnih analogov NBTI. Ti so bili nadalje podvrženi molekularnemu sidranju v vezavni žep DNA giraze *S. aureus* divjega tipa encima in petih homolognih modelov, ki so upoštevali najpogostejše mutacije Asp83 in Met121 ter njune kombinacije, ki povzročajo rezistenco na NBTI. Pri tem sta identificirala šest spojin zadetkov, ki se ustrezno sidrajo v NBTI žep vseh preiskovanih modelov GyrA. Spojine zadetki imajo tetrahidropiranski distančnik, kar je v skladu z *in vitro* podatki o relativno visoki biološki aktivnosti NBTI iz te strukturne skupine, in nove strukturne fragmente RHS. Ti so večinoma petčlenski *N*-heteroaromatski sistemi, kot denimo pirazolni in imidazolni fragmenti, in omogočajo dobro umestitev in stabilizacijo v globok hidrofobni žep (29). Sliki 8 in 9 predstavljata spojine zadetke in nove fragmente RHS.



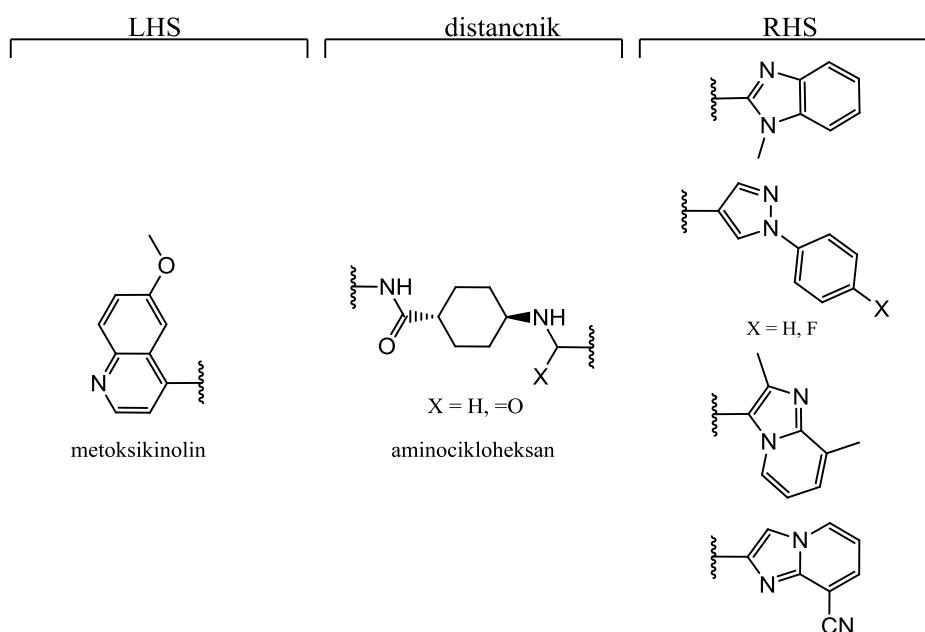
Slika 8: Spojine zadetki pri *in silico* načrtovanju na osnovi strukture (1. del). Strukture spojin, ki so bile identificirane kot najboljše sidrane v preiskovane mutirane modele DNA giraze *S. aureus*. Rdeče obarvani

fragmenti predstavljajo do sedaj še nepoznane fragmente RHS, ki smo jih uporabili za načrtovanje želenih končnih spojin. Prirejeno po 29.

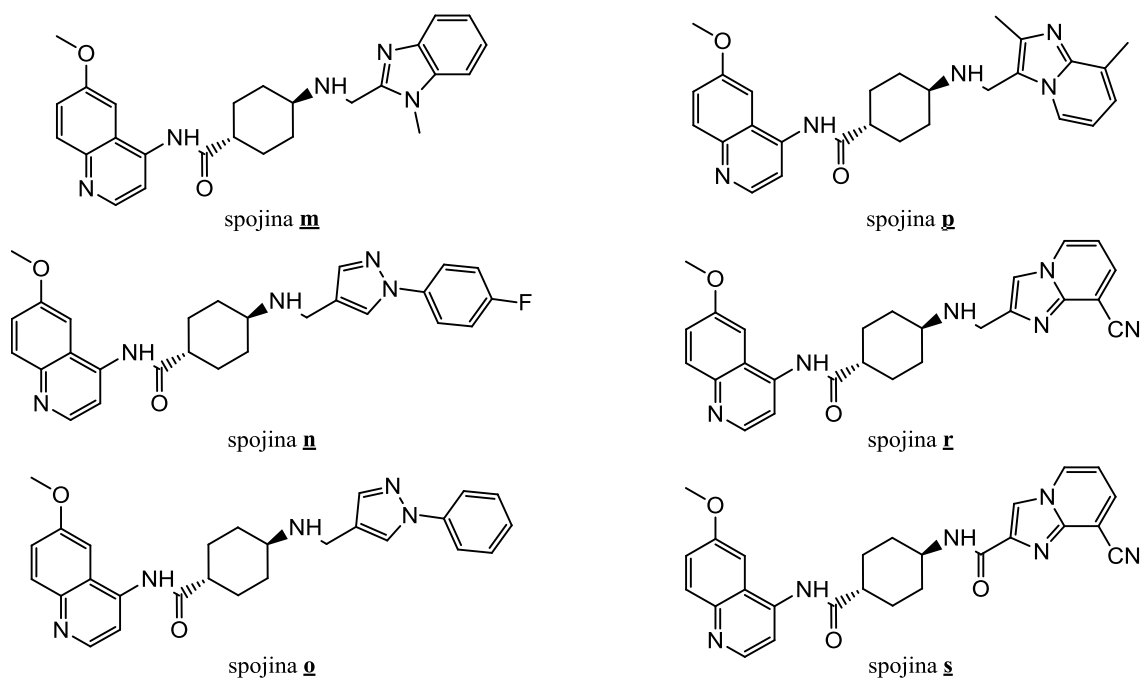


Slika 9: Spojine zadetki pri *in silico* načrtovanju na osnovi strukture (2. del). Strukture spojin, ki so bile identificirane kot najbolj sidrane v preiskovane mutirane modele DNA giraze *S. aureus*. Rdeče obarvani fragmenti predstavljajo do sedaj še nepoznane fragmente RHS, ki smo jih uporabili za načrtovanje želenih končnih spojin. Prirejeno po 29.

Del LHS sintetiziranih spojin bo enak pri vseh končnih spojinah in ga bo predstavljal metoksikinolinski fragment, katerega planarna aromatska struktura zagotavlja vezavo med bazna para verige DNA. Metoksi skupina na mestu 7 po znanih literarnih podatkih o povezavi med strukturo in delovanjem ugodno prispeva k protibakterijski jakosti in spektru delovanja, nesubstituiran analog na mestu 2 pa se glede na aktivnost značilno ne razlikuje od substituiranih analogov s halogenom ali ciano skupino na tem mestu (31). Preko amidne vezi bo del LHS vezan na aminocikloheksanski distančnik. Trans konfiguracija cikloheksana ustrezno orientira dela LHS in RHS za vezavo, bazični dušik pa izboljša vezavo spojine zaradi interakcije z Asp83. Dele RHS bodo predstavljali zgoraj omenjeni fragmenti, ki naj bi se preko hidrofobnih interakcij ustrezno vezali v nastali hidrofobni žep med obema enotama GyrA. Sliki 10 in 11 predstavljata zelene končne spojine.



Slika 10: Splošna shema načrtovanih končnih spojin. Del LHS predstavlja metoksikinolinski fragment, distančnik je aminocikloheksan, dele RHS pa smo izbrali glede na rezultate *in silico* načrtovanja.



Slika 11: Strukture zelenih končnih spojin.

Uporabili bomo fragmente RHS spojin **g–j** v obliki aldehida, fragment spojine **k** pa v obliki kisline. Strukturni fragment RHS spojine **l** v obliki aldehida ali karboksilne kisline ni komercialno dostopen, zato ga pri načrtovanju končnih spojin nismo upoštevali. Sintezo bomo začeli z *(1R, 4R)*-4-aminocikloheksankarboksilatom hidrokloridom, katerega amino skupino bomo najprej zaščitili. Sledila bo pretvorba karboksilata v amid in vezava na fragment LHS preko nukleofilne aromatske substitucije. Nato bomo odščitili amino skupino in tvorili sekundarni amin preko reakcije reduktivnega aminiranja do končnih spojin. Zadnja stopnja se bo razlikovala za spojino **s**, kjer bomo tvorili amidno vez s pomočjo sklopitvenega reagenta. Spojina **s** bo služila za ugotavljanje vpliva bazičnega dušika na vezavo spojine.

Cilj magistrske naloge je sinteza novih zaviralcev bakterijske DNA giraze razreda NBTI in optimizacija posameznih sinteznih stopenj. Produkte bomo očistili z uporabo ustreznih izolacijskih postopkov in jih identificirali s tankoplastno kromatografijo, spektroskopskimi analiznimi metodami, kot so npr. ^1H in ^{13}C jedrska magnetna resonanca (NMR), masna spektroskopija (MS) in infrardeča spektroskopija (IR) ter z določanjem temperature tališča.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

3.1.1 Reagenti in topila

Pri delu v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev (Acros Organics, Aldrich, Apollo Scientific, Carlo Erba, Enamine, Fluka, Merck, Panreac AppliChem in Sigma-Aldrich) brez predpriprave: n-heksan: 95 %, Panreac AppliChem, Nemčija; metanol ACS: $\geq 99,9$ %, Carlo Erba, Francija; etil acetat ACS: $\geq 99,9$ %, Carlo Erba, Francija; trietilamin: $\geq 99,0$ %, Merck, Nemčija; 1,4-dioksan: $\geq 99,5$ %, Merck, Nemčija; dietileter: $\geq 99,7$ %, Merck, Nemčija; brezvodni metanol: SeccoSolv[®], $\geq 99,9$ %, Merck, Nemčija; kloroform: Merck, Nemčija; diklorometan: $\geq 99,8$ %, Merck, Nemčija; brezvodni natrijev sulfat: Merck, Nemčija; natrijev karbonat: $\geq 99,9$ %, Merck, Nemčija; amonijev klorid: $\geq 99,5$ %, Sigma-Aldrich, ZDA; natrijev borhidrid: Merck, Nemčija; cezijev karbonat: ≥ 99 %, Aldrich, ZDA; natrijev cianoborhidrid: 95 %, Acros Organics; ZDA; aceton: $\geq 99,5$ %, Merck, Nemčija; bis(*t*-butil) dikarbonat: Apollo Scientific Limited, Velika Britanija; natrijev triacetoksiborhidrid: 97 %, Acros Organics, ZDA; natrijev vodikov karbonat: Merck, Nemčija; očetna kislina: 100 %, Merck, Nemčija; HCl v očetni kislini: 1 M, Acros Organics, ZDA; jod: $> 99,8$ %, Acros Organics, ZDA; ninhidrin: $\geq 99,0$ %, Fluka, Nemčija; 2,2'-bis(difenilfosfino)-1,1'-binaftil: Apollo Scientific Limited, Velika Britanija; tris(dibenzilidenaceton)dipaladij(0): Apollo Scientific Limited, Velika Britanija; (*1R, 4R*)-4-aminocikloheksankarboksilat hidroklorid: 95 %, Enamine, ZDA in Apollo Scientific Limited, Velika Britanija; 1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-karbaldehid: 95 %, Enamine, ZDA; 1-(4-fluorofenil)-1*H*-pirazol-4-karbaldehid: 95 %, Enamine, ZDA; 1-fenil-1*H*-pirazol-4-karbaldehid: Enamine, ZDA; *N,N,N',N'*-tetrametil-*O*-(1*H*-benzotriazol-1-il)uronijev tetrafluoroborat tetrafluoroborat: ≥ 97 %, Fluka, Nemčija. 4-bromo-6-metoksikinolin, 8-cianoimidazo[1,2-*a*]piridin-2-karboksilna kislina in 2,8-dimetilimidazo[1,2-*a*]piridin-3-karbaldehid so bili predhodno sintetizirani na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani. Brezvodni THF smo pripravili po standardnem postopku destilacije tik pred uporabo.

3.1.2 Aparature

Pri laboratorijskem delu smo uporabljali standardno laboratorijsko opremo: laboratorijsko analitsko tehtnico Mettler Toledo[®] PB403-S; rotavapor Büchi[®] Rotavapor R-200 z grelno kadičko Büchi[®] Heating Bath B-490, vakuumsko črpalko Büchi[®] Vac V-500 in

upravljalnikom Büchi[®] Vacuum Controller V-850; električne grelnike z magnetnimi mešali IKA[®] Werke RCT basic in IKA[®] RH basic; membransko črpalko Charles Austen Pumps[®]; UV-svetilko Camag[®] in grelno pištolo Einhell[®].

3.2 Metode

3.2.1 Tankoplastna kromatografija (TLC)

Potek posamezne reakcije in izolacijo do ustreznega produkta smo spremljali s TLC, ki nam je služila tudi za izbiro mobilne faze za kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel plošče TLC Silica gel 60 F₂₅₄, Merck, Nemčija, ki imajo silikagel nanešen na aluminijastem nosilcu. Mobilno fazo so predstavljale kombinacije različnih topil v različnih razmerjih, ki smo jim po potrebi dodali še 1 % AcOH ali Et₃N, in so navedene pri vsaki vrednosti R_f spojin v poglavju Eksperimentalni del. Lise spojin na kromatografski plošči smo detektirali pod UV svetlobo valovnih dolžin $\lambda = 254 \text{ nm}$ in $\lambda = 366 \text{ nm}$ ter z uporabo ninhidrina kot orositvenega reagenta za amine.

3.2.2 Kolonska kromatografija

Kolonsko kromatografijo smo uporabljali za izolacijo spojin iz zmesi in čiščenje surovih produktov. Mobilno fazo smo predhodno izbrali s pomočjo TLC in so jo predstavljale kombinacije različnih topil v različnih razmerjih, po potrebi z dodatkom AcOH ali Et₃N. Za stacionarno fazo smo uporabili silikagel 60, ki ga proizvaja Merck, Nemčija, z velikostjo delcev 0,040–0,063 mm. Količino stacionarne faze smo prilagodili glede na količino čiščene zmesi in zahtevnost kromatografske ločbe ter nato izbrali kolono z ustreznim premerom in velikostjo. Pretok mobilne faze smo pospešili z zračnim nadtlakom.

3.2.3 ¹H in ¹³C jedrska magnetna resonanca (NMR)

¹H in ¹³C NMR spektre so posneli na Fakulteti za farmacijo na spektrometru Bruker Avance III 400 pri 400 MHz in 100 MHz v devteriranih topilih CDCl₃ in DMSO-d₆. Kot interni standard so uporabili tetrametilsilan (TMS). Posnete spektre smo obdelali s programoma MestReC ali MestReNova proizvajalca Mestrelab Research, Španija.

3.2.4 Masna spektroskopija (MS)

Masne spektre so posneli na Fakulteti za farmacijo, Univerza v Ljubljani. Masne spektre visoke ločljivosti (HRMS) so posneli na Inštitutu Jožef Stefan v Centru za masno spektrometrijo na spektrometru VG-Analytical Autospec Q ali Q-TOF Premier proizvajalca Micromass, ZDA, s tehniko ESI.

3.2.5 Infrardeča spektroskopija (IR)

Infrardečo spektroskopijo končnih spojin smo izvajali na Fakulteti za farmacijo na spektrofotometru Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR. Posnete IR spektre smo obdelali s programom Omnic E.S.P. 5.3 proizvajalca Thermo Fischer Scientific, ZDA.

