

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



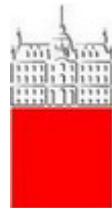
SARA BAVCON

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



SARA BAVCON

SINTEZA DERIVATOV 3,5-DISUBSTITUIRANEGA 1,2,4-OKSADIAZOLA KOT
POTENCIALNIH ZAVIRALCEV ČLOVEŠKE DNA TOPOIZOMERAZE II α

SYNTHESIS OF 3,5-DISUBSTITUTED 1,2,4-OXADIAZOLES AS POTENTIAL
INHIBITORS OF HUMAN DNA TOPOISOMERASE II α

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogu sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Andreja Perdiha, mag. farm.. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani ter na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani, načrtovanje spojin in testiranje encimske aktivnosti pa na Kemijskem inštitutu v Ljubljani.

Zahvala

Pravijo, da najpreprostejše zahvale pridejo iz srca.

Moja prva zahvala gre najprej prof. dr. Mariji Sollner Dolenc ter doc. dr. Andreju Perdihu za ponujeno zanimivo temo ter vso pomoč in nasvete pri izdelavi naloge.

Zahvala gre tudi Damijani Zalar, ki mi je nemalokrat priskočila na pomoč pri delu v laboratoriju. Kajti Bergant in Katji Valjavec za vse podatke, slike ter vso ostalo pomoč.

Vsem prijateljem, ki so me bodrili tekom študija in mi lepšali študijske dni.

Velika zahvala gre moji družini, ki mi je vsa leta omogočala nemoteno študiranje.

Jerneju, ki mi je pomagal pri številnih tehničnih podrobnostih ter me vzpodbujal in mi ves čas stal ob strani.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogu samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Andreja Perdiha, mag. farm..

Sara Bavcon

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Igor Locatelli, mag. farm.

Član komisije: izr. prof. dr. Simon Žakelj, mag. farm.

Kazalo

Kazalo slik	xi
Kazalo preglednic	xiii
Seznam uporabljenih okrajšav	xv
Povzetek	xvii
Abstract	xix
1. Uvod.....	1
1.1. Rak in rakava obolenja	1
1.2. Podvajanje DNA	3
1.3. Encimi družine DNA topoizomeraze	4
1.4. Tridimenzionalna struktura človeške DNA topoizomeraze II α	7
1.5. Katalitični cikel topoizomeraze II α	8
1.6. Vezavno mesto za ATP človeške topoizomeraze II α	9
1.7. Zaviralci človeške topoizomeraze II α	10
1.7.1. Topoizomerazni strupi	11
1.7.2. Katalitični zaviralci topoizomeraze II α	13
1.8. Cikel načrtovanja učinkovin	14
2. Namen dela	17
2.1. Reakcijska shema spojin	21

3. Materiali in metode	23
3.1. Materiali	23
3.1.1. Reagenti in topila.....	23
3.1.2. Laboratorijska oprema	23
3.2. Metode	24
3.2.1. Kromatografske metode.....	24
3.2.2. Spektroskopske metode	25
3.2.3. Določanje tališča.....	26
3.2.4. Uporaba računalniških programov.....	26
3.2.5. Biološko testiranje spojin: ovrednotenje topo II α zaviralne aktivnosti	26
3.2.6. Izbor dodatnih komercialno dostopnih analogov 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov	28
3.2.7. Molekulsko sidranje aktivne spojine 4 v vezavno mesto za ATP človeške topo II α	29
4. Eksperimentalni del	31
4.1. Sinteza N-(3-cianofenil)acetamida (1).....	31
4.2. Sinteza N-(3-(N'-hidroksikarbamimidooil)fenil) acetamida (2)	32
4.3. Sinteza metil 3-((((3-acetamidofenil)(amino) metilen)amino)oksi)karbonil)benzoata (3)	33
4.4. Sinteza metil 3-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoata (4) .	34
4.5. Sinteza 3-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) benzojske kisline (5)	35
4.6. Sinteza metil 4-((((3-acetamidofenil)(amino) metilen)amino)oksi)karbonil)benzoata (6)	36
4.7. Sinteza metil 4-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoata (7) .	37
4.8. Sinteza 4-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzojske kisline (8)	38

4.9.	Sinteza N-(4-cianofenil)acetamida (9).....	39
4.10.	Sinteza N-(4-(N'-hidroksikarbamimidoil)fenil) acetamida (10)	40
4.11.	Sinteza metil 3-((((4-acetamidofenil)(amino) metilen)amino)oksi)karbonil)benzoata (11)	41
4.12.	Sinteza metil 3-(3-(4-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoata (12)	42
4.13.	Sinteza 3-(3-(4-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzojske kisline (13)	
	43	
4.14.	Sinteza metil 4-((((4-acetamidofenil)(amino) metilen)amino)oksi)karbonil)benzoata (14)	44
4.15.	Sinteza metil 4-(3-(4-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoata (15)	45
4.16.	Sinteza 4-(3-(4-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzojske kisline (16)	
	46	
5.	Rezultati in razprava	47
5.1.	Sinteza acetamidov 1 in 9	47
5.2.	Sinteza amidoksimov 2 in 10.....	48
5.3.	Sinteza O-aciliranih amidoksimov 3, 6, 11, 14.....	49
5.4.	Sinteza 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov 4, 7, 12, 15.....	50
5.5.	Hidroliza estrov in izolacija kislin 5, 8, 13, 16.....	51
5.6.	Rezultati biološkega testiranja spojin.....	53
6.	Sklep	63
7.	Literatura	65
8.	Priloga A.....	71

Kazalo slik

Slika 1. Dejavniki, ki omogočajo preoblikovanje normalnih celic v rakave (4).....	2
Slika 2. Vloga DNA topoizomeraz pri podvajanju DNA (10).....	4
Slika 3. Shematski prikaz topoloških sprememb, ki jih katalizirajo topoizomerazni encimi (14,15).5	
Slika 4. Poenostavljen shema delovanja encimov iz družine topoizomeraz I in II.	6
Slika 5. 3D modelna struktura človeške DNA topoizomeraze II α (levo) in shema strukture encima (desno) (24).	8
Slika 6. Katalitični cikel encima topoizomeraze II α (17).	9
Slika 7. Mesto za ATP v topo II α in pomembnejše interakcije z molekulo AMP-PNP (uporabljena dostopna kristalna struktura PDB: 1ZXM). Z modro so obarvane aminokisline, ki interagirajo z adeninskim delom ATP, z rdečo aminokisline, ki interagirajo s sladkorjem ter z zeleno tiste, ki interagirajo s fosfatnim delom.....	10
Slika 8. Shematski prikaz delovanja topoizomeraznih strupov (20).....	12
Slika 9. Nekateri predstavniki, ki zavirajo katalitični cikel topoizomeraze II α (14,17,26,34).	14
Slika 10. Prikaz poenostavljenega postopka odkrivanja novih zdravilnih učinkovin (29).	15
Slika 11. Shema predhodnega strukturno podprtga načrtovanja 3,5-disubstituiranih 1,2,4- oksadiazolov in načrtovane/izbrane spojine za sintezo.	18
Slika 12. Reakcijska shema 1 za sintezo 3,5-disubstituiranega 1,2,4-oksadiazolov.....	21
Slika 13. Reakcijska shema 2 za sintezo 3,5-disubstituiranega 1,2,4-oksadiazolov.....	22
Slika 14. Shematski prikaz principa testa določanja relaksacijske encimske aktivnosti topo II α v primeru aktivne spojine-zaviralca (42).	27
Slika 15. Načrtvani spojini narisani v e-molecules, za iskanje komercialno dostopnih strukturno podobnih podobnih derivatov.....	28
Slika 16. Shematski prikaz mehanizma nastanka acetamidov 1 in 9 (47).	47
Slika 17. Mehanizem reakcije za nastanek amidoksim (49).	48
Slika 18. Mehanizem nastanka O-aciliranih amidoksimov.	49
Slika 19. Strukture različnih položajnih izomerov oksadiazolov (50).	50
Slika 20. Mehanizem nastanka 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov (50).	51

Slika 21. Mehanizem saponifikacije/bazične hidrolize estra (47)	52
Slika 22. Izračunana vezavna konformacija sintetizirane spojine 4 iz razreda 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov s prikazanimi interkacijami v vezavnem mestu za ATP N-terminalne domene topo II α (uporabljena dostopna kristalna struktura PDB: 1ZXM). Z modro so obarvane aminokisline, ki interagirajo z adeninskim delom ATP v tej kristalni strukturi, z rdečo aminokisline, ki interagirajo s sladkorjem ter z zeleno tiste, ki interagirajo s fosfatnim delom.	58
.....	
Slika 23. Različni položaji substituentov na fenilnih obročih glede na oksadiazol. Z roza barvo sta označena kisik in dušik pri molekulah, kjer je bil položaj teh dveh atomov v oksadiazolu obrnjen (pri komercialno dostopnih spojinah).....	59
Slika 24. Primerjava sidrane vezavne konformacije spojine 4 in nehidrolizirajočega derivata ATP molekule (AMP-PNP) v vezavnem mestu za ATP človeške topoizomeraze II α (PDB: 1ZXM). Modro obavane aminokisline interagirajo z adeninskim delom AMP-PNP, rdeče s sladkornim in zelene predstavljajo segment aktivnega mesta, ki tvori interakcije s fosfatnimi skupinami.	61

Kazalo preglednic

Preglednica I: Najpogostejsa rakava obolenja pri moških in ženskah na svetovni ravni (2).....	1
Preglednica II: Razdelitev zaviralcev človeške DNA topoizomeraze II α (14).	11
Preglednica III: Rezultati biološkega testiranja z uporabo <i>in vitro</i> topo II α relaksacijskega testa spojin, ki so bile prvotno sintetizirane kot potencialni zavirci bakterijske DNA giraze in testirane na topo II α ter so služile za nadaljnje načrtovanje.	53
Preglednica IV: Rezultati biološkega zaviranja topo II α za sintetizirane spojine iz razreda 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov.	55
Preglednica V: Rezultati biološkega testiranja zaviranja topo II α izbranih komercialno dostopnih spojin.	56
Preglednica VI: Razdelitev družine encimov topoizomeraz (14,13).....	71
Preglednica VII: Nekatere izbrane zdravilne učinkovine iz skupine zaviralcev DNA topoizomeraz II (14).....	73

Seznam uporabljenih okrajšav

Okrajšava Pomen

AMP-PNP	adenozin 5'-(β,γ -imido)trifosfat
CDCl ₃	devteriran kloroform
DCC	dicikloheksilsečnina
DMSO-d ₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HR-MS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitvena konstanta
MF	mobilna faza
Mr	relativna molekulska masa
MS	masna spektroskopija
NMR	jedrska magnetna resonanca
PDB	baza proteinskih struktur (Protein Data Bank)
Rf	retencijski faktor
ROS	reaktivne kisikove spojine
SAR	odnos med strukturo in delovanjem (structure–activity relationship)
T	temperatura
TEA	trietilamin
TLC	tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
topo II α	človeška DNA topoizomeraza II α
δ	kemijski premik
WHO	svetovna zdravstvena organizacija (World Health Organization)

Povzetek

Rakava obolenja so eden izmed najpogostejših vzrokov smrti ter hkrati kompleksna bolezen z mnogimi faktorji, ki pogojujejo njen nastanek. Zato vseskozi poteka intenzivno raziskovanje novih zdravilnih učinkovin, ki bi učinkoviteje zdravila raznolika rakava obolenja. Uveljavljene tarče za zdravljenje raka so encimi iz družine topoizomeraz, ki sodelujejo pri sproščanju in uvajanju topoloških sprememb v molekulo DNA, ter so ključni za uspešno celično delitev in preživetje celic. Človeška DNA topoizomeraza II α s svojim kompleksnim katalitičnim ciklom omogoča različne pristope k zaviranju tega encima in posledično zaustavitvi rasti rakavih celic. Zaradi neželenih učinkov, predvsem kardiotoksičnosti nekaterih že znanih topoizomeraznih strupov v terapiji, so nove raziskave usmerjene v razvoj zaviralcev, ki bi delovali na druga, alternativna mesta v katalitičnem ciklu encima.

V nalogi smo na podlagi predhodno izvedenega struktурno podprtrega načrtovanja sintetizirali novo serijo zaviralcev človeške DNA topoizomeraze II α (topo II α), derivate 3,5-disubstituiranega 1,2,4-oksadiazola, za katero smo predpostavili interakcijo z vezavnim mestom za ATP na N-terminalni domeni encima. Kot izhodni spojini smo izbrali 3-aminobazonitril ter 4-aminobazonitril. Vse sintetizirane spojine smo ustrezno ovrednotili s pomočjo spektroskopskih metod in jim določili fizikalno-kemijske lastnosti. Pridobili smo tudi 7 komercialno dostopnih spojin, ki so struktурno podobne načrtovanim. 8 sintetiziranih spojin iz tega kemijskega razreda ter komercialno dostopne disubstituirane 1,2,4-oksadiazole smo preizkusili z uporabo *in vitro* topo II α relaksacijskega encimskega testa, da smo ovrednotili njihovo zaviralno delovanje in dobili prve informacije o odnosu med strukturo in delovanjem, ki so pomembne za nadaljnji razvoj.

5 spojin iz razreda 1,2,4-oksadiazolov je izkazalo zaviralno aktivnost z določenim IC₅₀ pod 1000 μ M, pri tem je najboljše rezultate pokazala spojina **4**, ki je imela IC₅₀ 140,2 μ M. To so tudi prve spojine iz tega kemijskega razreda, ki izkazujejo zaviralni učinek na človeško topoizomerazo II α . Na podlagi rezultatov sintetiziranih spojin ter komercialno dostopnih derivatov smo tako ugotovili, da je za zaviralni učinek najbolj ugodna meta-meta substitucija fenilnih obročev na mestih 3 in 5 1,2,4-oksadiazola, ter da končne spojine v

obliki estrov izkazujejo boljšo zaviralo aktivnost kot kisline. Ovrednotili smo tudi, kateri substituenti niso ugodni za interakcijo s predpostavljenim vezavnim mestom. Rezultati te naloge bodo uporabni pri nadaljnji optimizaciji disubstituiranih 1,2,4-oksodiazolov kot novega razreda zaviralcev človeške topoizomeraze II α s protirakovim delovanjem.

Ključne besede: topoizomeraza II α , protirakove učinkovine, 1,2,4-oksadiazol, načrtovanje učinkovin

Abstract

Cancer is one of the most common causes of death which is also a complex multifunctional illness with many factors that determine its occurrence. Therefore intensive research of new active substances is taking place, which could prove to be an effective drug for a variety of cancerous diseases present. Established targets used in the cancer treatment are enzymes from the family of the human DNA topoisomerases which are involved in the introduction of topological changes of the DNA molecule and are crucial for a successful cell division and cell survival. Human DNA topoisomerase II α with its complex catalytic cycle provides various approaches to enzyme inhibition and consequently stop the growth of cancer cells. Due to serious adverse effects, especially cardiotoxicity, of some of the established topo II α poisons used in therapy, new research is focused on the development of novel inhibitors that would act through alternative inhibition mechanisms in the complex catalytic cycle of this enzyme.