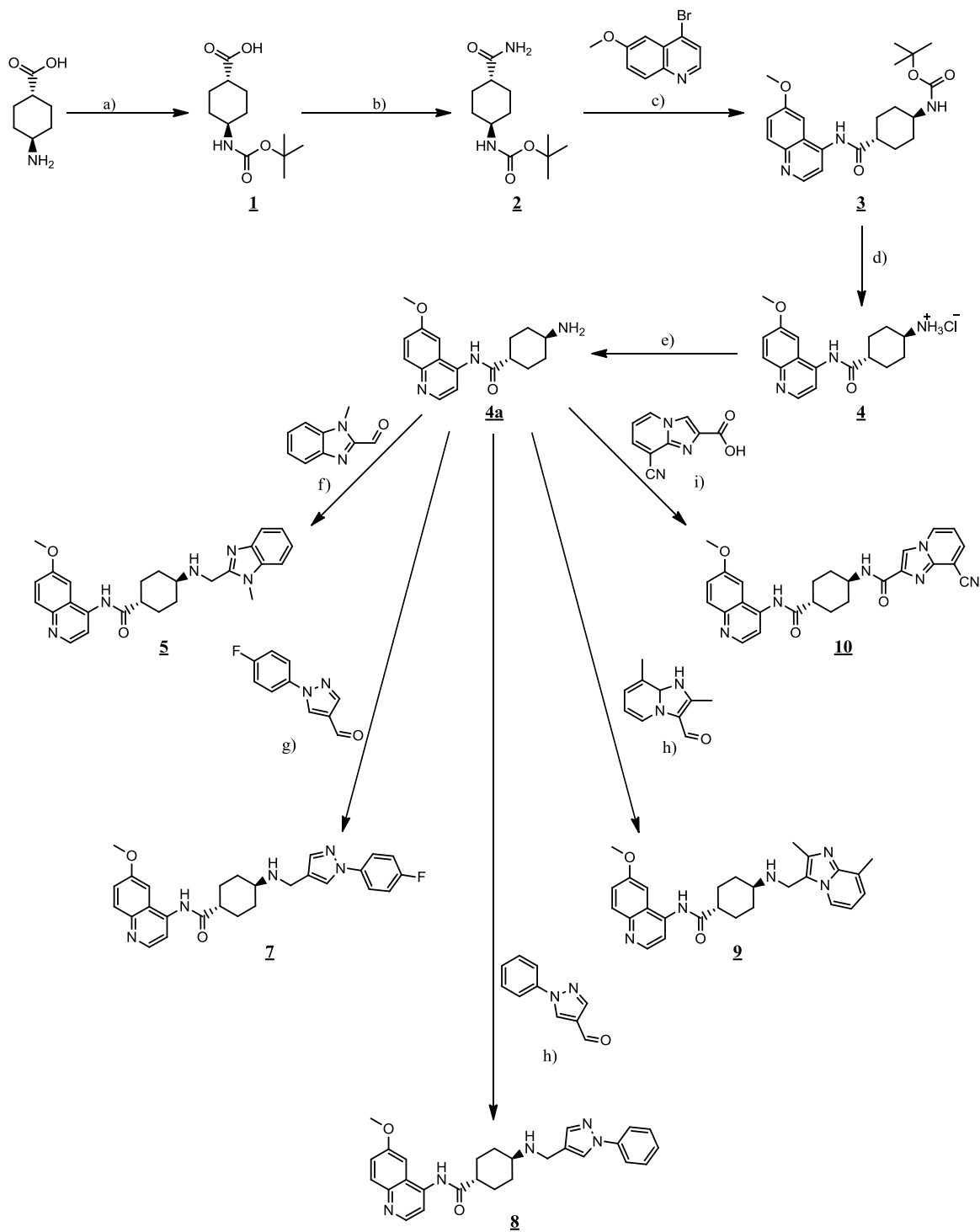
3.2.6 Določanje temperature tališča

Temperaturo tališča smo določili na talilnem mikroskopu z ogrevalno mizico Cambridge Instruments, Velika Britanija, in niso korigirana.

4 Eksperimentalni del

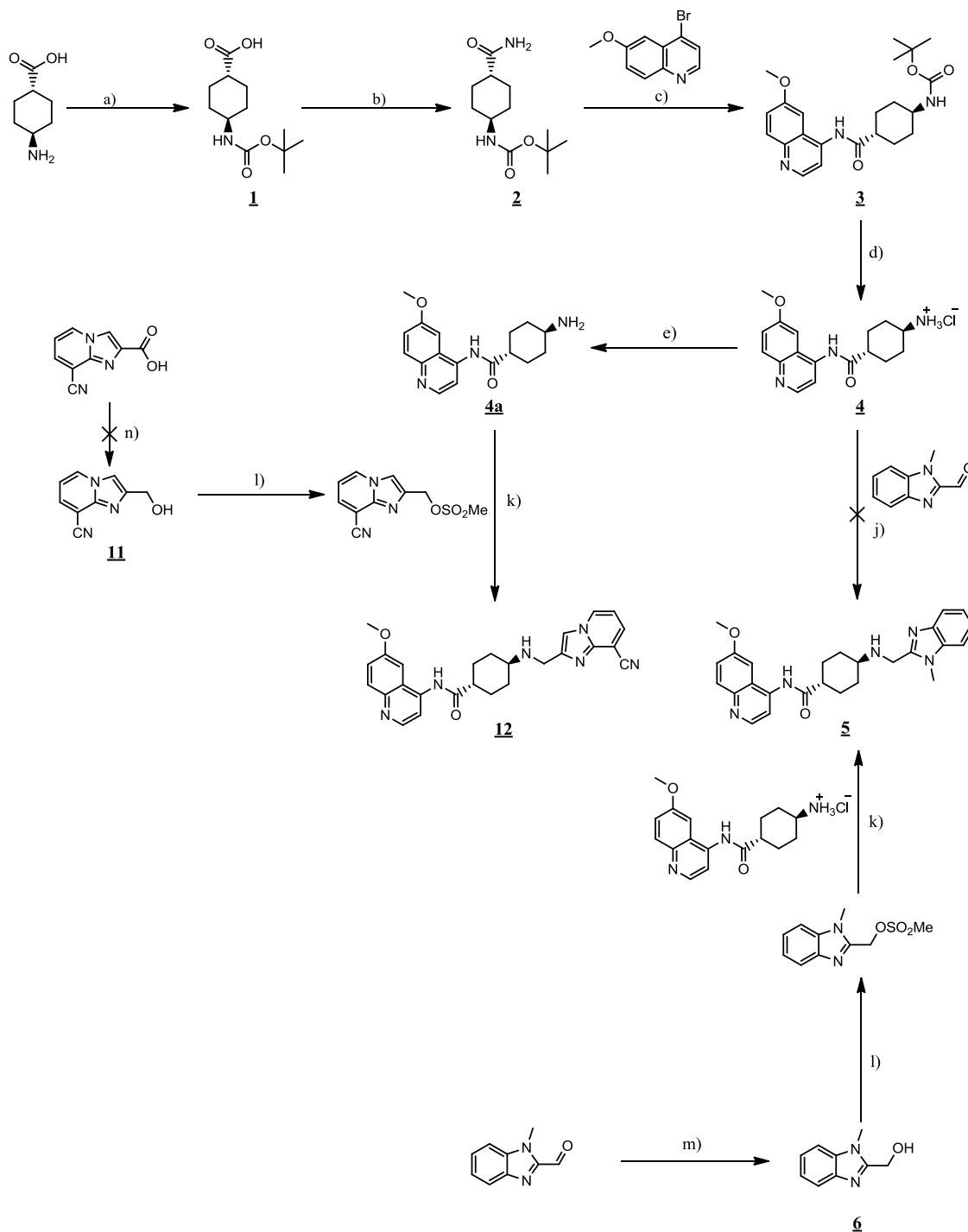
4.1 Reakcijske sheme

Sliki 12 in 13 prikazujeta reakcijske sheme sinteze končnih spojin.



Slika 12: Sintezna shema 1. Sintezna shema prikazuje sintezo nekaterih končnih spojin (spojine 5, 7, 8, 9), kjer smo v zadnji stopnji uporabili reakcijo reduktivnega aminiranja ali smo tvorili amidno vez z uporabo sklopitvenega reagenta (spojina 10). Razmere: a) Boc_2O , NaOH, 1,4-dioksan/voda; b) NH_4Cl , Et_3N , TBTU,

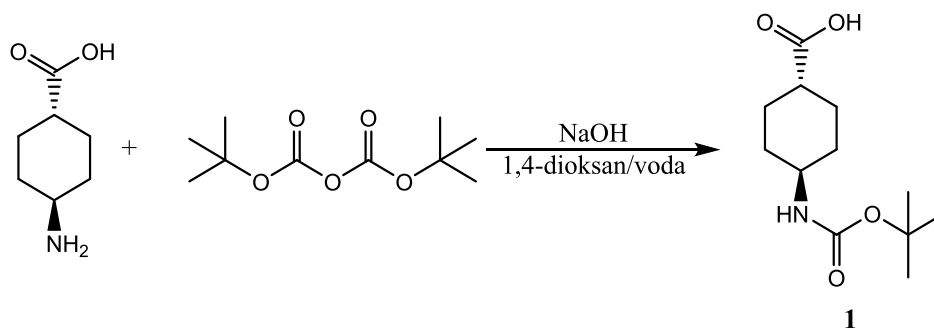
ACN; c) Pd₂(dba)₃, BINAP, CsCO₃, 1,4-dioksan, 85 °C; d) HCl/AcOH; e) Na₂CO₃; f) NaBH(OAc)₃, Et₃N, MeOH ali AcOH, MeOH, 50 °C, nato NaBH₄, MeOH, 0 °C; g) AcOH, MeOH, 50 °C, nato NaBH₄, MeOH, 0 °C; h) AcOH, MeOH, 50 °C, nato NaCNBH₃, MeOH, 0°C; i) TBTU, Et₃N, ACN.



Slika 13: Sintezna shema 2. Sintezna shema prikazuje sintezo končne spojine 5 preko tvorbe metansulfona. Enako sintezno strategijo smo poskusili uporabiti tudi za sintezo končne spojine 12, vendar nismo uspeli izvesti reakcije redukcije kisline do ustreznega alkohola. Razmere: a) Boc₂O, NaOH, 1,4-dioksan/voda; b) NH₄Cl, Et₃N, TBTU, ACN; c) Pd₂(dba)₃, BINAP, CsCO₃, 1,4-dioksan, 85 °C; d) HCl/AcOH; e) Na₂CO₃; j) NaCNBH₃, AcOH, MeOH; k) Et₃N, DKM; l) MeSO₂Cl, Et₃N, DKM, 0 °C; m) NaCNBH₃, AcOH, MeOH; n) NaBH₄, I₂, THF.

4.2 Sintezni postopki in analizni rezultati

4.2.1 Sinteza (1*R*,4*R*)-4-((*t*-butoksikarbonil)amino)cikloheksankarboksilne kisline (34)



Postopek

V 25-mililitrsko bučko smo zatehtali (1*R*,4*R*)-4-aminocikloheksankarboksilno kislino (0,5 g, 3,5 mmol, 1 ekv) in jo raztopili v 8 ml mešanice dioksana in demineralizirane vode v razmerju 1 : 1. Dodali smo 1 M NaOH (4,2 ml, 4,2 mmol, 1,2 ekv), prepihali z argonom in pustili mešati 5 minut na ledeni kopeli. Di-*tert*-butil dikarbonat (Boc₂O) (0,762 g, 3,5 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 4 ml dioksana in raztopino po kapljicah počasi dodajali v ohlajeno raztopino (1*R*, 4*R*)-4-aminocikloheksankarboksilne kisline in NaOH. Pustili smo mešati 10 minut in preverili pH vrednost raztopine ter jo po potrebi uravnali na 9 z 1 M NaOH. Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pod argonovo atmosfero. Potek reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo. Reakcija po 18 urah še ni popolnoma potekla, zato smo dodali še 0,2 ekvivalenta Boc₂O (0,152 g, 0,7 mmol, 0,2 ekv) in pustili mešati 1 uro. Ponovno smo razvili TLC. Reakcija je potekla, zato smo nadaljevali z izolacijo. Reakcijsko zmes smo kvantitativno prenesli v 25-mililitrsko bučko in na rotavaporju odstranili dioksan iz mešanice dioksana in vode (uparevali smo do spremembe površinske napetosti). Preostanek smo kvantitativno prenesli v lij ločnik in po potrebi dodali manjšo količino demineralizirane vode, da smo dobili približno 10 ml vodne faze. Dodali smo 10 ml DKM. Med mešanjem smo vodno fazo počasi nakisali z 1 M HCl do pojava oborine (pH približno 6) in ekstrahirali še dvakrat z 10 ml DKM. Vodno fazo smo zavrgli, organske faze smo združili, sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo na rotavaporju, da smo dobili spojino **1**. Glede na spekter NMR je bilo v produktu prisotnih še nekaj nečistot, vendar smo nadaljevali z naslednjo sintezno stopnjo.

Pri ponovni sintezi spojine **1** smo uporabili enak sintezni postopek in ekvivalente reagentov. Pri prvi ponovitvi smo uporabili 1,000 g in pri drugi 2,500 g (*1R,4R*)-4-aminocikloheksankarboksilne kisline ter ustrezne količine ostalih reagentov.

Rezultati

Videz: amorf bele barve

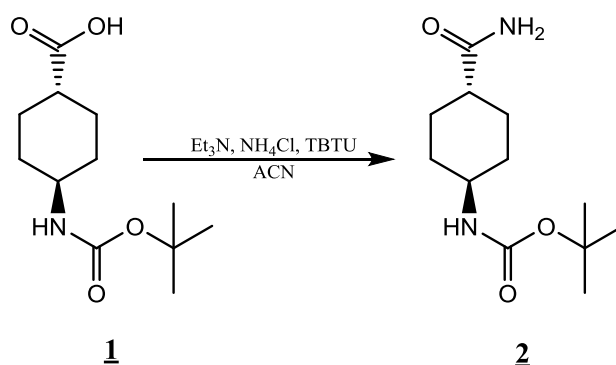
Mr: 243,15

Izkoristek: $\eta_1 = 96,6 \%$ (0,821 g), $\eta_2 = 62,7 \%$ (1,065 g), $\eta_3 = 90,2 \%$ (3,055 g)

Rf: 0,78 (MF: DKM/MeOH=4/1 + 1 % AcOH)

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 1,086\text{--}1,188$ (m, 2H, CH₂); 1,261–1,332 (m, 2H, CH₂); 1,377 (s, 9H, 3×CH₃); 1,475 (s, 2H, CH₂); 1,776–1,896 (m, 4H, 2×CH₂); 2,070 (dt, $J_1 = 12$ Hz, $J_2 = 3,6$ Hz, 1H, CH); 3,108–3,193 (m, 1H, CH); 6,745 (d, $J = 8$ Hz, 1H, CO-NH); 12,060 (s, 1H, COOH) ppm

4.2.2 Sinteza *t*-butil ((*1R,4R*)-4-karbamoilcikloheksil)karbamata (**35**)



Postopek

V 10-mililitrsko bučko smo natehtali spojino **1** (0,100 g, 0,4 mmol, 1 ekv), TBTU (0,132 g, 0,4 mmol, 1 ekv) in NH₄Cl (0,033 g, 0,6 mmol, 1,5 ekv) in jo raztopili v 2 ml ACN. Med mešanjem smo po kapljicah počasi dodajali Et₃N (0,171 ml, 1,2 mmol, 3 ekv). Reakcijsko zmes smo pustili mešati približno 1,5 ure pri sobni temperaturi. Med mešanjem smo lahko opazovali nastanek bele oborine. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Ko v reakcijski zmesi ni bilo več prisotne izhodne spojine **1**, smo nadaljevali z izolacijo. Nastalo oborino

smo odfiltrirali z odsesavanjem preko keramičnega filtra in jo spirali z ohlajenim ACN. Izolirali smo spojino **2**.

Pri ponovni sintezi spojine **2** smo uporabili enak sintezni postopek in ekvivalente reagentov. Pri prvi ponovitvi smo uporabili 0,300 g, pri drugi 1,065 g in pri tretji 3,055 g spojine **1** ter ustrezne količine ostalih reagentov. Pri tretji ponovitvi produkt zaradi velike količine najverjetneje ni bil zadostno posušen, zato smo dobili izkoristek, večji od 100 %.