In this work based on the previously performed structure-based design a new series of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazole was synthesized to target the ATP binding site on the topo II α N-terminal domain and act as the human DNA topoisomerase II α inhibitors. 3-aminobenzonitrile and 4-aminobenzonitrile were selected as starting materials. All synthesized compounds were evaluated using spectroscopic methods and their physicochemical properties were determined. Additionally, 7 commercially available derivatives structurally similar to the designed compounds were obtained. 8 synthesized compounds from this chemical class and commercially available disubstituted 1,2,4-oxadiazoles were tested in the *in vitro* topo II α relaxation enzyme test to evaluate their inhibitory activity and obtain first information about the structure-activity relationship that would be important for further development.

5 compounds from the class 1,2,4-oxadiazoles showed initial inhibitory activity with a determined IC₅₀ values below 1000 μ M. Compound **4** proved to be the most promising having an IC₅₀ of 140.2 μ M. These compounds represent the first described compounds of this chemical class to exhibit an inhibitory effect on topoisomerase II α . After analysis of the structure-activity relationship (SAR) data it has been found that for the inhibitory

effect the most favorable position of the phenyl rings relative to the 1,2,4-oxadiazole skeleton is the meta-meta and that esters exhibited better inhibitory activity than corresponding acids. It was also evaluated which substituents are not favorable for the topo II α inhibitory activity. The results of our work will be useful in further optimization of the disubstituted 1,2,4-oxadiazoles as a new class of the human topoisomerase II α inhibitors with potential anticancer activity.

Key words: topoisomerase II α , antitumor agents, 1,2,4-oxadiazole, drug design

1. Uvod

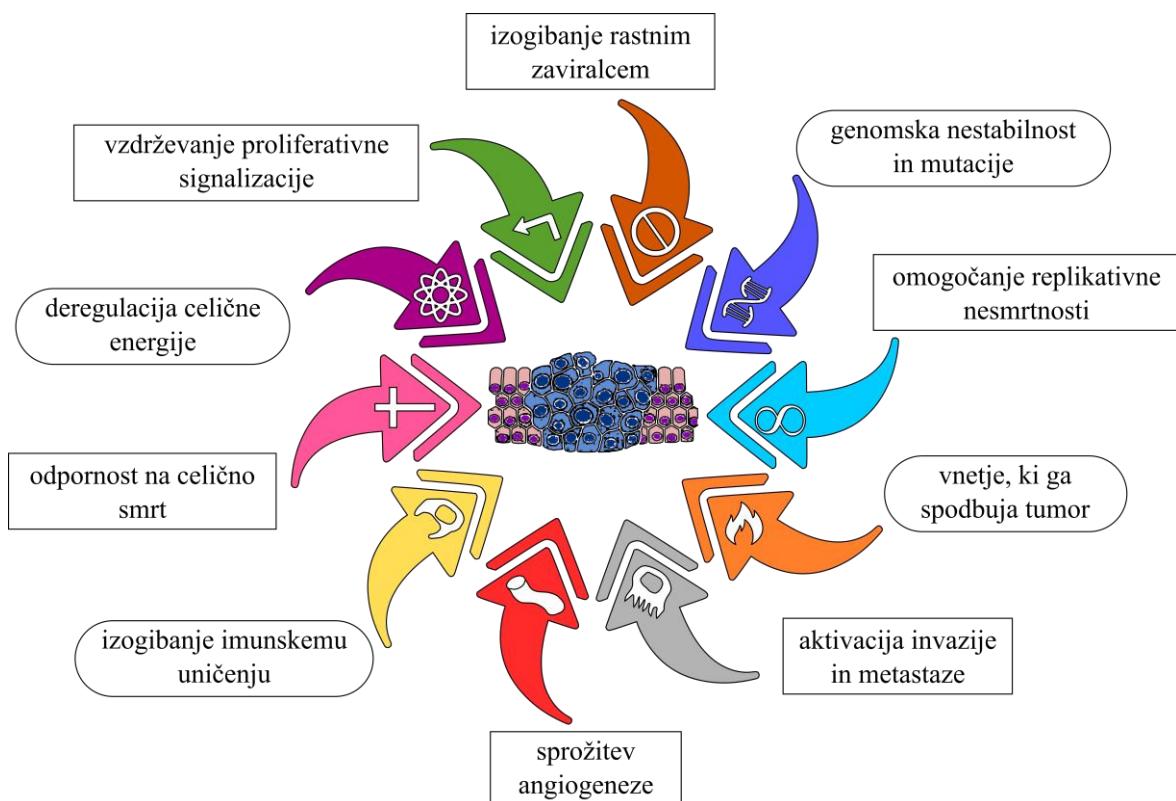
1.1. Rak in rakava obolenja

Rakava obolenja so pogosto bolezensko stanje in drugi najpogostejši vzrok smrti. Po podatkih svetovne zdravstvene organizacije (World Health Organization-WHO) je v letu 2015 približno 8,8 milijona ljudi umrlo zaradi rakavih obolenj in ocenjujejo, da je eden od šestih smrtnih izidov posledica teh obolenj (1). Projekcije za naslednja leta kažejo, da se bodo te številke le še povečevale. V **preglednici I** je navedenih 5 najbolj pogostih rakavih obolenj pri moških ter pri ženskah po svetu. Med najpogostejša rakava obolenja tako sodijo rak pljuč (16,7 %), rak prostate (15,0 %) ter rak debelega črevesa in danke (10,0 %) pri moški populaciji, pri ženskah pa se najpogosteje pojavlja rak dojk (25,2 %), rak debelega črevesa in danke (9,2 %) ter rak pljuč (8,7 %) (2).

Preglednica I: Najpogostejša rakava obolenja pri moških in ženskah na svetovni ravni (2).

NAJPOGOSTEJŠA RAKAVA OBOLENJA	
MOŠKI ♂	ŽENSKE ♀
Rak pljuč	Rak dojk
Rak prostate	Rak debelega črevesa in danke
Rak debelega črevesa in danke	Rak pljuč
Rak želodca	Rak materničnega vratu
Rak jeter	Rak želodca

Čeprav je rak multifunkcijska bolezen, je za vse vrste raka značilnih nekaj skupnih lastnosti, ki omogočajo preoblikovanje normalnih celic v rakave, kar je shematsko prikazano na **sliki 1**. Te lastnosti oz. znaki so najprej zmožnost stimuliranja svoje rasti in upiranje inhibitornim signalom, ki bi lahko zaustavili to nekontrolirano rast ali celo izogibanje programirani celični smrti. Za svojo rast rakave celice ne potrebujejo hormonov in drugih signalnih molekul, kot jih potrebujejo zdrave celice, saj jih proizvedejo same, lahko trajno aktivirajo signalne poti ali pa uničijo stikala, ki nadzorujejo prekomerno izražanje teh signalov. Hkrati rakave celice nimajo kontaktne inhibicije in spremenijo gene, ki zavirajo tumorje, da ti ne opravljam več svoje naloge efektivno in se celice lahko množijo, tudi na račun spremenjenega mehanizma za zaznavanje napak, ki bi vodile v apoptozo (3).



Slika 1. Dejavniki, ki omogočajo preoblikovanje normalnih celic v rakave (4).