Rezultati

Videz: beli drobni kristali

T_{tališče}: 153–156 °C

Mr: 242,16

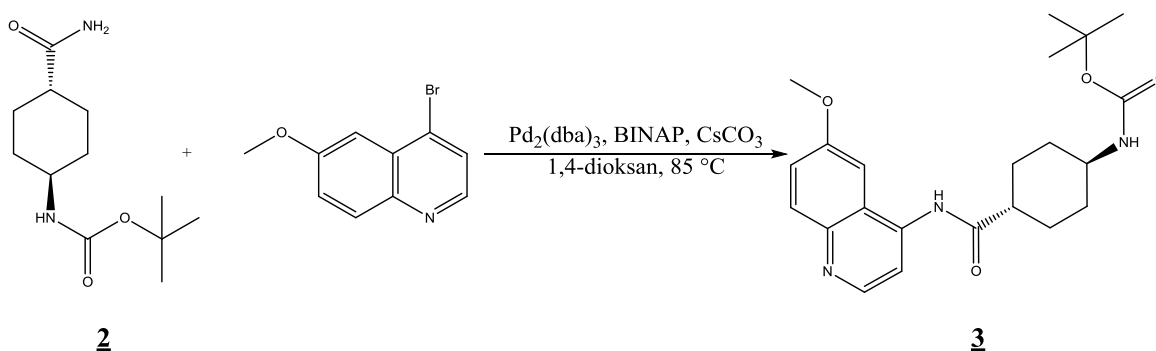
Izkoristek: $\eta_1 = 56,2 \%$ (0,056 g), $\eta_2 = 89,7 \%$ (0,268 g), $\eta_3 = 75,1 \%$ (0,796 g),
 $\eta_4 = 116,4 \%$ (3,543)

Rf: 0,38 (MF: DKM/MeOH = 9/1 + 1 % AcOH)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 1,069\text{--}1,165$ (m, 2H, CH₂); 1276–1,352 (m, 2H, CH₂); 1,377 (s, 9H, 3×CH₃); 1,709–1,798 (m, 4H, 2×CH₂); 1,925–2,000 (m, 1H, CH); 3,108–3,172 (m, 1H, CH); 6,683–6,729 (m, 2H, CO-NH₂); 7,073–7,185 (m, 1H, CO-NH) ppm

MS (m/z): 265,14 (M + Na)⁺

4.2.3 Sinteza *t*-butil ((1*R*,4*R*)-4-((6-meoksikinolin-4-il)karbamoil)cikloheksil)karbamata



Postopek

V 25-mililitrsko bučko smo natehtali spojino **2** (0,100 g, 0,4 mmol, 1,05 ekv), Pd₂(dba)₃ (10,8 mg, 0,01 mmol, 0,03 ekv), BINAP (14,7 mg, 0,02 mmol, 0,06 ekv) in CsCO₃ (0,337 g, 1,033 mmol, 2,5 ekv). Natehtane substance smo raztopili v 8,5 ml 1,4-dioksana, prepihali z argonom in nastalo suspenzijo sonicirali 10 minut v ultrazvočni kadički. Dodali smo 4-bromo-6-metoksikinolin. Na bučko z reakcijsko zmesjo smo namestili vodni hladilnik in z membransko črpalko odsesavali zrak nad reakcijsko zmesjo približno 2 minuti. Nato smo zaprli ventil in z iglo preko septuma uvedli argon. Reakcijsko zmes smo mešali na oljni kopeli pri 85 °C čez noč. Pri tem se je barva reakcijske zmesi spremenila iz temnovijoličaste v rumenooranžno. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Ko na TLC reakcijske zmesi ni bilo več opazne lise izhodne spojine **2**, smo nadaljevali z izolacijo. Reakcijsko zmes smo odstavili z oljne kopeli in jo ohladili na sobno temperaturo. Oborino smo odfiltrirali preko keramičnega filtra in jo zavrgli, filtratu pa smo uparili topilo na rotavaporju. Dobili smo 0,214 g surovega produkta, ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo. Za mobilno fazo smo izbrali MF: EtOAc/Hex=4/1. Izbrane frakcije, ki so vsebovale spojino z R_f = 0,20, smo združili in jim uparili topilo na rotavaporju. Izolirali smo spojino **3**.

Pri ponovni sintezi spojine **3** smo uporabili enake ekvivalente reagentov. Pri prvi in drugi ponovitvi smo uporabili enak sintezni postopek ter pri prvi 0,160 g in pri drugi 0,850 g spojine **2** ter ustrezne količine ostalih reagentov. Pri tretji ponovitvi reakcija pri 85 °C ni potekla do konca, zato smo temperaturo povišali na 95 °C in reakcijsko zmes segrevali še eno noč. Ostalih modifikacij postopka nismo izvedli. Uporabili smo 3,543 g spojine **2** ter ustrezne količine ostalih reagentov.

Rezultati

Videz: amorf svetlo rumene barve

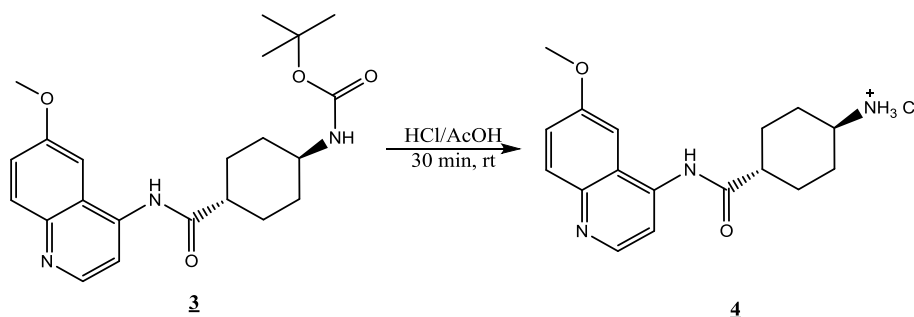
Mr: 399,49

Izkoristek: $\eta_1 = 47,8 \%$ (0,075 g), $\eta_2 = 75,6 \%$ (0,190 g), $\eta_3 = 59,6 \%$ (0,835 g),
 $\eta_4 = 38,5 \%$ (2,142 g)

Rf: 0,44 (MF: DKM/MeOH = 9/1); 0,20 (MF: EtOAc/Hex = 4/1)

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): $\delta = 1,208\text{--}1,265$ (m, 2H, CH_2); 1,483 (s, 9H, $3 \times \text{CH}_3$); 1,737–1,836 (m, 2H, CH_2); 2,148–2,234 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$); 2,375–2,437 (m, 1H, CH); 3,519– 3,544 (m, 1H, CH); 3,995 (s, 3H, O- CH_3); 4,457–4,480 (m, 1H, $\text{CH}_{\text{alifat}}\text{-NH-CO}$); 6,998 (d, $J = 2$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,430 (dd; $J_1 = 9,2$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,701 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{ar}}\text{-NH-CO}$); 8,071 (d, $J = 2$ Hz, 1H, CH_{ar}); 8,187 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H, CH_{ar}); 8,742 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, CH_{ar}) ppm

4.2.4 Sinteza (*1R,4R*)-4-((6-metoksikinolin-4-il)karbamoil)cikloheksanaminijevega klorida



Postopek

V 10-mililitrsko bučko smo natehtali spojino **3** (0,100 g, 0,25 mmol, 1 ekv) in jo raztopili v 1 ml 1 M HCl v očetni kislini. Reakcijsko zmes smo mešali približno 30 minut na sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Ko je reakcija potekla v celoti, smo reakcijsko zmes odstavili in prelili s približno 3 ml dietiletra. Pri tem je nastala bela oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem preko keramičnega filtra. Oborino smo sprali z ohlajenim dietiletrom in jo posušili na keramičnem filtru. Izolirali smo spojino **4**.

Pri ponovni sintezi spojine **4** smo uporabili enak postopek in ekvivalente reagentov. Pri prvi ponovitvi smo uporabili 0,980 g in pri drugi 2,142 g spojine **3** ter ustrezne količine ostalih reagentov.

Rezultati

Videz: amorf svetlo rumene barve

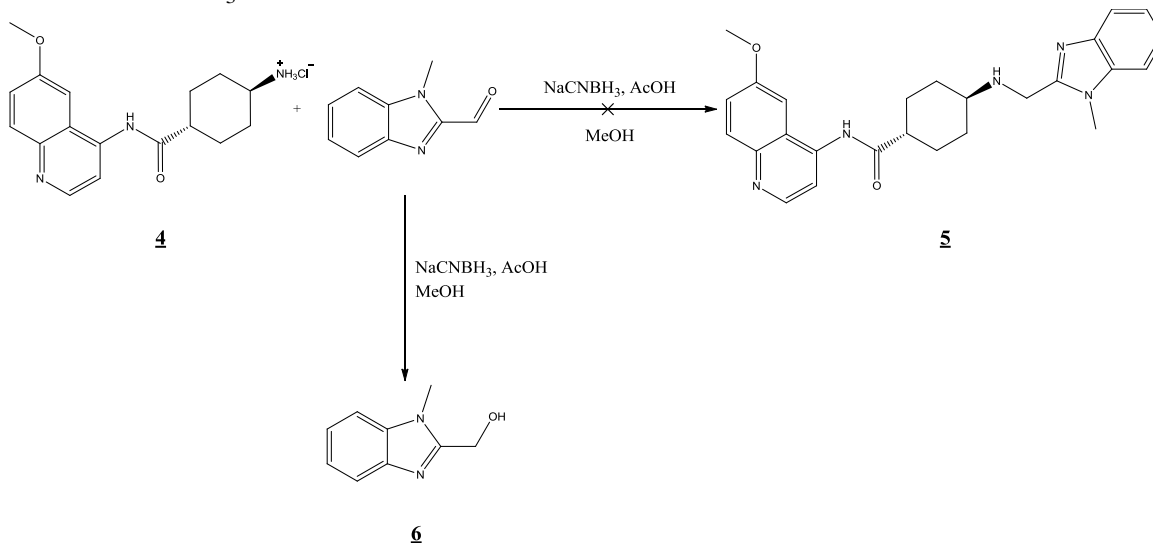
Mr: 335,83

Izkoristek: $\eta_1 = 83,3\%$ (0,070 g), $\eta_2 = 98,9\%$ (0,815 g), $\eta_3 = 85,7\%$ (1,544 g)

Rf: 0, lisa se nahaja na bazni liniji (MF: DKM/MeOH = 9/1 + 1 % AcOH)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): $\delta = 1,450\text{--}1,610$ (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$); $2,046\text{--}2,093$ (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$); $3,044\text{--}3,083$ (m, 1H, CH); $3,154\text{--}3,207$ (m, 1H, CH); $4,090$ (s, 3H, CH_3); $7,787$ (dd, $J_1 = 9,2$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, 1H, CH_{ar}); $8,113$ (s, 2H, NH_2); $8,221$ (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, CH_{ar}); $8,348$ (d, $J = 2$ Hz, 1H, CH_{ar}); $8,615$ (d, $J = 6,4$ Hz, 1H, CH_{ar}); $8,928$ (d, $J = 6,4$ Hz, 1H, CH_{ar}); $11,252$ (s, 1H, $\text{CH}_{\text{ar}}\text{-NH-CO}$) ppm

4.2.5 Poskus sinteze (*1R, 4R*)-*N*-(6-metoksikinolin-4-il)-4-(((1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)metil)amino)cikloheksankarboksamida z uporabo NaCNBH_3



Postopek

V 50-mililitrsko bučko smo zatehtali spojino **4** (0,200 g, 0,60 mmol, 1 ekv) in jo raztopili v 10 ml brezvodnega MeOH. Dodali smo AcOH (0,02 ml, 0,30 mmol, 0,5 ekv). Bučko smo zaprli s septumom, prepihali z argonom in pustili mešati približno 30 minut na sobni temperaturi pod argonovo atmosfero. Nato smo dodali v manjši količini brezvodnega MeOH raztopljen NaCNBH_3 (0,079 g, 1,3 mmol, 2,1 ekv). Po 10 minutah mešanja smo počasi po kapljicah dodali 1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-karbaldehid (0,095 g, 0,6 mmol, 1 ekv), ki smo ga predhodno raztopili v manjši količini brezvodnega MeOH. Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč na sobni temperaturi pod argonovo atmosfero. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Po 20 urah je bila v reakcijski zmesi še vedno prisotna izhodna spojina **4**, medtem ko je lisa 1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-karbaldehida izginila. Dodali smo še 0,3 ekvivalente 1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-karbaldehida (0,029 g, 0,18 mmol, 0,3 ekv) in reakcijsko zmes pustili mešati še 2 uri. Nato smo razvili TLC, na katerem je bila lisa spojine **4** še vedno prisotna. V reakcijsko zmes smo dodali še 0,2 ekvivalenta 1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-karbaldehida (0,019 g, 0,12 mmol, 0,2 ekv) in

0,4 ekvivalente NaCNBH₃ (0,015 g, 0,2 mmol, 0,4 ekv) ter pustili mešati 1,5 ure. Po 1,5 ure ni prišlo do spremembe TLC, zato smo nadaljevali z izolacijo. Reakcijski zmesi smo dodali 40 ml DKM in 15 ml nasičene raztopine NaHCO₃, pH vodne faze smo uravnali na 9 z 1M NaOH, prenesli v lij ločnik in ekstrahirali še trikrat s 15 ml DKM. Organske faze smo združili, sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in filtratu uparili topilo na rotavaporju. Dobili smo 0,264 g surovega produkta, ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo. Kot mobilno fazo za začetek kromatografije smo izbrali DKM/MeOH = 20/1, nato smo kromatografijo nadaljevali z mobilno fazo DKM/MeOH = 9/1. Frakcije, ki so predvidoma vsebovale zelen produkt, smo združili in jim uparili topilo na rotavaporju. Izolirali smo 0,099 g produkta. Glede na NMR reakcija ni potekla in nismo uspeli izolirati zelene spojine **5**. Potekla je redukcija aldehida do (1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)metanola (spojina **6**).

Rezultati

Videz: amorf bele barve

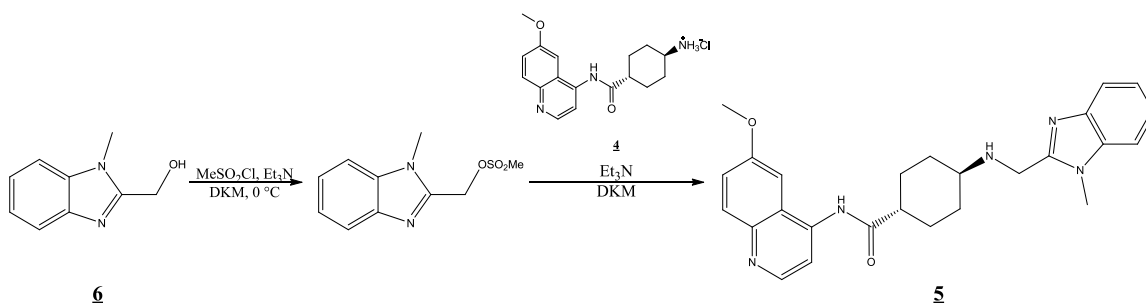
Mr: 162,08

Izkoristek: $\eta = 68,3 \%$ (0,099 g) glede na 1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-karbaldehid

Rf: 0,75 (MF: DKM/MeOH = 4/1); 0,35 (MF: DKM/MeOH = 9/1); 0,15 (MF: DKM/MeOH = 20/1)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): $\delta = 3,834$ (s, 3H, CH₃); 4,723 (d, $J = 6,0$ Hz, 2H, CH₂); 5,582 (t, $J = 6,0$ Hz, 1H, OH); 7,185 (ddd, $J_1 = 8,0$ Hz, $J_2 = 6,8$ Hz, $J_3 = 1,2$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,251 (ddd, $J_1 = 8$ Hz, $J_2 = 6,8$ Hz, $J_3 = 1,2$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,535 (ddd, $J_1 = 8,0$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz, $J_3 = 0,8$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,593 (ddd, $J_1 = 8,0$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, $J_3 = 0,8$ Hz, 1H, CH_{ar})
ppm

4.2.6 Sinteza (*1R, 4R*)-*N*-(6-metoksikinolin-4-il)-4-(((1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)metil)amino)cikloheksankarboksamida iz alkohola preko tvorbe metansulfona



Postopek

V 25-mililitrsko bučko smo zatehtali spojino **6** (0,099 g, 0,62 mmol, 1 ekv) in dodali 1 ml DKM. Zmes smo mešali na ledeni kopeli. Po kapljicah smo počasi dodali Et₃N (0,130 ml, 0,93 mmol, 1,5 ekv) in MeSO₂Cl. Reakcijsko zmes smo mešali približno 2 uri, nato smo dodali spojino **4** (0,207 g, 0,62 mmol, 1 ekv) in Et₃N (0,130 ml, 0,93 mmol, 1,5 ekv). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč na ledu, da se je ta počasi stalil. Potek reakcije smo spremljali s TLC. V reakcijski zmesi ni bilo več prisotne izhodne spojine, zato smo nadaljevali z izolacijo. Nastalo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in oborino posušili na nuči. V matičnici se je še vedno nahajalo nekaj končne spojine, zato smo ji uparili topilo na rotavaporju. Dobili smo surov produkt, ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo. Za mobilno fazo smo izbrali DKM/MeOH = 20/1 + 1 % Et₃N. Frakcije, ki naj bi vsebovale produkt, smo združili in jim uparili topilo na rotavaporju ter jih združili z oborino. Izolirali smo spojino **5**.

Rezultati

Videz: kristali bele barve

T_{tatlišče}: 236–240 °C

Mr: 443,55

Izkoristek: η = 15,0 % (0,041 g)

Rf: 0,45 (MF: DKM/MeOH=9/1 + 1 % Et₃N), 0,29 (MF: DKM/MeOH=20/1 + 1 % Et₃N)

^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ = 1,643–1,773 (m, 4H, $2 \times \text{CH}_2$), 1,895–1,939 (m, 2H, CH_2); 2,028–2,105 (m, 2H, CH_2); 2,799–2,854 (m, 1H, CH); 3,411–3,465 (m, 1H, CH); 3,977 (s, 3H, CH_3); 4,156 (s, 3H, CH_3); 7,294 (t, 1H, $J = 7,6$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,381 (t, $J = 7,6$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,451 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,649 (d, $J = 7,6$ Hz, 2H, $2 \times \text{CH}_{\text{ar}}$); 7,732 (d, $J = 8$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,932 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, CH_{ar}); 8,032 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H, CH_{ar}); 8,607 (s, 1H, NH-CO ali CH_{ar}); 8,654 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H, CH_{ar}); 10,105 (s, 1H, NH-CO ali CH_{ar}) ppm

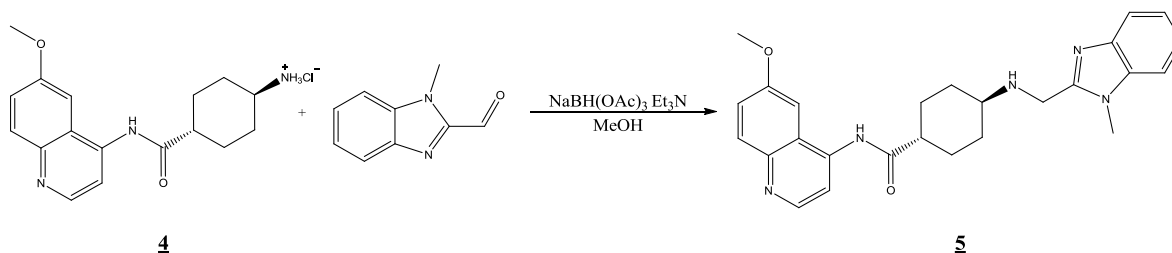
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6): δ = 17,32; 27,47; 31,61; 32,89; 43,41; 55,76; 68,57; 101,23; 110,76; 112,83; 119,92; 121,27; 121,84; 122,46; 123,98; 139,93; 140,36; 142,09; 144,67; 147,30; 147,99; 152,68; 156,98; 175,29 ppm

IR (ATR): ν = 2925, 2855, 1694, 1650, 1626, 1601, 1576, 1532, 1504, 1471, 1452, 1434, 1404, 1378, 1367, 1342, 1318, 1305, 1264, 1190, 1176, 1148, 1120, 1084, 1066, 1045, 1028, 1006, 941, 920, 900, 878, 849, 826, 770, 755, 739, 700, 688 cm^{-1}

MS (m/z): 442,25 ($\text{M} - \text{H}^-$)

HRMS: 442,2246 (izračunana vrednost za $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_2$: 442,2243)

4.2.7 Sinteza (*1R,4R*)-*N*-(6-metoksikinolin-4-il)-4-(((1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)metil)amino)cikloheksankarboksamida z uporabo $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$



Postopek

V 50-mililitrsko bučko smo zatehtali spojino **4** (0,175 g, 0,52 mmol, 1,0 ekv) in jo raztopili v 10 ml brezvodnega MeOH. Bučko smo zaprli s septumom, prepihali z argonom in mešali pod argonovo atmosfero. V manjši količini brezvodnega MeOH smo raztopili 1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-karbaldehid (0,100 g, 0,63 mmol, 1,2 ekv) in raztopino počasi po kapljicah dodajali k raztopini spojine **4**. Med mešanjem smo po kapljicah dodajali Et_3N (0,108 ml, 0,78 mmol, 1,5 ekv) in pustili mešati 30 minut. Po 30 minutah smo v reakcijsko

zmes po kapljicah dodali v manjši količini brezvodnega MeOH raztopljen $\text{NaBH}(\text{OAc})_3$ in pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Nastalo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem preko keramičnega filtra, oborino smo sprali z ohlajenim MeOH in jo posušili na filtru. Izolirali smo spojino **5**.

Rezultati

Videz: kristali bele barve

$T_{\text{tališče}}$: 237–239 °C

Mr: 443,55

Izkoristek: $\eta_1 = 29,0 \%$ (0,067 g)

Rf: 0,77 (MF: DKM/MeOH = 4/1 + 1 % Et_3N); 0,47 (MF: DKM/MeOH = 9/1 + 1 % Et_3N)

^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 1,681\text{--}1,772$ (m, 4H, $2\times\text{CH}_2$); 1,895–1,937 (m, 2H, CH_2); 2,079–2,103 (m, 2H, CH_2); 2,795–2,851 (m, 1H, CH); 2,795–2,851 (m, 1H, CH); 3,975 (s, 3H, CH_3); 4,155 (s, 3H, CH_3); 7,292 (td, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,379 (td, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 0,8$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,444 (dd, $J_1 = 9,2$ Hz, $J_2 = 2,8$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,635 (s, 1H, CH_{ar}); 7,649 (d, $J = 6$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,730 (d, $J = 8$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,929 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, CH_{ar}); 8,024 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H, CH_{ar}); 8,605 (s, 1H, CH_{ar}); 8,650 (d, $J = 4,8$ Hz, 1H, CH_{ar}), 10,098 (s, 1H, $\text{CH}_{\text{ar}}\text{-NH-CO}$) ppm

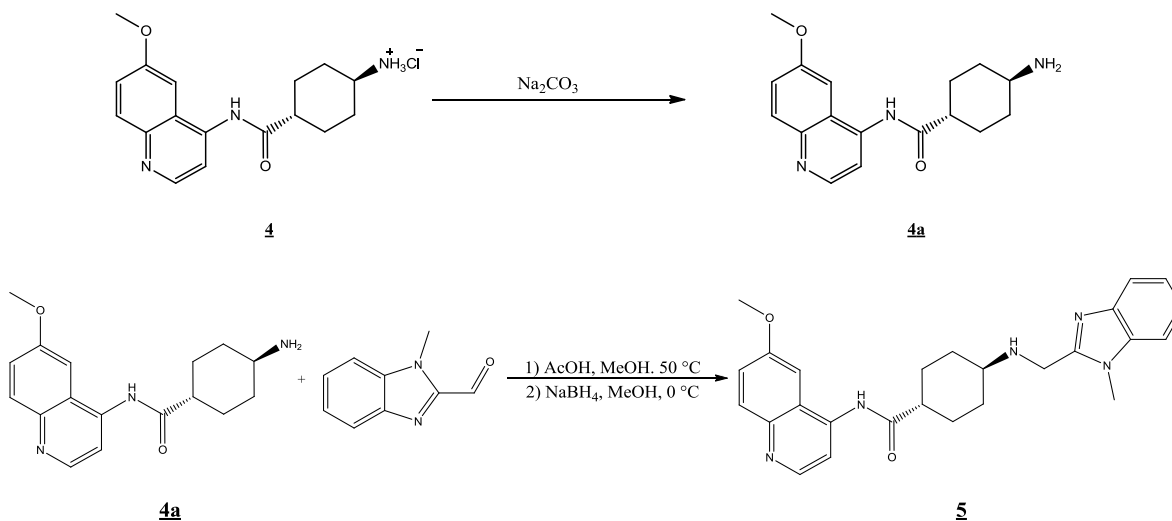
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6): $\delta = 17,32$; 27,47; 31,61; 32,89; 43,41; 55,76; 68,57; 101,23; 110,76; 112,83; 119,92; 121,27; 121,84; 122,46; 123,98; 139,93; 140,36; 142,09; 144,67; 147,30; 147,99; 152,68; 156,98; 175,29 ppm

IR (ATR): $\nu = 2925, 2855, 1694, 1650, 1626, 1601, 1576, 1532, 1504, 1471, 1452, 1434, 1404, 1378, 1367, 1342, 1318, 1305, 1264, 1190, 1176, 1148, 1120, 1084, 1066, 1045, 1028, 1006, 941, 920, 900, 878, 849, 826, 770, 755, 739, 700, 688$ cm^{-1}

MS (m/z): 442,61 ($\text{M} + \text{H}$)⁺; 464,64 ($\text{M} + \text{Na}$)⁺; 440,69 ($\text{M}-\text{H}$)⁻

HRMS: 442,2246 (izračunana vrednost za $\text{C}_{26}\text{H}_{28}\text{N}_5\text{O}_2$: 442,2243)

4.2.8 Sinteza (*1R, 4R*)-*N*-(6-metoksikinolin-4-il)-4-(((1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-il)metil)amino)cikloheksankarboksamida z uporabo NaBH₄



Postopek

Zatehtano količino spojine **4** (0,150 g, 0,45 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 20 ml DKM in prenesli v lij ločnik. Dodali smo 10 ml nasičene raztopine Na₂CO₃, premešali in vodno fazo ekstrahirali še dvakrat z 10 ml DKM. Organske faze smo združili in sušili nad Na₂SO₄, filtrirali, filtrat prenesli v 25-mililitrsko bučko in uparili topilo na rotavaporju. Dobili smo vmesni produkt **4a** v neionizirani obliki, ki smo ga uporabili v naslednji sintezni stopnji brez identifikacije. V bučko z vmesnim produktom **4a** (0,067 g, 0,22 mmol, 1 ekv) smo natehtali še 1-metil-1*H*-benzo[*d*]imidazol-2-karbaldehid (0,040 g, 0,25 mmol, 1,1 ekv) in raztopili v 5 ml brezvodnega MeOH ter dodali katalitsko količino AcOH. Bučko smo namestili na vodni hladilnik in dve minuti odsesavali zrak z membransko črpalko, nato smo zaprli ventil in uvedeli argon. Reakcijsko zmes smo segrevali 30 minut na 50 °C na oljni kopeli pod argonovo atmosfero. Pri tem smo lahko opazili nastajanje bele oborine. Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli in v ohlajeno raztopino po kapljicah dodajali NaBH₄ (0,034 g, 0,89 mmol, 4 ekv), ki smo ga predhodno raztopili v manjši količini brezvodnega MeOH. Reakcijsko zmes smo mešali še 10 minut na ledeni kopeli, nato smo jo odstavili z ledu in pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Po 18 urah v reakcijski zmesi ni bilo več prisotne spojine **4a**, zato smo nadaljevali z izolacijo. Nastalo oborino smo odfiltrirali z

odsosavanjem preko keramičnega filtra, oborino smo sprali z ohlajenim MeOH in posušili na nuči. Izolirali smo spojino **5**.

Rezultati

Videz: kristali bele barve

T_{tališče}: 236–240 °C

Mr: 443,55

Izkoristek: $\eta = 22,5 \%$ (0,045 g)

Rf: 0,48 (MF: DKM/MeOH = 9/1 + 1 % Et₃N)

¹H NMR (400 Hz, DMSO-d₆): $\delta = 1,637\text{--}1,764$ (m, 4H, 2×CH₂); 1,911–1,933 (m, 2H, CH₂); 2,079–2,099 (m, 2H, CH₂); 2,804–2,857 (m, 1H, CH); 3,977 (s, 3H, CH₃); 4,148 (s, 3H, CH₃); 7,289 (td, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,378 (td, $J_1 = 7,2$ Hz, $J_2 = 0,8$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,481 (dd, $J_1 = 9,2$ Hz, $J_2 = 2,8$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,644 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,677 (d, $J = 2,8$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,725 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,945 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, CH_{ar}); 8,606 (s, 1H, CH_{ar}), 8,682 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, CH_{ar}); 10,172, 1H, CH_{ar}-NH-CO) ppm

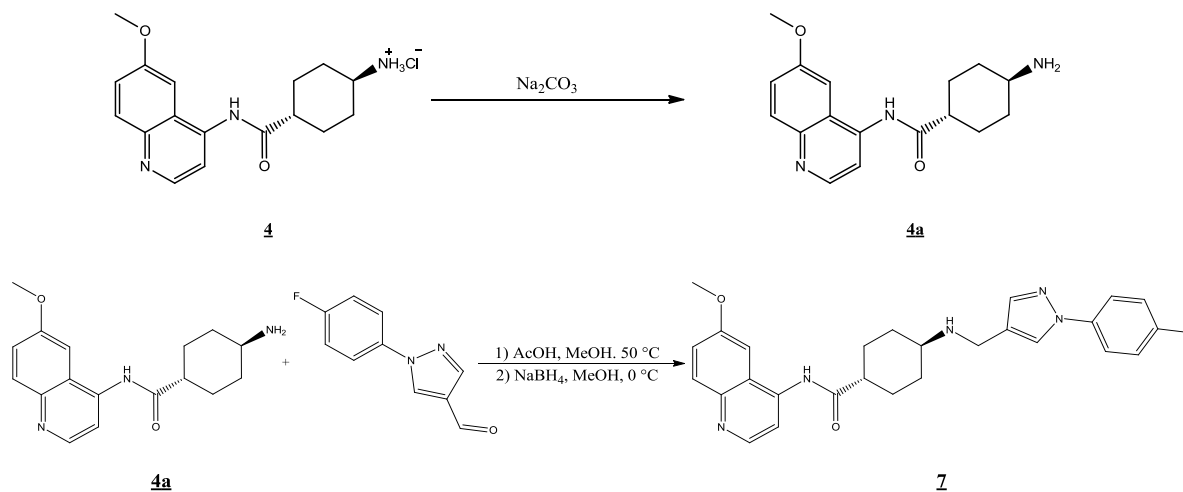
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 17,32; 27,47; 31,61; 32,89; 43,41; 55,76; 68,57; 101,23; 110,76; 112,83; 119,92; 121,27; 121,84; 122,46; 123,98; 139,93; 140,36; 142,09; 144,67; 147,30; 147,99; 152,68; 156,98; 175,29$ ppm

IR (ATR): $\nu = 2925, 2855, 1694, 1650, 1626, 1601, 1576, 1532, 1504, 1471, 1452, 1434, 1404, 1378, 1367, 1342, 1318, 1305, 1264, 1190, 1176, 1148, 1120, 1084, 1066, 1045, 1028, 1006, 941, 920, 900, 878, 849, 826, 770, 755, 739, 700, 688$ cm⁻¹

MS (*m/z*): 442, 94 (M + H)⁺; 464,64 (M + Na)⁺; 440,69 (M - H)⁻

HRMS: 442,2246 (izračunana vrednost za C₂₆H₂₈N₅O₂: 442,2243)

4.2.9 Sinteza (*1R, 4R*)-4-(((1-(4-fluorofenil)-1*H*-pirazol-4-il)metil)amino)-*N*-(6-metoksikinolin-4-il)cikloheksankarboksamida



Postopek

Pretvorbo spojine **4** (0,193 g, 0,45 mmol, 1 ekv) v neionizirano obliko smo izvedli po enakem postopku, kot ga opisujemo v poglavju 4.2.8. V bučko z vmesnim produktom **4a** (0,126 g, 0,42 mmol, 1 ekv) smo natehtali še 1-(4-fluorofenil)-1*H*-pirazol-4-karbaldehid (0,104 g, 1,26 mmol, 3 ekv) in raztopili v 7 ml brezvodnega MeOH ter dodali katalitsko količino AcOH. Bučko smo namestili na vodni hladilnik in dve minuti odsesavali zrak z membransko črpalko, nato smo zaprli ventil in uvedli argon. Reakcijsko zmes smo segrevali 30 minut na 50 °C na oljni kopeli pod argonovo atmosfero. Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli in v ohlajeno raztopino po kapljicah dodajali NaBH_4 (0,079 g, 0,89 mmol, 4 ekv), ki smo ga predhodno raztopili v manjši količini brezvodnega MeOH. Reakcijsko zmes smo mešali še 10 minut na ledeni kopeli, nato smo jo odstavili z ledu in pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Po 18 urah v reakcijski zmesi ni bilo več prisotne spojine **4a**, zato smo nadaljevali z izolacijo. Reakcijski zmesi smo uparili topilo, da smo dobili surov produkt, ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo. Za mobilno fazo smo izbrali DKM/MeOH = 9/1 + 1 % Et_3N . Frakcije, ki naj bi vsebovale končno spojino, smo združili in jim uparili topilo na rotavaporju. Izolirali smo spojino **7**.