Lastnost praktično vseh rakavih celic je zelo hitra in nekontrolirana celična delitev, pri kateri sodelujejo različni encimi. Rakave celice se lahko neomejeno razmnožujejo, saj zaobidejo oviro nadzorovanega razmnoževanja z manipulacijo encimov, ki povečujejo

dolžino telomer, slednje so v zdravih celicah odgovorne za ustavitev podvajanja. Ko postanejo le-te premajhne, se nerakave celice nehajo deliti. Rakave celice izločajo različne tumorske angiogenetske dejavnike, ki celo omogočijo tvorbo novih krvnih žil (angiogeneza) za boljšo preskrbo rakavega tkiva s kisikom in hranili. Rakave celice so tudi sposobne uničiti lokalno tkivo in se širiti na druga področja v organizmu (metastaziranje). Gre za večstopenjski proces, ki se začne z lokalno invazijo celic v okoliška tkiva, nato sledi prodor v krvne žile, kroženje po žilnem sistemu, konča pa se z novo delitvijo rakavih celic v drugem tkivu (3). Razvijejo lahko tudi nove nestandardne metabolne poti in so sposobne zaobiti kontrolo imunskega sistema. Njihov genom je večinoma nestabilen in celo posamezna vnetja, ki jih te celice povzročijo, lahko pospešijo nastanek tumorja (4). Za zdravljenje rakavih obolenj tako uporabljam več različnih načinov: kirurško zdravljenje, obsevanje (radioterapija) ter zdravljenje z zdravili: hormonsko, citostatsko (kemoterapija) in biološko zdravljenje (imunoterapija), tarčna zdravila in še gensko terapijo (5). Prav tako igrajo pomembno vlogo tudi preventivni programi, ki omogočajo učinkovito zgodnjo identifikacijo rakavih obolenj (6).

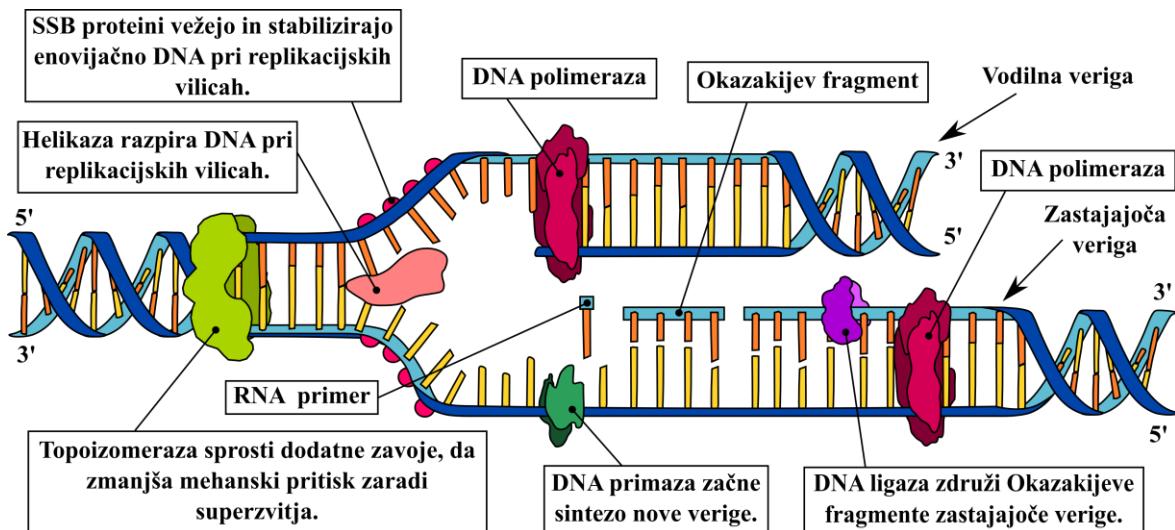
Da bi zaustavili rast tumorjev, je zelo uporaben pristop, da celicam preprečimo njihovo delitev. Obstaja več načinov, kako to lahko dosežemo in večina temelji na poznavanju mehanizma replikacije genetskega materiala in encimov, ki pri tem sodelujejo; pomembna skupina encimov pri podvajjanju DNA je tudi družina DNA topoizomeraz, ki je že znana tarča za nekatera protitumorna zdravila (7).

1.2. Podvajanje DNA

Vpletanje v podvajanje DNA je eden izmed načinov za zdravljenje rakavih obolenj, saj na ta način preprečimo hitro celično rast. Shematsko je ta proces prikazan na **sliki 2**.

Proces podvajanja se prične na točno določenem delu DNA, pri tem encim helikaza razpre dvojno vijačnico in na ta način omogoči, da DNA polimeraza začne s sintezo nove verige. Pri tem sodelujejo tudi drugi encimi, najprej DNA primaza ter nato DNA ligaza, ki združuje Okazakijeve fragmente zastajajoče verige, ter SSB proteini, ki vežejo in stabilizirajo enovijačno DNA pri replikacijskih vilicah. Pri odpiranju DNA verige in potovanju encimov proti replikacijskim vilicam prihaja tako do dodatnega zvitja DNA

molekule (t.i. superzvitja) (8). To je struktura DNA, ki se zaradi povečanega pritiska pri delnem odprtju zvije okoli lastne osi in tako omogoči večje število zavojev. V primeru zvitja v enaki smeri kot so zavoji DNA, gre za pozitivno zvitje, pri negativnem zvitju pa se veriga DNA dodatno zvija v nasprotni smeri zavojev dvojne vijačnice (8,9). To dodatno zvitje DNA vodi do povečanja mehanskega pritiska v DNA molekuli. Ta proces bi lahko zaustavil podvajanje, zato je potrebna prisotnost encima topoizomeraze (8).



Slika 2. Vloga DNA topoizomeraz pri podvajanju DNA (10).

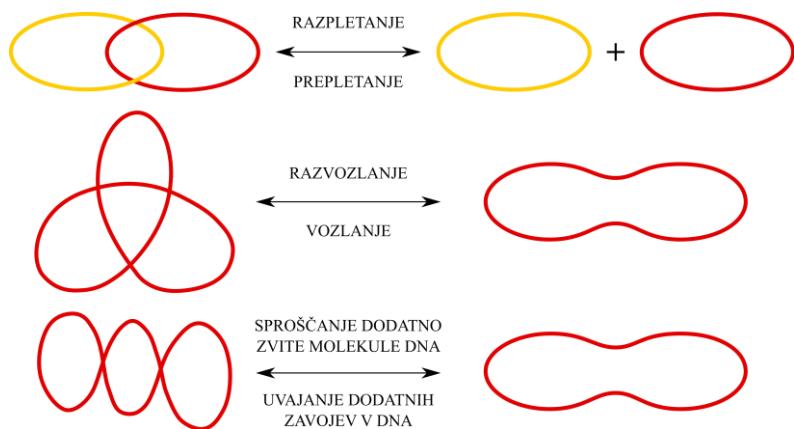
Kot lahko vidimo iz **slike 2**, je ta encim odgovoren za zmanjšanje mehanskega pritiska, ki nastane v molekuli zaradi dodatnega zvitja DNA molekule, ki je posledica odpiranja DNA verige in potovanja replikacijskih encimov pred replikacijskimi vilicami (11).

1.3. Encimi družine DNA topoizomeraze

DNA topoizomeraze so pomembna družina encimov, ki sodelujejo pri sproščanju in uvajanju topoloških sprememb v molekulo DNA, ter so ključne za uspešno celično delitev in preživetje celic (7).

Ti encimi lahko pretvarjajo različne topološke oblike DNA, razpletajo oz. prepletajo dvoverižno DNA, razvzljajo oz. vozljajo ter sproščajo dodatno zvite molekule DNA ali pa uvajajo nove dodatne zavoje v molekulo ter na ta način rešujejo topološke probleme, ki nastanejo pri replikaciji, transkripciji, rekombinaciji ter remodeliranju kromatina. Vsi ti

procesi lahko potekajo s prehodom segmenta ene verige dvooverižne DNA skozi drugo (12,13). Shematsko so ti topološki procesi prikazani na **sliki 3**. Če sta molekuli med sabo prepleteni (ang. catenation), jih bo encim razpletel (ang. decatenation). Prav tako bo to naredil v primeru, ko je molekula DNA zavozljana (ang. knotting), saj jo encim razvozla (ang. unknotting). V primeru dodatno zvite DNA molekule pa topoizomeraza odstrani dodatne zavoje (ang. relaxation of supercoiling), tako da lahko le-ta nadaljuje podvojevanje.

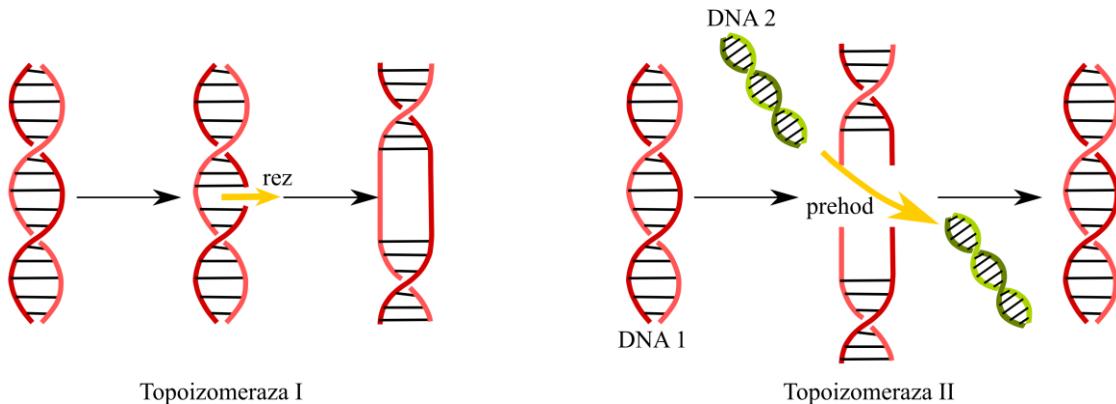


Slika 3. Shematski prikaz topoloških sprememb, ki jih katalizirajo topoizomerazni encimi (14,15).

Družino encimov DNA topoizomeraz lahko nadalje razdelimo na več družin in poddružin na podlagi njihove homologije in mehanizma delovanja. Razlike v družini encimov topoizomeraz so tudi v aminokislinskem zaporedju, organizmih, iz katerih so bili encimi izolirani ter mehanizmih cepitev (14,13). Podrobno so vse družine encimov predstavljene v **preglednici VI v prilogi**.

Glede na to ali topoizomeraze cepijo eno verigo DNA ali obe, jih razdelimo v dve veliki skupini: topoizomeraze tipa I in topoizomeraze tipa II. Prve cepijo tako le eno verigo molekule DNA, medtem ko topoizomeraze II cepijo obe verigi. Topoizomeraze tipa I prekinejo eno verigo DNA in s tem omogočijo prehod druge verige skozi nastalo odprtino ter nato ponovno združijo oba prosta konca prve verige. Dvojna vijačnica se tako na tem delu odvije, posledica tega je eno dodatno zvitje molekule DNA manj (13). Shematsko sta procesa topoizomeraze I in topoizomeraze II prikazana na **sliki 4**. Za razliko od topoizomeraz tipa I, topoizomeraze tipa II prekinejo oba dela dvojnovidne DNA in s tem

omogočijo prehod druge dvojnovidne DNA skozi nastalo odprtino. Bolj podrobno opisujemo katalitični cikel topoizomeraz II v poglavju **1.5** (13).



Slika 4. Poenostavljena shema delovanja encimov iz družine topoizomeraz I in II.

Topoizomeraza preko nukleofilne interakcije hidroksi skupine tirozinskega ostanka s fosfatno skupino v slatkorno-fosfatnem ogrodju dvojerižne DNA omogoči njeno odprtje in sprostitev dodatnih zavojev z omogočenim potovanjem druge verige DNA skozi nastalo odprtino. Reakcija je reverzibilna in zaporedje DNA tako med katalizo ostane nespremenjeno, molekula DNA ima le novo konformacijo, ki je izomer prejšnje. Ta princip delovanja, spremjanje topologije DNA, je dal tudi ime tej družini encimov (15).

Encimi prve skupine (topoizomeraze I) za svoje delovanje ne potrebujejo molekule ATP, medtem ko je delovanje topoizomeraz II odvisno od hidrolize energijskih molekul ATP (7). Topoizomeraze I razdelimo na tipe IA, IB in IC glede na način vezave encima med katalizo, če se pritrditev zgodi na 5'-fosfatu, pripada poddržini IA, če pa se zgodi na 3'-fosfatu, encim pripada poddržini IB (16). Topoizomeraza IA za svoje delovanje potrebuje magnezijeve ione ali druge katione in lahko sprosti le negativne dodatne zavoje, za razliko od encima IB, ki za svoje delovanje ne potrebuje kationov ter sprosti tako negativne kot pozitivne dodatno zvite molekule DNA. Tipu IB je funkcionalno podobna podskupina IC, ki jo trenutno sestavlja le topoizomeraza V, slednja je neodvisna od kovin ter sprosti dve dodatno zviti molekuli DNA, tako pozitivno kot negativno dodatno zvito DNA (17).

V drugo skupino encimov uvrščamo topoizomeraze tipa II, ki jih na podlagi strukture in zaporedja razdelimo na dve podskupini IIA in IIB. Topoizomeraze II so encimi, ki so ključni za nemoteno delovanje vseh celic, za npr. uspešno segregacijo kromosomske DNA

po podvajanju DNA in pred razdelitvijo celic (18). Pri ljudeh in sesalcih se topoizomeraza II pojavlja v dveh izoblikah: α in β . Obe izobliki imata skupno aminokislinsko zaporedje v visokem deležu (70 % ujemanje), vendar pa sta genska zapisa v dveh različnih genih (7,19). Zato se izražata specifično v tkivih, kar jima daje velik potencial za načrtovanje protirakovih učinkovin. Oblika alfa topoizomeraze II je bolj izražena v hitro delečih se celicah, ima večjo vlogo pri podvajanju DNA. Oblika beta topoizomeraze II je prisotna v enakih nivojih v mirujočih in hitro delečih se celicah, saj ima večjo sistemsko vlogo npr. pri transkripciji molekule DNA (20,21).

V skupino topoizomeraz IIA spada tudi bakterijska DNA giraza, ki je kot edina izmed te vrste encimov sposobna uvajati tudi negativne zavoje v molekulo DNA (15). Negativni zavoji omogočajo lažje odpiranje verige DNA, DNA giraza na ta način poskrbi, da je molekula DNA pod mehanskim pritiskom in na ta način omogoči energetsko ugodno odpiranje molekule DNA (8).