Rezultati

Videz: amorf bele barve

T_{steklast prehod}: 180–185 °C

Mr: 472,56

Izkoristek: $\eta = 47,7 \%$ (0,130 g)

Rf: 0,14 (MF: DKM/MeOH = 9,1 + 1 % Et₃N)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 0,990$ (t, $J = 7,2$ Hz, 1H, NH); 1,210 (q, $J = 12,4$ Hz, 2H, CH₂); 1,555 (q, $J = 12,0$ Hz, 2H, CH₂); 1,984 (d, $J = 12,4$ Hz, 2H, CH₂); 2,096 (d, $J = 12,0$ Hz, 2H, CH₂); 2,545–2,638 (m, 1H, CH); 2,680–2,748 (m, 1H, CH); 3,779 (s, 2H, NH-CH₂-CH_{ar}); 3,962 (s, 3H, CH₃); 7,351 (t, $J = 8,8$ Hz, 2H, 2×CH_{ar}); 7,431 (dd, $J_1 = 9,2$ Hz, $J_2 = 2,8$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,623 (d, $J = 2,4$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,732 (s, 1H, CH_{ar} ali NH-CO); 7,848 (dd, $J_1 = 9,2$ Hz, $J_2 = 4,8$ Hz, 2H, 2×CH_{ar}); 7,914 (d, $J = 9,2$ Hz, 1H, CH_{ar}); 8,001 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, CH_{ar}); 8,412 (s, 1H, CH_{ar} ali NH-CO); 8,627 (d, $J = 5,2$ Hz, 1H, CH_{ar}); 10,017 (s, 1H, CH_{ar} ali NH-CO) ppm

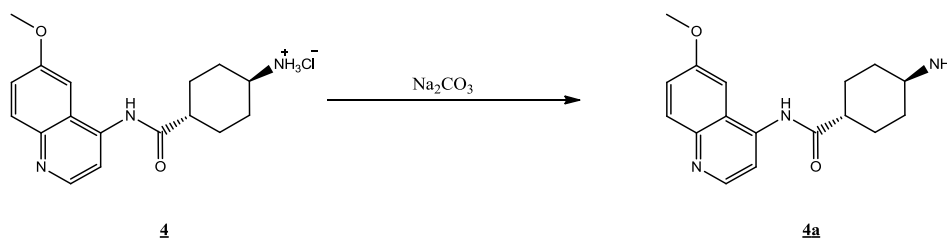
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 27,93$; 31,35; 44,05; 55,05; 55,77; 101,19; 112,67; 116,11; 116,34; 119,93; 120,01; 121,26; 121,75; 130,98; 140,36; 140,95; 144,65; 147,97; 156,97; 175,36 ppm

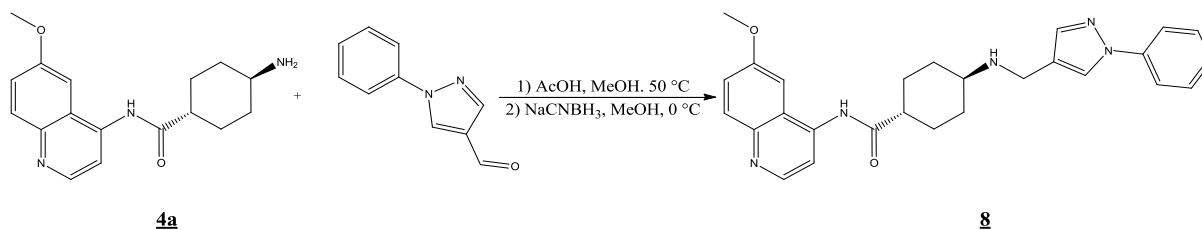
IR (ATR): $\nu = 3261, 3102, 2938, 2846, 1661, 1625, 1600, 1576, 1516, 1500, 1472, 1431, 1401, 1370, 1305, 1265, 1236, 1192, 1156, 1129, 1108, 1028, 952, 828, 736, 716, 702, 661, 607 \text{ cm}^{-1}$

MS (m/z): 474,67 (M + H)⁺; 472,73 (M – H)[–]

HRMS: 472,2140 (izračunana vrednost za C₂₇H₂₇N₅O₂F: 472,2149)

4.2.10 Sinteza (*1R, 4R*)-*N*-(6-metoksikinolin-4-il)-4-(((1-fenil-1*H*-pirazol-4-il)methyl)amino)cikloheksankarboksamida





Postopek

Pretvorbo spojine **4** (0,245 g, 0,73 mmol, 1 ekv) v neionizirano obliko smo izvedli po enakem postopku, kot ga opisujemo v poglavju 4.2.8. V bučko z vmesnim produktom **4a** (0,210 g, 0,70 mmol, 1 ekv) smo natehtali še 1-fenil-1*H*-pirazol-4-karbaldehid (0,157 g, 0,91 mmol, 1,3 ekv) in raztopili v 7 ml brezvodnega MeOH ter dodali katalitsko količino AcOH. Bučko smo namestili na vodni hladilnik in dve minuti odsesavali zrak z membransko črpalko, nato smo ventil zaprli in uvedli argon. Reakcijsko zmes smo segrevali 30 minut na 50 °C na oljni kopeli pod argonovo atmosfero. Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli in v ohlajeno raztopino po kapljicah dodali NaCNBH₃ (0,132 g, 2,10 mmol, 3 ekv), ki smo ga predhodno raztopili v manjši količini brezvodnega MeOH. Reakcijsko zmes smo mešali še 10 minut na ledeni kopeli, nato smo jo odstavili z ledu in pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Po 18 urah v reakcijski zmesi ni bilo več prisotne spojine **4a**, zato smo nadaljevali z izolacijo. Nastalo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in sprali s čistim MeOH. Matičnici smo uparili topilo na rotavaporju, da smo dobili surov produkt, ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo. Za mobilno fazo smo izbrali DKM/MeOH = 9/1 + 1 % Et₃N. Frakcije, ki naj bi vsebovale končno spojino, smo združili in jim uparili topilo. Posneli smo NMR zaostanka, kjer smo opazili, da so najverjetneje še vedno prisotni kompleksi z NaCNBH₃. Zaostanek smo raztopili v 20 ml etilacetata, prenesli v lij ločnik in organsko fazo trikrat sprali z 10 ml nasičene vodne raztopine NaHCO₃. Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in filtratu uparili topilo na rotavaporju. Izolirali smo spojino **8**.

Pri ponovni sintezi spojine **8** smo uporabili enake ekvivalente reagentov, postopek pa smo modificirali. Ekstrakcijo z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃ smo izvedli pred kolonsko kromatografijo. Za kolonsko kromatografijo smo namesto prej uporabljene mobilne faze uporabili mobilno fazo CHCl₃/MeOH = 15/1 + 1 % Et₃N. Uporabili smo 0,240 g spojine **4**, iz katere smo po spiranju z nasičeno raztopino Na₂CO₃ dobili 0,216 g vmesnega produkta **4a**, in ustrezne količine ostalih reagentov, preračunane glede na količino **4a**.

Rezultati

Videz: svetlo rumeni kristali

T_{tališče}: 72-74°C

Mr: 455,56

Izkoristek: $\eta_1 = 13,8 \%$ (0,046 g), $\eta_2 = 23,0 \%$ (0,075 g)

Rf: 0,23 (MF: DKM/MeOH = 9/1 + 1 % Et₃N)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 1,246-1,356$ (m, 2H, CH₂); 1,686–1,823 (m, 2H, CH₂); 2,110–2,182 (m, 4H, 2×CH₂); 2,429–2,491 (m, 1H, CH); 2,645–2,727 (m, 1H, CH); 3,859 (s, 2H, NH-CH₂-CH_{ar}); 4,004 (s, 3H, CH₃); 7,040 (s, 1H, CH_{ar}); 7,319 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,476 (t, $J = 7,6$ Hz, 2H, 2×CH_{ar}); 7,701 (d, $J = 7,2$ Hz, 3H, 3×CH_{ar}); 7,761 (s, 1H, NH-CO ali CH_{ar}); 7,930 (s, 1H, NH-CO ali CH_{ar}); 8,069 (d, $J = 9,6$ Hz, 1H, CH_{ar}); 8,197 (s, 1H, NH-CO ali CH_{ar}); 8,457–8,586 (m, 1H, CH_{ar}); 8,740 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H, CH_{ar}) ppm

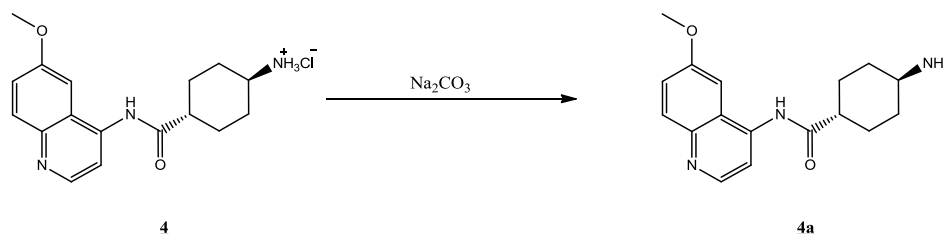
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 27,88$; 43,98; 54,90; 55,02; 55,77; 101,20; 112,67; 115,53; 116,07; 118,02; 121,26; 121,75; 122,44; 126,00; 129,53; 139,66; 140,35; 140,98; 144,65; 147,97; 156,97; 175,31 ppm

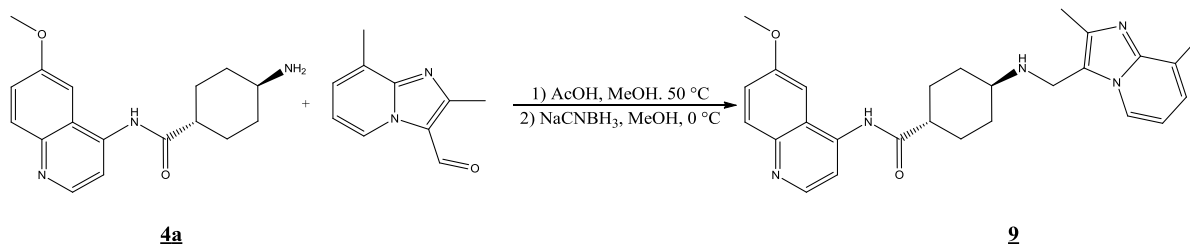
IR (ATR): $\nu = 3254, 2936, 2858, 1681, 1626, 1598, 1575, 1524, 1501, 1451, 1402, 1376, 1306, 1237, 1173, 1120, 1027, 954, 842, 756, 689, 654, 629, 600$ cm⁻¹

MS (m/z): 456,66 (M + H)⁺; 454,69 (M - H)⁻

HRMS: 454,2237 (izračunana vrednost za C₂₇H₂₈N₅O₂: 454,2243)

4.2.11 Sinteza (1*R*, 4*R*)-4-(((2,8-dimetilimidazo[1,2-*a*]piridin-3-il)metil)amino)-*N*-(6-metoksikinolin-4-il)cikloheksankarboksamida





Postopek

Pretvorbo spojine **4** (0,245 g, 0,73 mmol, 1 ekv) v neionizirano obliko smo izvedli po enakem postopku, kot ga opisujemo v poglavju 4.2.8. V bučko z vmesnim produktom **4a** (0,200 g, 0,69 mmol, 1 ekv) smo natehtali še 2,8-dimetilimidazo[1,2-a]piridin-3-karbaldehid (0,151 g, 0,868 mmol, 1,3 ekv) in ju raztopili v 7 ml brezvodnega MeOH ter dodali katalitsko količino AcOH. Bučko smo namestili na vodni hladilnik in dve minuti odsesavali zrak z membransko črpalko, nato smo zaprli ventil in uvedli argon. Reakcijsko zmes smo segrevali 30 minut na 50 °C na oljni kopeli pod argonovo atmosfero. Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli in v ohlajeno raztopino po kapljicah dodali NaCNBH₃ (0,126 g, 2,00 mmol, 3 ekv), ki smo ga predhodno raztopili v manjši količini brezvodnega MeOH. Reakcijsko zmes smo mešali še 10 minut na ledeni kopeli, nato smo jo odstavili z ledu in pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Po 18 urah v reakcijski zmesi ni bilo več prisotne spojine **4a**, zato smo nadaljevali z izolacijo. Nastalo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in sprali s čistim MeOH. Matičnici smo uparili topilo na rotavaporju. Zaostanek smo raztopili v 20 ml etilacetata, prenesli v lij ločnik in organsko fazo sprali trikrat z 10 ml nasičene vodne raztopine NaHCO₃. Organsko fazo smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in filtratu uparili topilo na rotavaporju, da smo dobili surov produkt, ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo. Za mobilno fazo smo izbrali DKM/MeOH = 9/1 + 1 % Et₃N. Frakcije, ki naj bi vsebovale končno spojino, smo združili in jim uparili topilo. Glede na posneti spekter NMR spojina ni bila dovolj čista, zato smo izvedli dodatno čiščenje s kolonsko kromatografijo. Za mobilno fazo smo izbrali CDCl₃/MeOH = 15/1 + 1 % Et₃N. Frakcije, ki naj bi vsebovale končno spojino, smo združili in jim uparili topilo. Izolirali smo spojino **9**.

Rezultati

Videz: beli drobni kristali

T_{tališče}: 48–50 °C

Mr: 457,25

Izkoristek: $\eta = 15,5 \%$ (0,050 g)

Rf: 0,25 (MF: DKM/MeOH = 9/1 + 1 % Et₃N), 0,15 (MF: CDCl₃/MeOH = 15/1 + 1 % Et₃N)

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): $\delta = 1,205$ (q, $J = 12,3$ Hz, 2H, CH₂); 1,726 (q, $J = 12,3$ Hz, 2H, CH₂); 2,133 (t, $J = 12,8$ Hz, 4H, 2 × CH₂); 2,398–2,466 (m, 1H, CH); 2,490 (s, 3H, CH₃); 2,590 (s, 3H, CH₃); 3,989 (s, 3H, CH₃); 4,138 (s, 2H, NH-CH₂-CH_{ar}); 6,733 (t, $J = 6,8$ Hz, 1H, CH_{ar}); 6,983 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, CH_{ar}); 7,085 (s, 1H, CH_{ar} ali NH-CO); 7,430 (d, $J = 9,0$ Hz, CH_{ar}); 7,857 (s, 1H, CH_{ar} ali NH-CO), 8,069 (d, $J = 9,0$ Hz, 1H, CH_{ar}); 8,128 (d, $J = 6,8$ Hz, 1H, CH_{ar}); 8,210 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H, CH_{ar}); 8,743 (d, $J = 4,4$ Hz, 1H, CH_{ar}) ppm

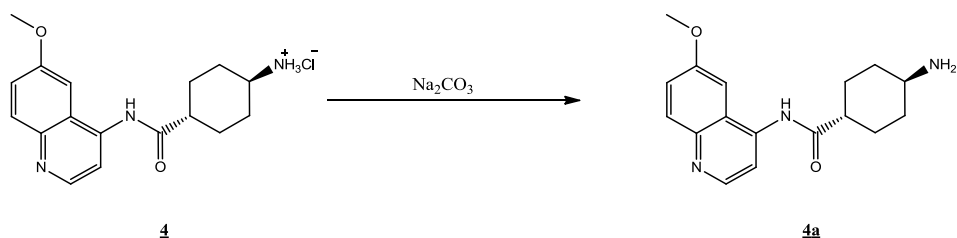
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 13,05$; 16,51; 28,11; 31,69; 36,39; 44,07; 55,26; 55,71; 101,07; 111,09; 112,85; 121,80; 121,83; 122,41; 122,68; 125,12; 130,89; 140,39; 144,54; 147,96; 156,99; 175,49; 176,15 ppm

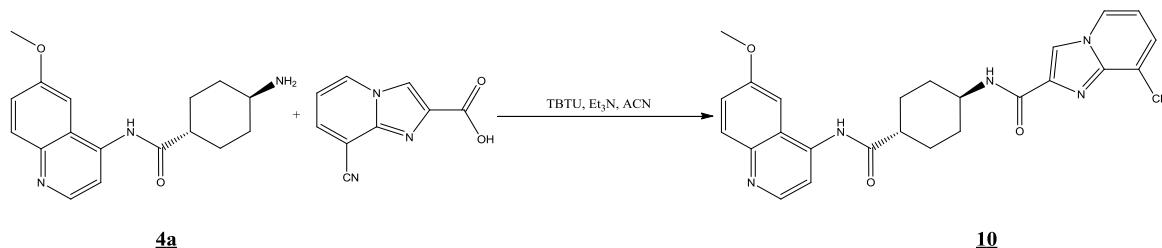
IR (ATR): $\nu = 3256, 2932, 2858, 1689, 1627, 1596, 1575, 1524, 1497, 1445, 1400, 1378, 1356, 1304, 1267, 1236, 1169, 1125, 1092, 1032, 848, 769, 746, 705, 673, 663 \text{ cm}^{-1}$

MS: 458,67 (M + H)⁺; 456,75 (M – H)⁻

HRMS: 456,2401 (izračunana vrednost za C₂₇H₃₀N₅O₂: 456,2400)

4.2.12 Sinteza 8-ciano-*N*-((*1R, 4R*)-4-((6-metoksikinolin-4-il)karbamoil)cikloheksil)imidazo[1,2-*a*]piridin-2-karboksamida





Postopek

Pretvorbo spojine **4** (0,190 g, 0,57 mmol, 1 ekv) v neionizirano obliko smo izvedli po enakem postopku, kot ga opisujemo v poglavju 4.2.8. Vmesni produkt **4a** (0,160 g, 0,54 mmol, 1 ekv) smo raztopili v 2 ml ACN. V 25-mililitrsko bučko smo natehtali 8-cianoimidazo[1,2-*a*]piridin-2-karboksilno kislino (0,100 g, 0,54 mmol, 1 ekv) in ustrezno količino TBTU (0,172 g, 0,54 mmol, 1 ekv) ter ju raztopili v 3 ml ACN. Iz bučke smo približno 2 minuti odsesavali zrak z membransko črpalko, nato smo zaprli ventil in uvedli argon. Dodali smo še ustrezno količino Et₃N (0,220 ml, 1,60 mmol, 3 ekv). Mešali smo približno 30 minut, nato smo počasi po kapljicah dodali raztopino vmesnega produkta **4a** v ACN. Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč na sobni temperaturi pod argonovo atmosfero. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Glede na TLC je reakcija potekla, zato smo nadaljevali z izolacijo. Nastalo belo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, sprali z na ledu ohlajenim ACN in posušili na nuči. Dobili smo surov produkt, ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo. Za mobilno fazo smo izbrali MF: DKM/MeOH = 12/1. Frakcije, ki naj bi vsebovale končno spojino, smo združili in jim uparili topilo na rotavaporju. Izolirali smo spojino **10**.