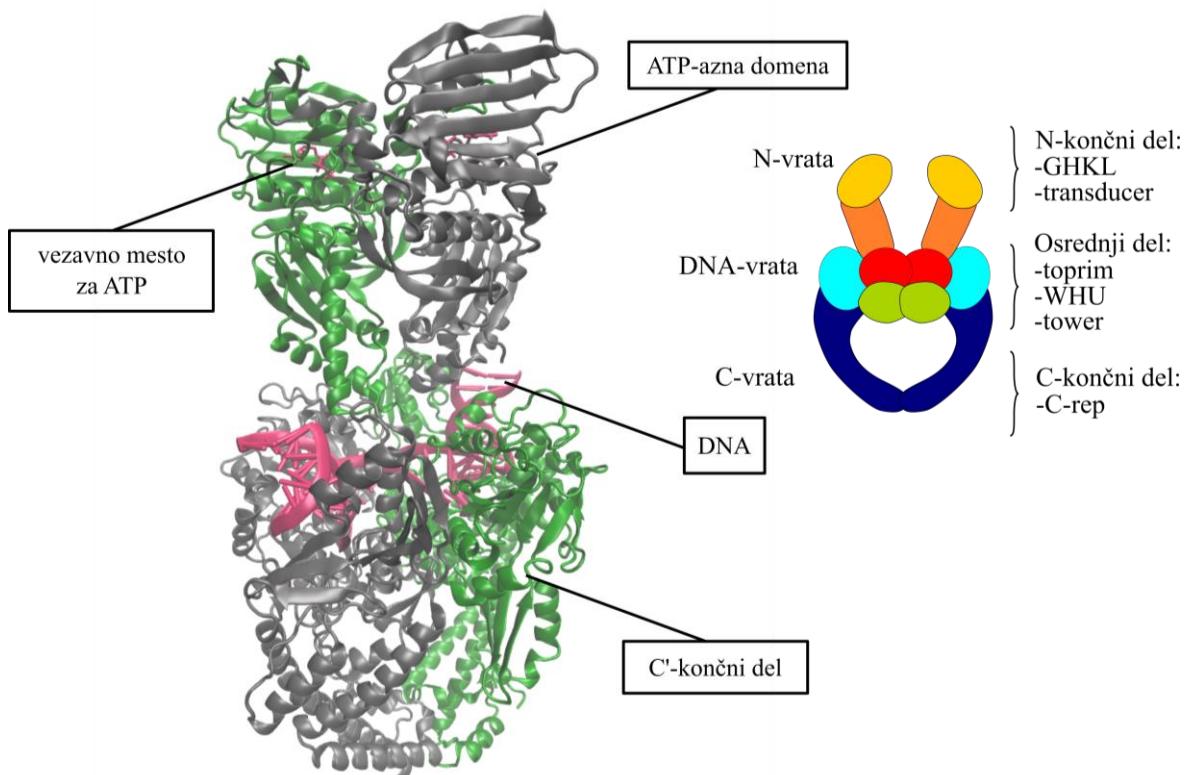
1.4. Tridimenzionalna struktura človeške DNA topoizomeraze II α

Evkariotske topoizomeraze II so veliki homodimerni encimi z molekulsko maso okoli 160-180 kDa. Kristalna struktura celotnega človeškega encima še ni bila rešena, so pa dostopne kristalne strukture posameznih delov, s pomočjo katerih lahko sestavimo popoln tridimenzionalni model s primerjavo dostopne kristalne strukture kvasne DNA topoizomeraze II iz *Saccharomyces cerevisiae*. Modelno strukturo lahko vidimo na **sliki 5**. Topoizomerazo lahko na podlagi homologije kvasne DNA topoizomeraze porazdelimo na tri različne proteinske domene: N-končno, centralno in C-končno (17,21).

N-končna proteinska domena oz. ATP-azna domena vsebuje vezavno mesto za ATP, ki spada v družino encimov GHKL (**giraza**, **Hsp90**, **histidin-kinaza** in **MutL** protein), ter t.i. transducer domeno. Na to domeno se veže ATP, ki nato hidrolizira in na ta način omogoča spremjanje položaja N-končnega dela oz. N-vrat (14,22).

Sledi osrednji del, kjer se nahajajo tri domene: toprom, WHD in tower. Na TOPRIM (**Topisomerase/Primase**) domeno se veže magnezijev (Mg^{2+}) ion ter skupaj z WHD (**winged helix domain**) domeno sodeluje pri odpiranju ter zapiranju vrat DNA ter s tem cepi molekulo DNA (14,23).

Nato pa še C-končni del, kjer se nahaja C-rep. Ta je del C-vrat, enega izmed treh funkcionalnih delov encima, ki se glede na katalitični cikel različno odpirajo oz. zapirajo, in omogočajo sprostitev DNA po končanem katalitičnem ciklu (14,17). Shematsko so zgoraj opisani deli encima predstavljeni na **sliki 5**.



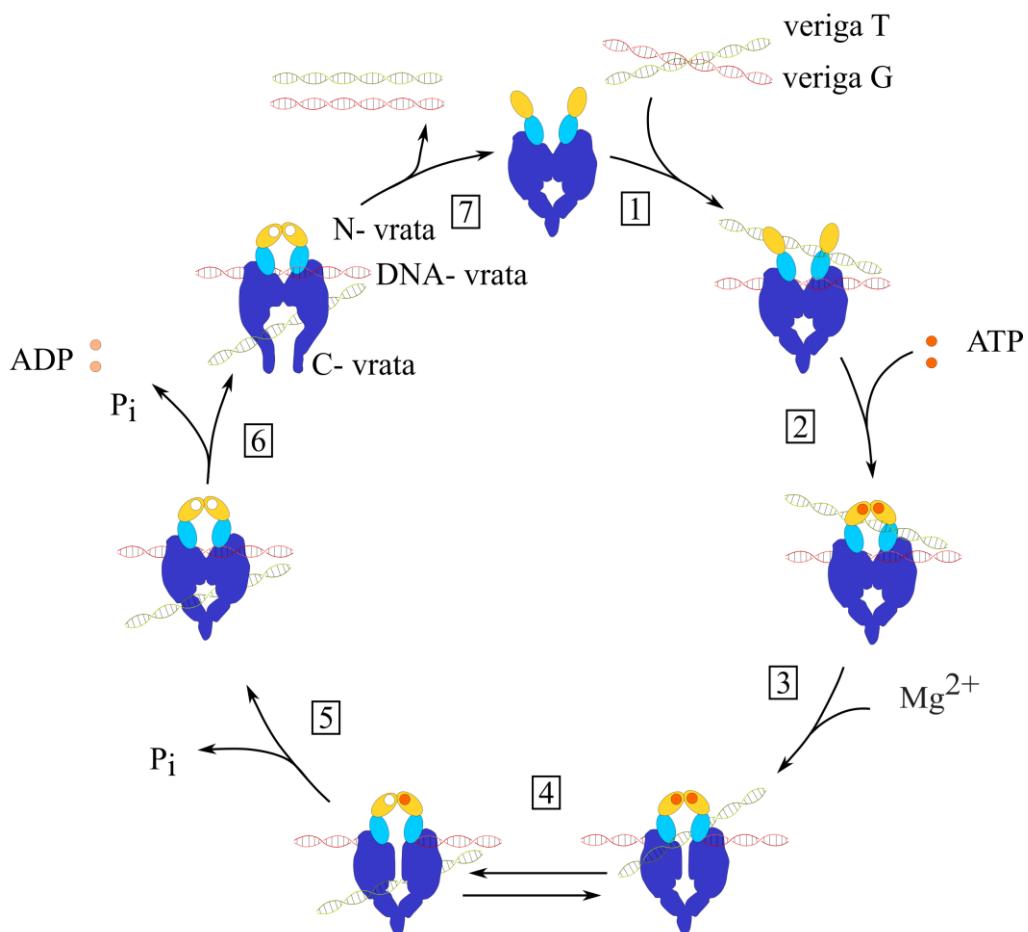
Slika 5. 3D modelna struktura človeške DNA topoizomeraze II α (levo) in shema strukture encima (desno) (24).

1.5. Katalitični cikel topoizomeraze II α

Topoizomeraze II delujejo preko kompleksnega večstopenjskega katalitičnega cikla, ki je prikazan na **sliki 6** (25).