Rezultati

Videz: drobnih igličastih kristalov bele barve

T_{tališče}: 273–274

Mr: 468,19

Izkoristek: $\eta = 33,2\%$ (0,088 g)

Rf: 0,41 (MF: DKM/MeOH = 9/1); 0,21 (MF: DKM/MeOH = 12/1)

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): $\delta = 1564\text{--}1691$ (m, 4H, 2×CH₂); 1,921–1,962 (m, 2H, CH₂); 2,048–2,077 (m, 2H, CH₂); 2,864–2,928 (m, 1H, CH); signal druge CH ni viden, ker se najverjetneje nahaja pod širokim signlom vode; 4,054 (s, 3H, CH₃); 7,631 (d, $J = 11,6$

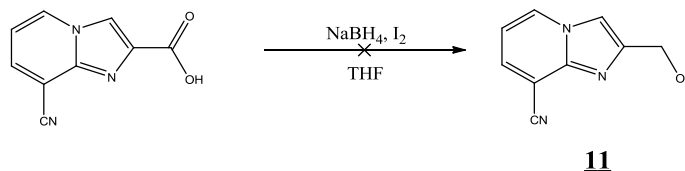
H_z, 1H, CH_{ar}); 7,791 (d, *J* = 9,2 Hz, 2H, 2×CH_{ar}); 8,032 (s, 1H, CH_{ar} ali NH-CO), 8,108 (d, *J* = 9,2 Hz, 1H, CH_{ar}); 8,440 (s, 1H, CH_{ar} ali NH-CO); 8,471 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, CH_{ar}); 8,617 (s, 1H, CH_{ar} ali NH-CO); 8,950 (d, *J* = 6,4 Hz, 1H, CH_{ar}); 9,379 (d, *J* = 11,6 Hz, 1H, CH_{ar}); 10,709 (s, 1H, CH_{ar} ali NH-CO) ppm

IR (ATR): $\nu = 3387, 3259, 3119, 3021, 2930, 2233, 1707, 1653, 1570, 1541, 1489, 1459, 1431, 1395, 1363, 1331, 1302, 1266, 1229, 1207, 1179, 1148, 1128, 1086, 1032, 1007, 985, 947, 923, 879, 847, 829, 810, 742, 730, 699, 661, 639, 602 \text{ cm}^{-1}$

MS (*m/z*): 469,57 (M + H)⁺; 491,56 (M+Na)⁺; 467,67 (M – H)⁻

HRMS: 469,1983 (izračunana vrednost za C₂₆H₂₅N₆O₃: 469,1988)

4.2.13 Poskus sinteze 2-(hidroksimetil)imidazo[1,2-*a*]piridin-8-karbonitrila



Postopek

V 25-mililitrsko bučko smo zatehtali ustrezno količino NaBH₄ (0,061 g, 1,60 mmol, 1,2 ekv) in ga raztopili v 2,5 ml THF. Bučko smo namestili na membransko črpalko in 2 minuti odsesavali zrak, nato smo uvedli argon. Raztopini smo počasi po kapljicah dodali 8-cianoimidazo[1,2-*a*]piridin-2-karboksilno kislino (0,250 g, 1,34 mmol, 1 ekv), ki smo jo predhodno raztopili v 2,5 ml THF, in mešali, dokler ni prenehalo nastajanje mehurčkov. Nato smo raztopino ohladili na ledu in počasi po kapljicah dodali I₂ (0,170 g, 0,67 mmol, 0,5 ekv), ki smo ga predhodno raztopili v 2,5 ml THF. Reakcijsko zmes smo pustili mešati na ledu. Potek reakcije smo spremljali s TLC. Po 1 uri reakcija še ni potekla, zato smo reakcijsko zmes odstavili z ledu in jo nadaljnji 2 uri mešali na sobni temperaturi. Ponovno smo razvili TLC. V reakcijski zmesi je bilo še vedno prisotne nekaj izhodne spojine, vendar smo nadaljevali z izolacijo. Reakcijsko zmes smo prelili s 3 ml 4M HCl, premešali, prenesli v lij ločnik in dodali 10 ml dietiletra. Po dodatku dietiletra nista nastali dve fazi, kar bi omogočalo ekstrakcijo, zato smo v zmes dodali 5 ml nasičene raztopine NaCl in po razplastitvi nadaljevali z ekstrakcijo. Razvili smo TLC vodne in organske faze, kjer je bilo razvidno, da je spojina prešla v vodno fazo. Vodno fazo smo naalkalili z 1M NaOH do pH

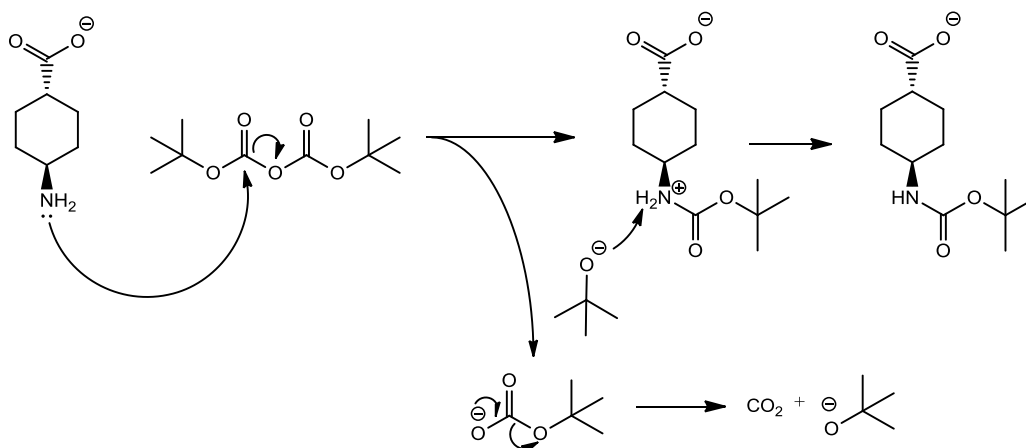
približno 9, nato smo dodali 10 ml DKM in ekstrahirali. Glede na TLC vodne in organske faze se je spojina še vedno nahajala v vodni fazi. Vodni fazi smo uparili topilo na rotavaporju in zaostanek prelili s 5 ml EtOH. Zmes smo sonicirali približno 15 minut v ultrazvočni kadički, nato smo neraztopljen ostanek odfiltrirali z odsesavanjem. Filtratu smo uparili topilo na rotavaporju in posneli NMR zaostanka. Glede na spekter NMR nismo izolirali spojine **11**, zato smo ponovno raztopili zaostanek po uparevanju in ostanek po filtriranju v vodi ter izvedli reverznofazno ločbo na aparaturi Isolera. Združili smo frakciji, ki naj bi vsebovali spojino **11**, in jima uparili topilo na rotavaporju. Posneli smo NMR zaostanka. Na spektru NMR sta bila prisotna samo signala topila in vode v izbranem topilu, zato smo opustili to sintezno pot.

5 Razprava

5.1.1 Razprava k uvedbi zaščitne skupine Boc za amine

V prvi sintezni stopnji smo zaščitili amino skupino (*1R,4R*)-4-aminocikloheksankarboksilne kisline, s čimer smo zmanjšali nukleofilnost amino skupine in olajšali izvedbo ostalih sinteznih stopenj. Med širokim naborom zaščitnih skupin za amine smo se odločili za *t*-butoksikarbonilno skupino (Boc), ki jo pogosto uporabljamo zaradi dobre stabilnosti ob prisotnosti mnogih reagentov in pod mnogimi reakcijskimi razmerami, še vedno pa jo lahko odstranimo pod relativno močno kislimi razmerami (36). Tudi v literaturnih podatkih o sintezi strukturno podobnih aril amidov in NBTI so uporabili z Boc zaščitene amine (37, 38).

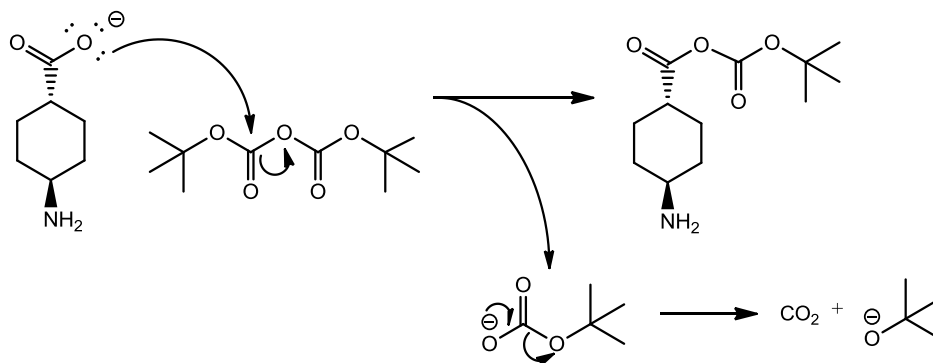
Z izbiro zmesi 1,4-dioksana in vode smo zagotovili ustrezno topnost izhodnih spojin, s tem pa dober stik reagentov in posledično potek reakcije. pH reakcijske zmesi smo uravnavali na vrednost 9, da je bila karboksilna skupina ves čas ionizirana, kar je povečalo topnost izhodne spojine v vodi, amino skupina pa je bila v ravnotežju med protonirano in deprotonirano obliko, ki reagira z Boc₂O. V prvem koraku pride do nukleofilnega napada amino skupine na karbonylni ogljik Boc-anhidrida, pri čemer izstopi *t*-butil karbonat. Ta v nadaljevanju razpade na CO₂ in *t*-butoksid. V drugem koraku močna baza (nastali *t*-butoksid) odcepi proton na protoniranem dušiku, kar vodi v nastanek karbamata. Mehanizem podrobneje prikazuje slika 14.



Slika 14: Mehanizem uvedbe Boc-zaščite na spojino I. Prirejeno po (36).

Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli, da smo zmanjšali obseg poteka stranskih reakcij s kompetitivnimi nukleofili, kot je denimo karboksilat, ki je šibko nukleofil in lahko pri sobni temperaturi reagira z Boc₂O do nastanka mešanega anhidrida. Pri tem se

sprošča CO₂ in *t*-butil alkohol. Nastali mešani anhidrid lahko nadalje reagira s karboksilno skupino izhodne spojine in tvori simetrične aldehide (39). Mehanizem predstavlja slika 15.



Slika 15: Mehanizem nastanka neželenega produkta, mešanega anhidrida, pri uporabi Boc-anhidrida za zaščito amino skupine. Prirejeno po (39).

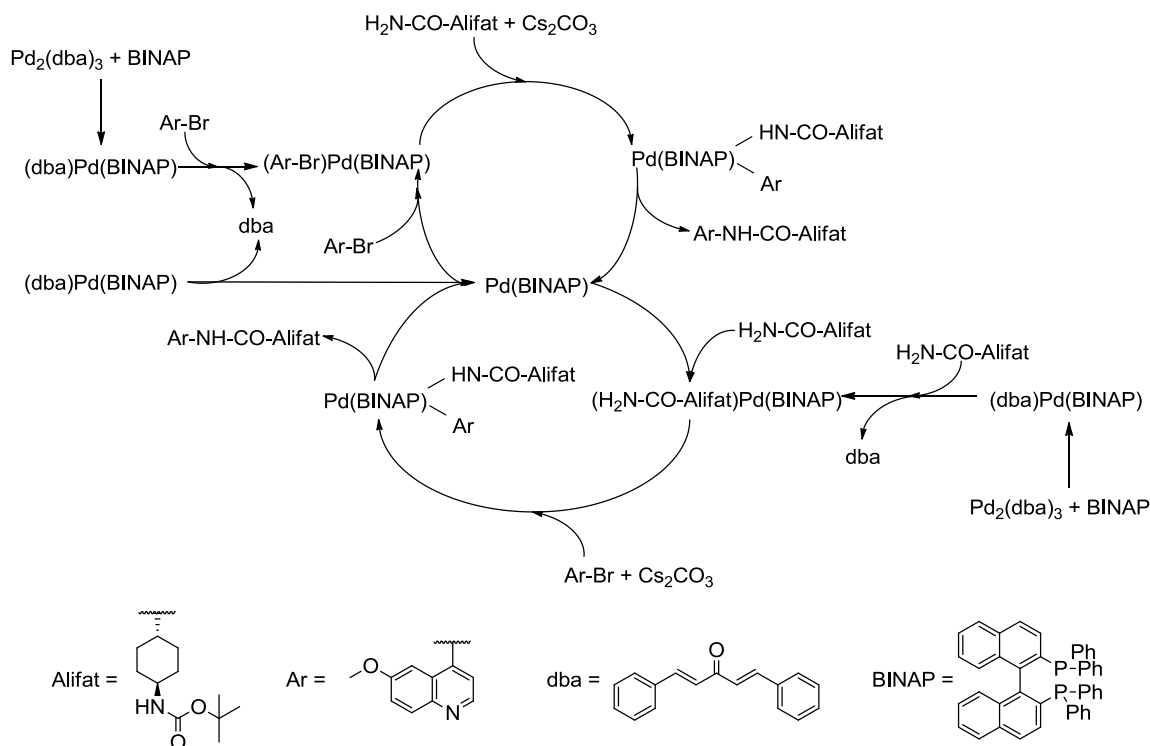
5.1.2 Razprava k pretvorbi karboksilne kisline v primarni amid

Postopek pretvorbe karboksilne kisline v primarni amid z uporabo sklopitvenih reagentov za sintezo peptidov in NH₄Cl ob prisotnosti terciarnega amina kot baze je enostaven, poteka hitro in pod milimi pogoji, a kljub temu daje visoke izkoristke (40), praktično brez prisotnosti stranskih produktov, četudi so v strukturi prisotne funkcionalne skupine občutljive na prisotnost NH₃. (41) Mehanizem reakcije poteka preko aktivacije karboksilne kisline do aktiviranega estra, ki ji sledi aminoliza. Potek reakcije je podoben mehanizmu tvorbe sekundarnih amidov, ki ga podrobno opisujemo v poglavju 5.1.7.

5.1.3 Razprava k tvorbi vezi med aril bromidom in karboksamidom z uporabo *in situ* tvorjenega katalizatorja Pd(BINAP)

Pri sintezi *t*-butil ((*1R,4R*)-4-((6-meoksikinolin-4-il)karbamoil)cikloheksil)karbamata smo uporabili sintezni postopek, ki so ga za sintezo strukturno podobne spojine uporabili Barfoot in sodelavci (38). Gre za prvo tovrstno v literaturi opisano uporabo s paladijem katalizirane reakcije za sklopitev α -hidroksi amida. Pri reakciji sodeluje *in situ* tvorjen kompleks med BINAP-om in paladijem ter Cs₂CO₃ kot baza (38). Mehanizem reakcije je najverjetneje podoben mehanizmu Buchwaldovega aminiranja (37). V prvem koraku katalitičnega cikla se tvori kompleks (BINAP)Pd(dba), čemur najverjetneje najprej sledi disociacija liganda dba pred oksidativno adicijo aril bromida na kompleks. Sledi koordinacija amida na kompleks in deprotoniranje do tvorbe kompleksa (Ar)(NH-CO-Alifat)Pd(BINAP). V končni fazi poteče reduktivna eliminacija do želenega produkta in regeneriranega katalizatorja (42). Sočasno najverjetneje poteka dodatni katalitični cikel, v katerem najprej poteče vezava amida, ki ji sledi oksidativna adicija aril halida.

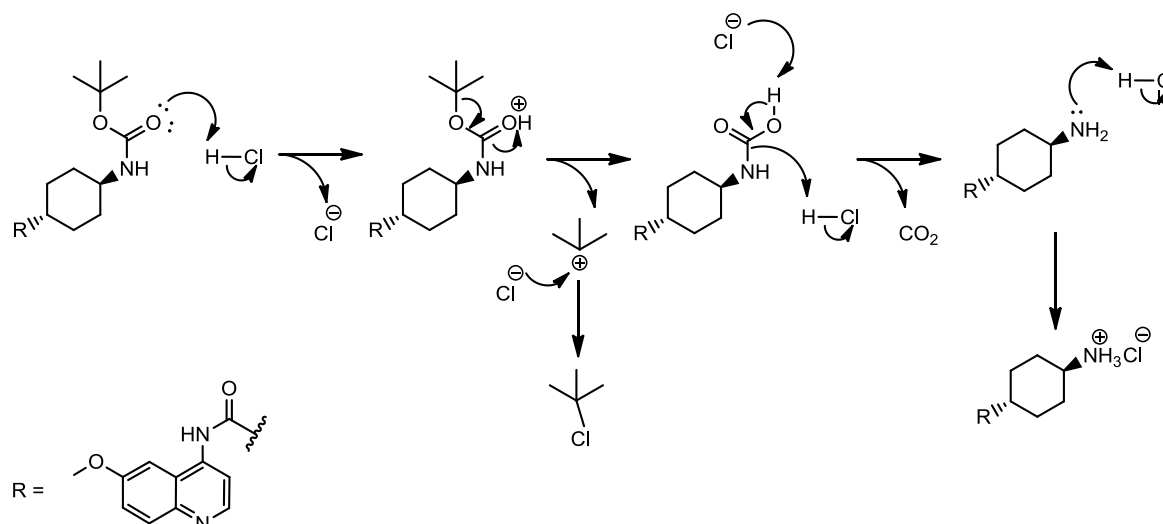
Kompetitivna vezava amida ali aril bromida na *in situ* tvorjeni katalizator Pd(BINAP) omogoča potek dveh katalitičnih ciklov, njun obseg pa določajo relativne koncentracije obeh reaktantov in njuna afiniteta do katalizatorja (43).



Slika 16: Shematski prikaz *in situ* tvorbe Pd(BINAP) katalizatorja in katalitičnih ciklov tvorbe vezi med aril bromidom in karboksamidom. Prirejeno po (38, 42, 43).

5.1.4 Razprava k selektivni odščiti zaščitne skupine Boc

Selektivno odstanitev zaščitne skupine Boc smo izvedli z 1 M raztopino HCl v očetni kislini. Odščita poteče po mehanizmu acidolize (44), kjer v prvem koraku poteče protoniranje karbamata, ki mu sledi izstop *t*-butilnega karbokationa kot dobre izstopajoče skupine in nastanek nestabilne karbaminske kisline. Ta v končni stopnji razpade do CO₂ in amina, ki se v kislem nahaja v obliki hidroklorida (45). Mehanizem predstavlja slika 17.



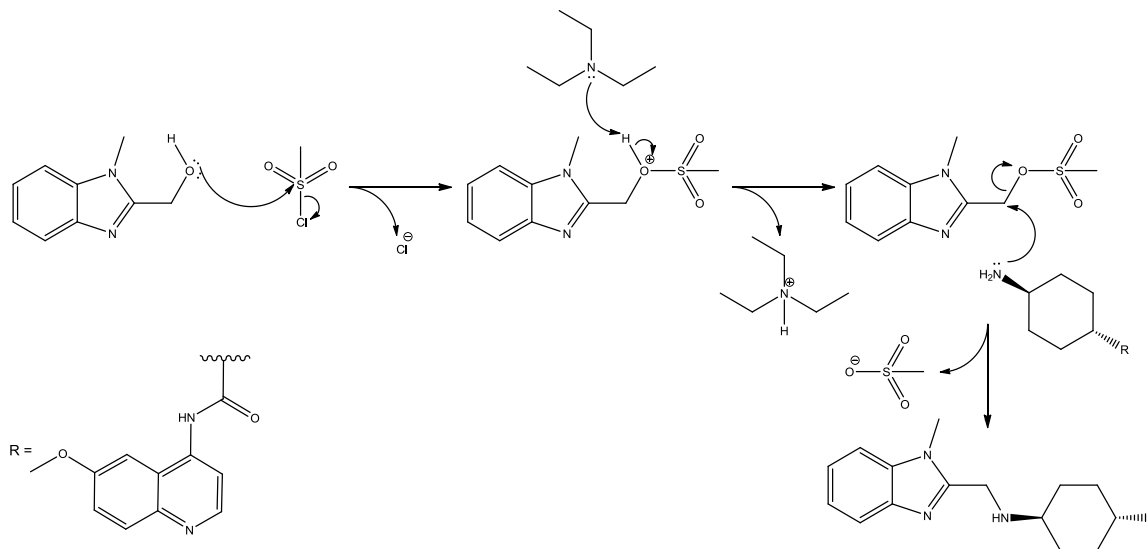
Slika 17: Mehanizem odščite zaščitne skupine Boc z uporabo HCl/AcOH. Prirejeno po (45).

Primarni amin smo do uporabe v naslednjih stopnjah sinteze, kjer smo uporabili amine v prosti obliki, shranjevali v obliki soli zaradi možne degradacije do N-oksidov na zraku (46).

5.1.5 Razprava k sintezi sekundarnega amina iz alkohola preko tvorbe metansulfona
Končno spojino **5** smo sprva poskusili sintetizirati preko reakcije reduktivnega aminiranja z uporabo spojine **4**, ustreznega dela RHS v obliki aldehida in NaCNBH₃ kot reducenta. Reakcija ni potekla do želenega produkta zaradi uporabe amina v obliki soli, ki bi ga bilo potrebno predhodno pretvoriti v prosto obliko ali v reakcijsko zmes dodati Et₃N, s čimer bi dosegli deprotoniranje amino skupine (47). NaCNBH₃ v nevtralnem mediju v vodi ali metanolu sicer reducira aldehide in ketone v zanemarljivem obsegu, vendar z zmanjšanjem pH poteče reakcija hitreje in pri pH 3 do 4 že doseže hitrost, ki je primerna za uporabo v sintezne namene (48). Z dodatkom AcOH smo dosegli dovolj majhen pH, da je čez noč potekla redukcija aldehida do alkohola. Da bi se izognili izgubam izhodne spojine, smo izolirani alkohol uporabili za sintezo končne spojine po sintezni poti, ki jo opisujemo v nadaljevanju (slika 18).

V prvem koraku smo s pretvorbo hidroksilne skupine v metansulfon povečali reaktivnost spojine **6** za nukleofilni napad, saj mezilat predstavlja dobro izstopajočo skupino v primerjavi s hidroksilno skupino. Z dodatkom Et₃N smo nevtralizirali HCl, ki nastaja med reakcijo, ter tako preprečili protoniranje alkohola in zmanjšali obseg stranskih reakcij (46, 49). V drugem koraku je potekla reakcija nukleofilne substitucije po mehanizmu S_N2 z nukleofilnim napadom amino skupine na elektrofilni ogljik in izstopom mezilata do tvorbe

sekundarnega amina. Et₃N smo v reakcijsko zmes dodali, da smo amin v ionizirani obliki pretvorili v prosto obliko in s tem povečali njegovo nukleofilnost.

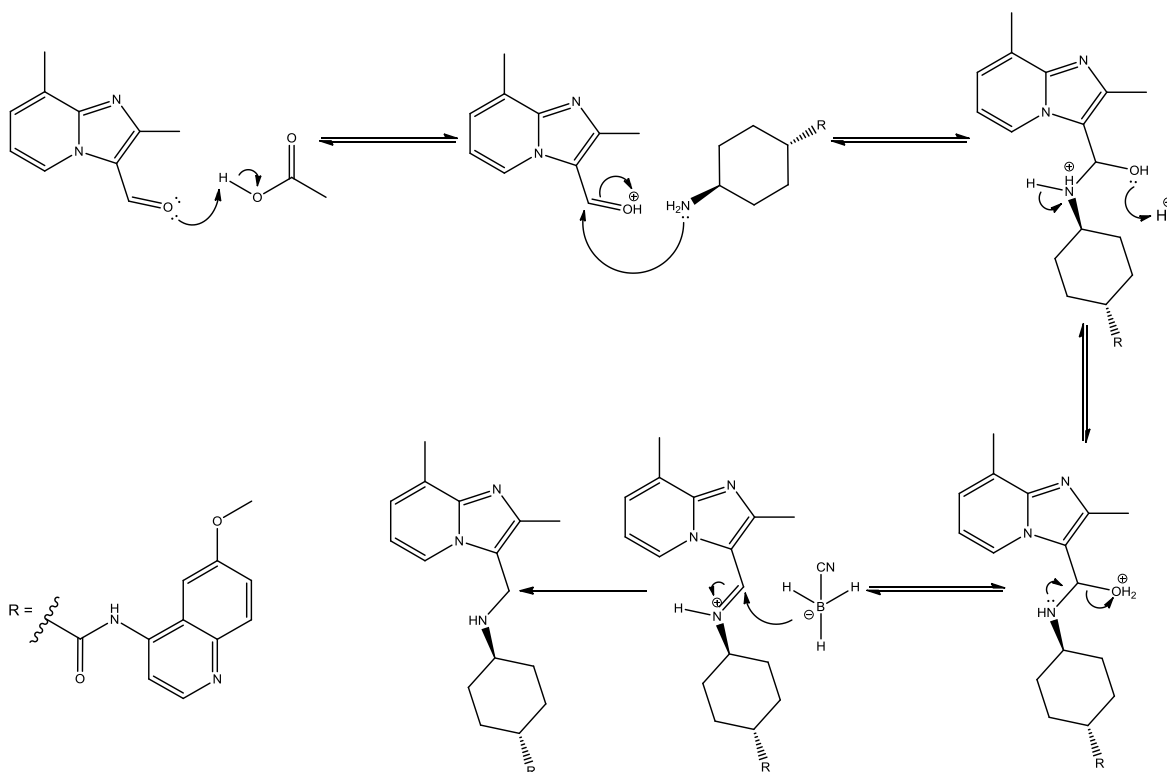


Slika 18: Mehanizem tvorbe sekundarnega amina iz alkohola, ki smo ga predhodno aktivirali za nukleofilni napad s pretvorbo v metansulfon. Prirejeno po (46).

5.1.6 Razprava k sintezi končnih spojin preko reakcije reduktivnega aminiranja
Končno spojino **5** smo nato ponovno poskusili sintetizirati preko reakcije reduktivnega aminiranja, vendar smo tokrat z dodatkom Et₃N poskrbeli, da smo protoniran amin pretvorili v prosto obliko. Kot reducent smo uporabili NaBH(OAc)₃, ki je zaradi dobre stabilizacije vezi B-H blag in relativno selektiven reagent za izvedbo reduktivnega aminiranja, saj je hitrost redukcije imina mnogo večja od hitrosti redukcije ketona ali aldehida. Dodatek AcOH pri uporabi aldehydov kot karbonilne zvrsti navadno ni potreben (47), zato ga v reakcijsko zmes nismo dodajali. Reakcija je tokrat potekla do želenega produkta preko mehanizma, ki ga opisujemo v nadaljevanju.

Z namenom povečanja izkoristka reakcije smo sintezo končne spojine **5** želeli dodatno optimizirati z uporabo predhodno pripravljene prostega amina. S spiranjem z nasičeno raztopino Na₂CO₃ smo ga pripravili neposredno pred uporabo, da smo se izognili razpadu (46). Iz literarnih podatkov o sintezi podobnih NBTI smo ugotovili, da je najbolj kritična stopnja reduktivnega aminiranja tvorba imina (22). Da bi olajšali tvorbo imina, smo reakcijsko zmes pred dodatkom reducenta segrevali 30 minut na 50 °C in jo nato takoj ohladili na ledeni kopeli, da smo upočasnili razpad imina. Izolacija imina bi bila alternativna možnost, vendar je to le redko mogoče, saj imini v splošnem niso dovolj stabilni za izolacijo (50).

Pri reakciji reduktivnega aminiranja najprej poteče reverzibilna tvorba imina, ki ji sledi nereverzibilna redukcija do ustreznega amina (51). V prvem koraku pride do protoniranja aldehida, kar poveča elektrofilnost karbonilnega ogljika. Sledi nukleofilni napad amina in 1,2-adicija na karbonilni ogljik. V naslednjem koraku pride do premestitve protona z amino skupine na hidroksilno skupino, ki se tako pretvori v dobro izstopajočo skupino. Sledi eliminacija molekule vode in nastanek protonirane oblike imina, ki se v končni nereverzibilni stopnji reducira do ustreznega amina (49, 52). Mehanizem reakcije predstavlja slika 19.



Slika 19: Mehanizem reakcije reduktivnega aminiranja, prikazan za tvorbo spojine **7**. Prirejeno po (49, 51, 52).

Končno spojino **7** smo sintetizirali po enakem postopku kot spojino **5** z reduktivnim aminiranjem. Uspeli smo izboljšati tudi izkoristek reakcije.

Z namenom zmanjšanja obsega redukcije aldehida smo v sintezi končne spojine **8** ponovno uporabili NaCNBH₃, ki je bolj blag in selektiven reducent za redukcijo iminov v prisotnosti karbonilnih zvrsti kot NaBH₄, ter ga poleg NaBH(OAc)₃ najpogosteje uporabljamo za reduktivno aminiranje (53, 54). Mehanizem reakcije prikazujemo na sliki 19. Glede na NMR produkta po izvedbi kolonske kromatografije so bili v zaostanku najverjetneje še vedno prisotni kompleksi z NaCNBH₃, zato smo zaostanek spirali z vodno

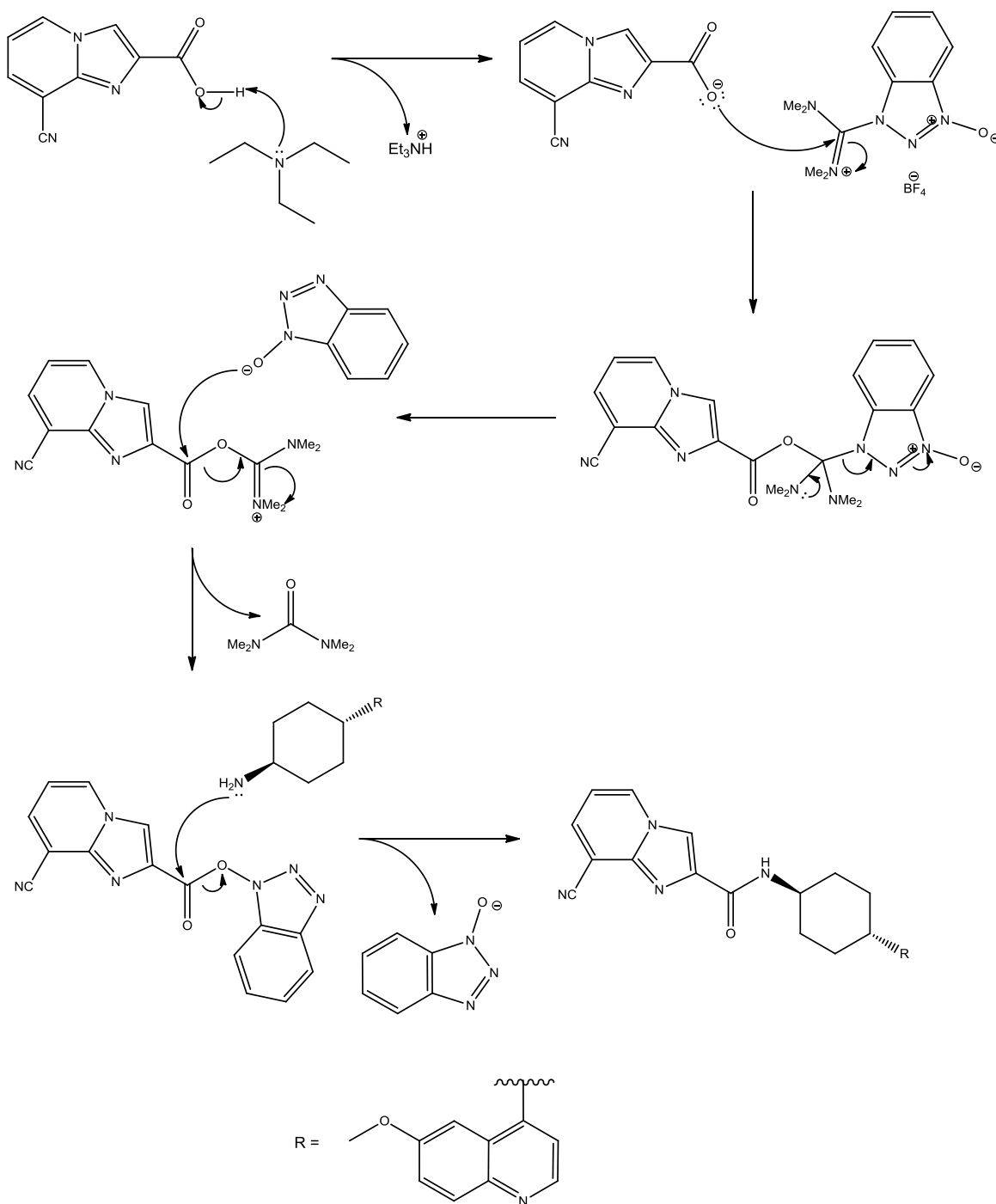
raztopino NaHCO_3 , ki je povzročila razpad kompleksov. Izkoristek reakcije je bil nizek, zato smo pri ponovni sintezi spojine **8** in spojine **9** spiranje z vodno raztopino NaHCO_3 izvedli pred kolonsko kromatografijo, vendar izkoristka nismo uspeli bistveno povečati.

5.1.7 Razprava k tvorbi amidne vezi z uporabo sklopitvenega reagenta TBTU

V zadnjem koraku sinteze končne spojine **10** smo tvorili amidno vez med delom RHS in fragmentom LHS-distančnik. Direktne kondenzacije med karboksilno kislino in aminom, pri čemer nastaja kot stranski produkt samo ekvivalent vode, se le redko poslužujemo, saj ta zaradi tvorbe soli med reaktantoma poteče le pod zelo ostrimi razmerami, kot so denimo visoka temperatura in segrevanje z mikrovalovi (55).