Trenutno razumevanje procesa nakazuje, da se katalitični cikel sproži z vezavo prve dvovijačne molekule DNA (t.i. veriga G) na encim (na sliki označeno s št. 1). Temu sledi vezava dveh molekul ATP, ki sta povezani z dimerizacijo ATP-azne domene, na vsako domeno po en ATP, kar povzroči ujetje druge verige DNA (t.i. veriga T) v N-vratih (št. 2). V tretjem koraku sledi cepitev verige G, za kar topoizomeraza potrebuje magnezijeve ione,

ter nato prehod druge verige T skozi pravkar nastalo odprtino v DNA verigi G (št. 3 in 4). Peti korak cikla vodi do religacije verige G, pri tem poteče hidroliza ene ATP do ADP, slednje vodi do odprtja C-vrat. V predzadnjem koraku (št. 6) se C-vrata ponovno zaprejo, saj se predhodno veriga T sprosti iz encima. V zadnjem koraku (št. 7) katalitičnega cikla hidrolizira še druga molekula ATP, to vodi do odprtja N-vrat, sprostita se obe molekuli ADP ter veriga G. Topoizomeraza je tako ponovno pripravljena na naslednji cikel (14,17,25).

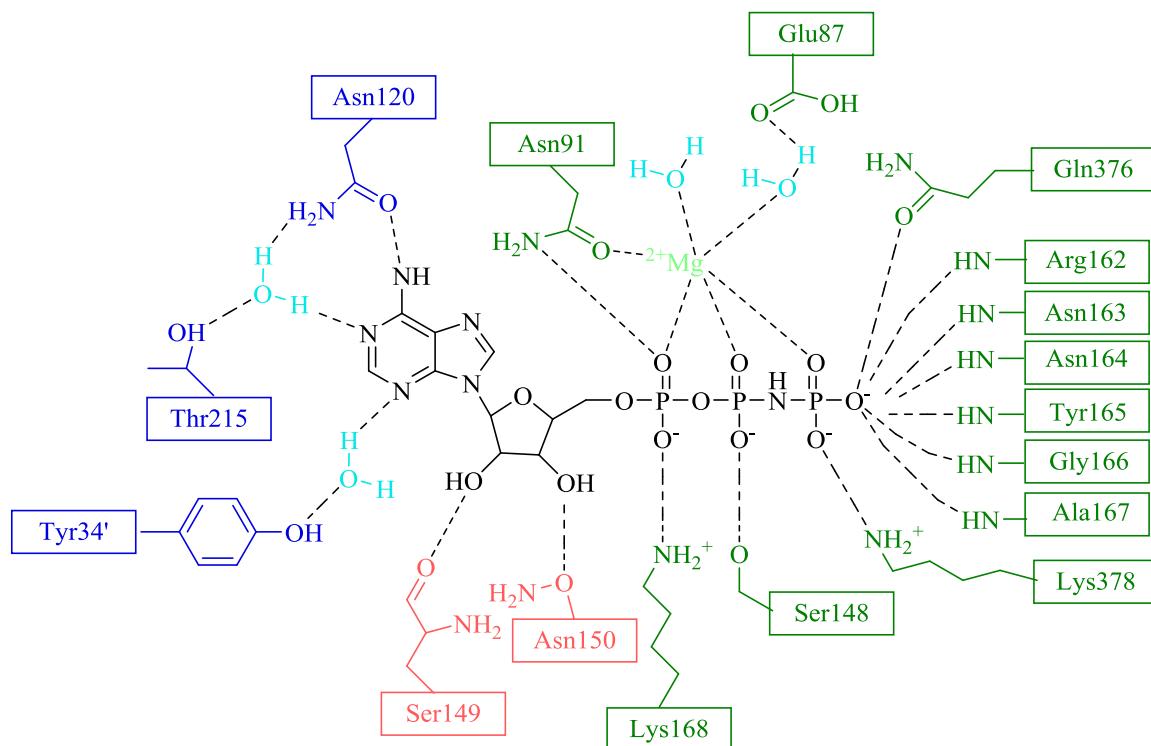


Slika 6. Katalitični cikel encima topoizomeraze II α (17).

1.6. Vezavno mesto za ATP človeške topoizomeraze II α

Vezava v aktivno mesto topo II α , kamor se veže energijska molekula ATP, je eden izmed novih pristopov, kje v katalitičnem ciklu lahko zaviramo delovanje te tarče. S pomočjo rešene kristalne strukture kompleksa ATPazne domene (26,28) smo lahko na primeru

molekule AMP-PNP (adenozin 5'-(β,γ -imido)trifosfat) analizirali, kakšne interakcije obstajajo med AMP-PNP in vezavnim mestom za ATP. S pomočjo programa LigandScout (27) smo tako identificirali sledeče interakcije, ki so prikazane na **sliki 7**. Topo II α tvori z adenozinskim delom molekule AMP-PNP interakcijo z aminokislinskim preostankom Asn120 ter preko vod z Asn120, Thr215, Tyr34 vodikove vezi. Aminokislini Ser148 in Ser149 tvorita interakcijo s slatkornim delom molekule, s fosfati pa interagirajo preostanki: Asn91, Asn150, Gln376, Lys378. Poleg teh interakcij pa fosfatni del molekule vstopa tudi v interakcijo z Mg²⁺ ionom preko koordinacijskih vezi (28,29).



Slika 7. Mesto za ATP v topo II α in pomembnejše interakcije z molekulo AMP-PNP (uporabljena dostopna kristalna struktura PDB: 1ZXM). Z modro so obarvane aminokisline, ki interagirajo z adeninskim delom ATP, z rdečo aminokisline, ki interagirajo s slatkorjem ter z zeleno tiste, ki interagirajo s fosfatnim delom.

1.7. Zaviralci človeške topoizomeraze II α

Učinkovine, ki zavirajo človeško topoizomerazo II α , so že uveljavljena zdravila v onkološki klinični praksi in se uporabljajo pri zdravljenju številnih oblik raka. Razdelimo

jih v dve skupini, kot je prikazano v **preglednici II**. V prvo skupino spadajo terapevtsko uporabne učinkovine, tako imenovani topoizomerazni strupi. V zadnjih letih pa se vedno bolj uveljavlja druga skupina zaviralcev topoizomeraz II α - katalitični zaviralci, predvsem zaradi nekaterih neželenih učinkov povezanih z uporabo topoizomeraznih stupov.

Preglednica II: Razdelitev zaviralcev človeške DNA topoizomeraze II α (14).

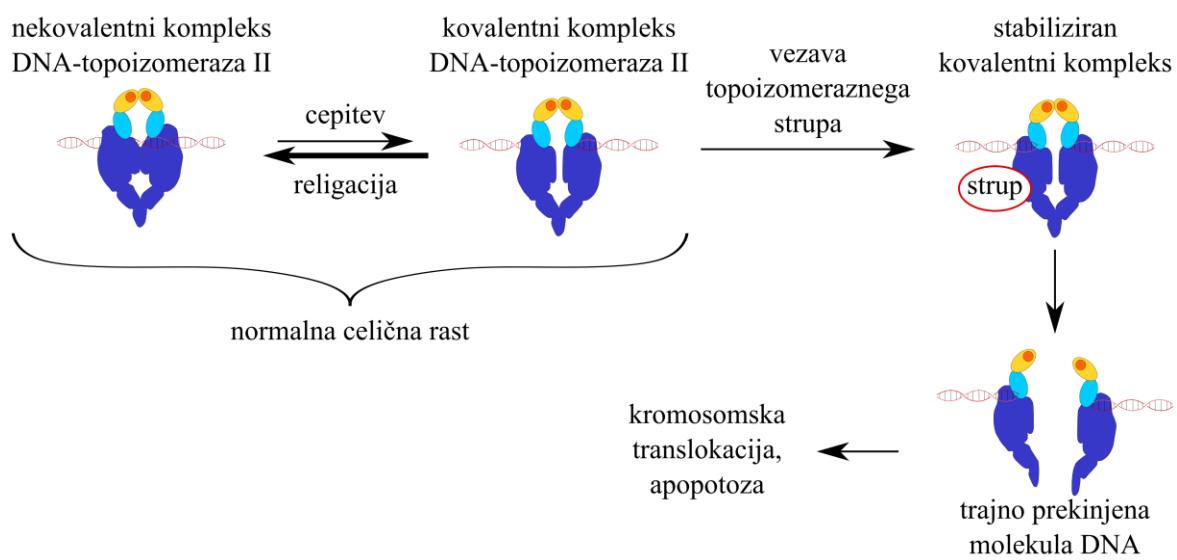
ZAVIRALCI ČLOVEŠKIH TOPOIZOMERAZ II α	
STRUPI	KATALITIČNI ZAVIRALCI
Nekovalentni	~ zaviranje cepitve DNA
~ interkalatorji	~ preprečitev vezave encima na DNA
~ neinterkalirajoči	~ vezava na vezavno mesto za ATP
Kovalentni	~ zaviranje hidrolize ATP