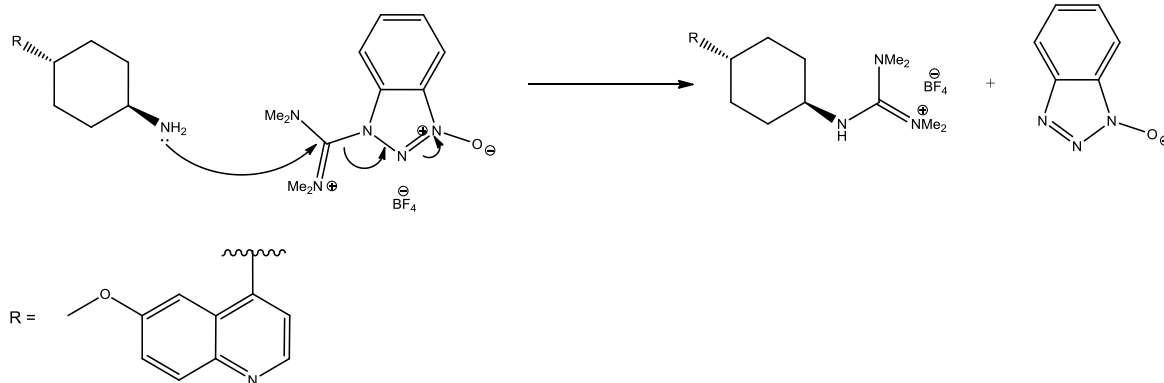
Z namenom olajšanja tvorbe amidne vezi uporabljamo t. i. sklopitvene reagente, ki aktivirajo karboksilno kislino tako, da je ta bolj dovzetna za nukleofilni napad amina (56), kar dosežemo s pretvorbo kisline v kislinske kloride, acilazide, acilimidazole, (mešane) anhidride, karbonilne anhidride ali aktivirane estre (57, 58). Pri sintezi spojine **10** smo kislino aktivirali preko tvorbe aktiviranega estra, za dosego česar smo uporabili TBTU, sklopitveni reagent iz skupine uronijevih soli. Mednje spada tudi njegov strukturni analog HBTU s heksafluorofosfatom namesto tetrafluoroborata kot anionom, vendar izbira protiiona nima značilnega vpliva na hitrost sklopitve ali racemizacijo (56).

V reakcijsko zmes smo dodali še Et_3N , ki v prvem koraku deprotonira kislino. Sledi nukleofilni napad kislinskega aniona na molekulo TBTU, pri čemer se kislina pretvori v ester z dobro izstopajočo skupino. Pri tvorbi izstopi *1H*-benzotriazol-1-olatni anion, ki v naslednji stopnji nukleofilno napade karbonilni ogljik estra. Sprosti se tetrametilsečnina in nastane aktiviran ester HOBt. Sledi nukleofilni napad amino skupine na karbonilni atom aktiviranega estra HOBt do nastanka amida (55). Mehanizem reakcije prikazuje slika 20.



Slika 20: Mehanizem nastanka amidne vezi z uporabo sklopitvenega reagenta TBTU. Prirejeno po (55).

Pri uporabi uronijevih sklopitvenih reagentov tvegamo nastanek gvanidinijevih spojin, ki se tvorijo ob reakciji TBTU z aminom. Reakcija je sicer relativno počasna (56), dodatno pa smo se nastanku izognili z dodatkom amina šele po aktivaciji kisline do aktiviranega estra HOBt. Mehanizem nastanka neželenega produkta prikazuje slika 21.



Slika 21: Mehanizem nastanka gvanidinijevih spojin kot stranskih produktov pri uporabi uronijevih sklopitvenih reagentov. Prirejeno po (58).

5.1.8 Razprava k poskusu redukcije aldehida do alkohola z uporabo NaBH_4 in I_2
Za sintezo končne spojine **12** smo želeli fragment RHS v obliki karboksilne kisline najprej reducirati do ustreznega alkohola, nato pa sintetizirati končni amin preko pretvorbe v metansulfon, kot smo to storili že pri sintezi končne spojine **5**. Uporabili smo v literaturi opisan postopek z NaBH_4 in I_2 (59), s čimer smo se želeli izogniti sočasni redukciji ciano skupine pri uporabi močnejših reagentov, kot je NaBH_4 , vendar sinteza ni bila uspešna, zato smo to sintezno pot opustili.

6 Sklep

V okviru magistrske naloge smo uspešno sintetizirali nekaj končnih spojin razreda NBTI z novimi fragmenti RHS, ki naj bi se ustrezno sidrali v hidrofobni žep DNA giraze A.

Pripenjanje distančnika na del LHS smo uspešno izvedli z uporabo *in situ* tvorjenega katalizatorja Pd(BINAP) v reakciji, podobni Buchwaldovem aminiranju. Pripenjanje dela RHS smo izvedli po dveh sinteznih poteh. V prvi smo ustrezni alkohol najprej pretvorili v metansulfona ter nato v reakciji nukleofilne substitucije tvorili sekundarni amin, v drugi pa smo sekundarni amin sintetizirali iz aldehida in amina v reakciji reduktivnega aminiranja. Glede na izkoristek je bila druga strategija uspešnejša, vendar prve ne gre zanemariti, saj bi lahko služila kot pomoč pri sintezi podobnih NBTI. Največji izkoristek reduktivnega aminiranja smo dosegli s segrevanjem zmesi aldehida in amina do tvorbe imina pred dodatkom NaBH₄ kot reducenta. Kljub nadaljnjim poskusom povečanja izkoristka sinteze bi bila še vedno potrebna optimizacija nekaterih sinteznih stopenj, zlasti postopka izolacije končnih spojin v zadnji stopnji.

Od predvidenih končnih spojin nismo uspeli sintetizirati spojine **12**. Potrebno bi bilo izvesti tudi biološko testiranje na DNA girazi A za ovrednotenje aktivnosti sintetiziranih spojin. Le tako bo mogoče oceniti celokupno uspešnost načrtovanja in sinteze spojin, a kljub temu verjamemo, da bodo spojine služile kot dobro izhodišče za nadaljnje modifikacije in boljše razumevanje povezave med strukturo in delovanjem dela RHS.

7 Literatura

1. Cars O, Hedin A, Heddini A: The global need for effective antibiotics – Moving towards concerted action. *Drug Resistance Updates* 2011; 14: 68–69.
2. Alanis AJ: Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research* 2005; 36: 697–705.
3. Melander RJ, Melander C: The Challenge of Overcoming Antibiotic Resistance: An Adjuvant Approach? *ACS Infectious Diseases* 2017: objavljeno na spletu 26. maj 2017.
4. Jones CA, Davis JS, Looke DFM: Death from an untreatable infection may signal the start of the post-antibiotic era. *The Medical Journal of Australia* 2017; 206 (7): 292–293.
5. Coates ARM, Halls G, Hu Y: Novel classes of antibiotics or more of the same? *British Journal of Pharmacology* 2011; 163: 184–194.
6. Butler MS, Blaskovich MAT, Cooper MA: Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. *The Journal of Antibiotics* 2017; 70: 3–24.
7. Silver LL: Challenges of Antibacterial Discovery. *Clinical Microbiology Reviews* 2011; 24 (1): 71–109.
8. Brown ED, Wright GD: Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature* 2016; 529: 336–343.
9. Sanyal G, Doig P: Bacterial DNA replication enzymes as targets for antibacterial drug discovery. *Expert Opinion Drug Discovery* 2012; 7(4): 327–339.
10. Seol Y, Neuman KC: The dynamic interplay between DNA topoisomerases and DNA topology. *Biophys Rev* 2016; 8: 221–231.
11. Vos MS, Tretter ME, Schmidt HB, Berger MJ: All tangled up: how cells direct, manage and exploit topoisomerase function. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 2011; 12(12): 827–841.
12. Majumder HK: *Topoisomerases*. Elsevier 2013; 78–79.

13. Bush G. N, Evans-Roberts K, Maxwell A: DNA Topoisomerases. *EcoSal Plus* 2015; 6(2): 1–34.
14. Wang CJ: Cellular Roles of DNA Topoisomerases: A Molecular Perspective. *Nature Reviews, Molecular Cell Biology* 2002; 3: 430–440.
15. Tomašić T, Peterlin Mašič L: Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 2014; 14: 130–151.
16. Collin F, Karkare S, Maxwell A: Exploiting bacterial Dna gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol* 2011; 92: 479–497.
17. Baker NM, Weigand S, Maar-Mathias S, Mondrago A: Solution structures of DNA-bound gyrase. *Nucleic Acids Research* 2011; 39 (2): 755–766.
18. Gubaev A, Klostermeier D: The mechanism of negative DNA supercoiling: A cascade of DNA-induced conformational changes prepares gyrase for strand passage. *DNA Repair*, 2014; 16: 23–34.
19. Aldred KJ, Kerns RJ, Osheroff N: Mechanism of Quinolone Action and Resistance. *Biochemistry* 2014; 53: 1565–1574.
20. Fabrega A, Madurga S, Giralt E, Vila J: Mechanism of action of and resistance to quinolones. *Microbial Biotechnology* 2009; 2 (1): 40–61.
21. Bax BD et al.: Type IIA topoisomerase inhibition by a new class of antibacterial agents. *Nature* 2010; 466: 935–940.
22. Surivet JP et al.: Novel Tetrahydropyran-Based Bacterial Topoisomerase Inhibitors with Potent Anti-Gram Positive Activity and Improved Safety Profile. *Journal of Medicinal Chemistry* 2015; 58: 927–942.
23. O'Riordana W et al.: Efficacy, Safety, and Tolerability of Gepotidacin (GSK2140944) in the Treatment of Patients with Suspected or Confirmed Gram Positive Acute Bacterial Skin and Skin Structure Infections. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2017; 61 (6): sprejet rokopis objavljen na spletu 3. aprila 2017. Dostopno na naslovu: <http://aac.asm.org/content/61/6/e02095-16.full>

24. Widdowson K, Hennessy A: Advances in structure-based drug design of novel bacterial topoisomerase inhibitors. *Future Med. Chem.* 2010; 2 (11): 1619–1622.
25. Lahiri SD, Kutschke A, McCormack K, Alm RA: Insights into the Mechanism of Inhibition of Novel Bacterial Topoisomerase Inhibitors from Characterization of Resistant Mutants of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2015; 59 (9): 5278–5287.
26. Singh SB et al.: Oxabicyclooctane-Linked Novel Bacterial Topoisomerase Inhibitors as Broad Spectrum Antibacterial Agents. *ACS Medicinal Chemistry Letters* 2014; 5: 609–614.
27. Miles et al.: Novel hydroxyl tricyclics (e.g., GSK966587) as potent inhibitors of bacterial type IIA topoisomerases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013; 23: 5437–544.
28. Basarab et al.: Responding to the challenge of untreatable gonorrhea: ETX0914, a first-in-class agent with a distinct mechanism-of-action against bacterial Type II topoisomerases. *Scientific report*, 2015; 5: 11827.
29. Kolarič A, Minovski N: Structure-based design of novel combinatorially generated NBTIs as potential DNA gyrase inhibitors against various *Staphylococcus aureus* mutant strains. *Molecular BioSystems* 2017: sprejet rokopis objavljen na spletu 23. maja 2017. DOI: 10.1039/C7MB00168A.
30. Miles et al. Novel cyclohexyl-amides as potent antibacterials targeting bacterial type IIA topoisomerases. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011; 21: 7483–7488.
31. Singh SB et al.: Structure activity relationship of substituted 1,5-naphthyridine analogs of oxabicyclooctane-linked novel bacterial topoisomerase inhibitors as broad-spectrum antibacterial agents (Part-4). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015; 25: 2409–2415.
32. Singh SB et al.: Hydroxy tricyclic 1,5-naphthyridinone oxabicyclooctane-linked novel bacterial topoisomerase inhibitors as broad-spectrum antibacterial agents-SAR of RHS moiety (Part-3). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2015; 25: 2473–2478.

33. Reck et al.: Novel N-Linked Aminopiperidine Inhibitors of Bacterial Topoisomerase Type II with Reduced pKa: Antibacterial Agents with an Improved Safety Profile. *J. Med. Chem.* 2012; 55: 6916–6933.
34. Chen WY, Olsen RK: Synthesis of Di- and Tripeptides Containing 4-Aminocyclohexanecarboxylic Acid. *J. Org. Chem.* 1975; 40(3): 350–352.
35. Axten JM, Daines RA, Davies DT, Gallagher TF, Jones GE, Miller WH, Pearson ND, Pendrak I: Antimicrobial Compounds, US 2010/0081650 A1. ZDA, datum objave: 1. 4. 2010.
36. Vilaivan T: A rate enhancement of tert-butoxycarbonylation of aromatic amines with Boc₂O in alcoholic solvents. *Tetrahedron Letters* 2006; 47: 6739–6742.
37. Surivet JP et al.: Design, Synthesis, and Characterization of Novel Tetrahydropyran-Based Bacterial Topoisomerase Inhibitors with Potent Anti-Gram-Positive Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2013; 56: 7396–7415.
38. Barfoot et al.: Flexible palladium-catalysed amidation reactions for the synthesis of complex aryl amides. *Tetrahedron Letters*, 2010; 51: 2685–2689.
39. Felix A et al.: Houben-Weyl Methods of Organic Chemistry: Synthesis of Peptides and Peptidomimetics, 4. izdaja. Thieme Verlagsgroupe, Nemčija, 2004: 585.
40. Wang W, McMurray JS: A Selective Method for the Preparation of Primary Amides: Synthesis of Fmoc-L-4-Carboxamidophenylalanine and other Compounds. *Tetrahedron Letters*, 1999; 40: 2501–2504.
41. Bailen MA, Chinchilla R, Dodsworth DJ, Najera C: Efficient synthesis of primary amides using 2-mercaptopyridone-1-oxide-based uronium salts. *Tetrahedron Letters*, 2000; 41: 9809–9813.
42. Wolfe JP, Buchwald SL: Scope and Limitations of the Pd/BINAP-Catalyzed Amination of Aryl Bromides. *J. Org. Chem.* 2000; 65 (4): 1144–1157.
43. Singh UK, Strieter ER, Blackmond DG, Buchwald SL: Scope and Limitations of the Pd/BINAP-Catalyzed Amination of Aryl Bromides. *J. Am. Chem. Soc.* 2002; 124: 14104–14114.

44. Bodanszky M, Bodanszky A: *The Practice of Peptide Synthesis*. Springer Verlag, Berlin, 1984: 196.
45. Lloyd-Williams P, Albericio F, Giralt E: *Chemical approaches to the synthesis of peptides and proteins*. Boca Raton: CRC Press, Florida, 1997: 22–23.
46. Wade LG: *Organic chemistry*, 8. izdaja. Pearson, ZDA, 2013: 879–938 in 467–512.
47. Abdel-Magid AF, Carson KG, Harris BD, Maryanoff CA, Shah RD: Reductive Amination of Aldehydes and Ketones with Sodium Triacetoxyborohydride. *Studies on Direct and Indirect Reductive Amination Procedures*. *J. Org. Chem.* 1996; 61: 3849–3862.
48. Borch RF, Bernstein MD, Durstlb HD: The Cyanohydrinborate Anion as a Selective Reducing Agent. *Journal of the American Chemical Society* 1971; 93 (12): 2897–2904.
49. Brown WH, Iverson BL, Anslyn A, Foote CS: *Organic Chemistry*, 7. izdaja. Cengage Learning, ZDA, 2013: 401–450.
50. Gomez S, Peters JA, Maschmeyer T: The Reductive Amination of Aldehydes and Ketones and the Hydrogenation of Nitriles: Mechanistic Aspects and Selectivity Control. *Adv. Synth. Catal.* 2002; 344 (10): 1037–1057.
51. Baxter EW, Reitz AB: Reductive Aminations of Carbonyl Compounds with Borohydride and Borane Reducing Agents. *Organic Reactions*, 2002; 59: 3–36.
52. Lie JJ: *Name Reactions: A Collection of Detailed Mechanisms and Synthetic Applications*, 5. izdaja. Springer, Nemčija, 2014: 66–67.
53. Carey FA, Sundberg RJ: *Advanced Organic Chemistry, Part B: Reactions and Synthesis*, 5. izdaja. Springer, ZDA, 2008: 367–472.
54. Walker ERH: The Functional Group Selectivity of Complex Hydride Reducing Agents. *Chemical Society Reviews*, 1976; 5: 23–50.
55. Dunetz JR, Magano J, Weisenburger GA: Large-Scale Applications of Amide Coupling Reagents for the Synthesis of Pharmaceuticals. *Org. Process Res. Dev.* 2016; 20: 140–177.

56. Han SY, Kim YA: Recent development of peptide coupling reagents in organic synthesis. *Tetrahedron*, 2004; 60: 2447–2467.
57. Valeur E, Bradley M: Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews*, 2009; 38: 606–631.
58. Montalbetti CAGN, Falque V: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 2005; 61: 10827–10852.
59. Kanth JVB, Periasamy M: Selective Reduction of Carboxylic Acids into Alcohols Using NaBH_4 and I_2 . *J. Org. Chem.*, 1991; 56 (20): 5964–5965.