1.7.1. Topoizomerazni strupi

Celično smrt ta skupina molekul povzroči s podaljšano stabilizacijo kratkoživega kovalentnega kompleksa, ki se tvori med DNA in encimom, ki tako postane celični strup in povzroči apoptozo rakave celice (14,20). Kot je razvidno iz **preglednice II**, se topoizomerazni strupi delijo na dve veliki skupini: nekovalentne in kovalentne. Prva skupina se deli še na neinterkalirajoče strupe ter interkalatorje. Na **sliki 8** lahko vidimo, kako delujejo topoizomerazni strupi. Za uspešen potek katalitičnega cikla je kovalentni kompleks med DNA in topoizomerazo II zelo pomemben, vendar je prisoten v majhnih koncentracijah in relativno kratkotrajen. Ko nivo tega kompleksa naraste kot rezultat stabiliziranega kovalentnega kompleksa, se to odrazi v trajno prekinjeni molekuli DNA, kar posledično vodi do rekombinacije DNA in celične smrti ali pa kromosomske translokacije (20).

Neinterkalirajoči strupi stabilizirajo kovalentni kompleks z inhibicijo ligacije DNA. Najbolj znan neinterkalirajoči strup je etopozid, ki je polsintetski derivat spojine naravnega izvora podofilotoksina, izoliranega iz ščitastega majskega jabolka (*Podophyllum peltatum*) (30). Njegovo delovanje je zelo specifično, saj zavira celični cikel v predmitotični fazni, ko tvori trikomponentni kompleks z DNA in encimom topoizomerazo II α , ter posledično

povzroči prekinitve verige DNA. Ker se rakave celice delijo hitreje kot večina preostalih celic v organizmu, se tako prekinitve verige DNA odraži v apoptozi, celični smrti predvsem rakavih celic. Etopozid se uporablja v klinični praksi za zdravljenje več vrst raka: npr. raka testisov, raka pljuč, limfoma in akutne mieloične levkemije (30,31).



Slika 8. Shematski prikaz delovanja topoizomeraznih stupov (20).

Med interkalatorje (nekovalentne strupe) spada več registriranih učinkovin s planarno strukturo, ki jim omogoča vrivanje med bazne pare v vijačnici DNA. To so antraciklini in njihovi analogi. Antraciklinske učinkovine sicer izhajajo iz naravnih spojin, ki jih proizvajajo bakterije, a se zaradi prevelike toksičnosti ne uporabljajo protibakterijsko. Doksorubicin, idarubicin ter epirubicin, ki so predstavniki antraciklinov, se uporabljajo pri zdravljenju več vrst raka, predvsem za različne vrste levkemij (akutna limfoblastna levkemija, akutna mieloidna levkemija) (32). Mitoksantron, ki je tudi predstavnik interkalatorjev, pa se poleg zdravljenja levkemije in raka dojke uporablja tudi za zdravljenje multiple skleroze (14).

Kovalentni stupi zaenkrat še niso na voljo za zdravljenje rakavih obolenj, v to skupino spadajo kinonski metaboliti ter biflavonoidi. Delujejo tako, da kovalentno spremenijo encim, za to je potrebna sočasna prisotnost redoks reakcij za aktivacijo (npr. generiranja reaktivnih kisikovih zvrsti - ROS) (20).

V **preglednici VII v prilogi** so prikazani zgoraj našteti topoizomerazni strupi, ki se uporabljajo za zdravljenje v Sloveniji.

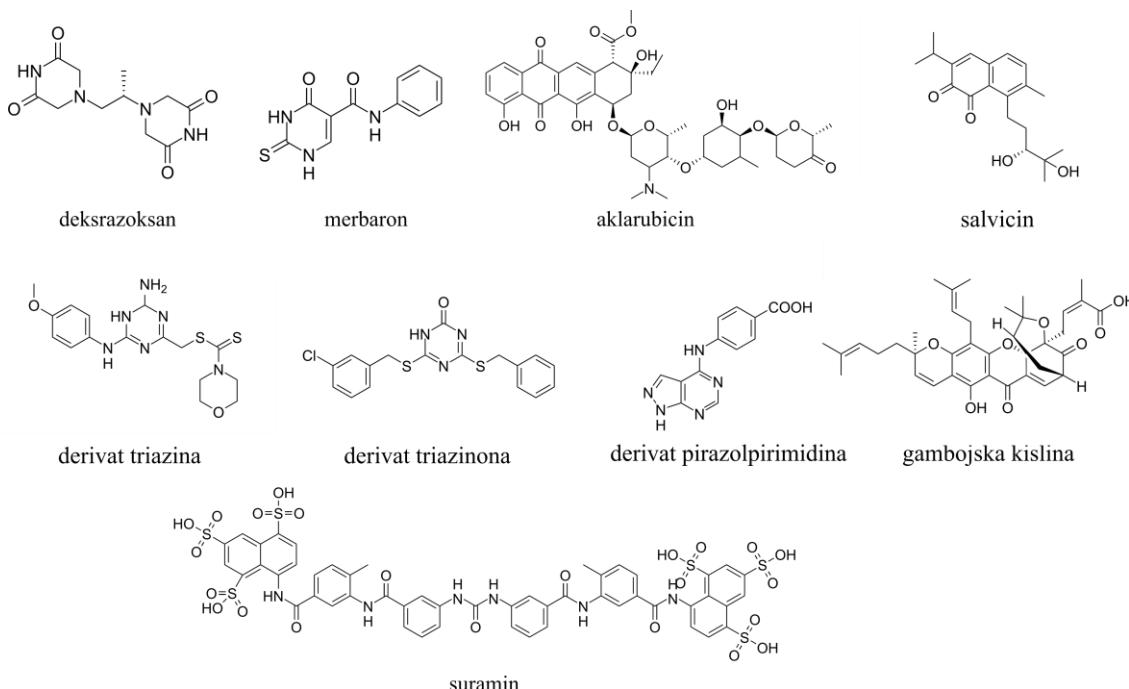
1.7.2. Katalitični zaviralci topoizomeraze II α

Katalitični zaviralci posegajo le v določen korak katalitičnega cikla in tako ne povečujejo ravni kovalentnega terciarnega kompleksa topoizomeraza II-DNA, kot se to zgodi pri DNA strupih (17). Protirakava zdravila iz skupine topoizomeraznih II α strupov zaradi tega povzročajo hude neželene učinke (na primer kardiotoksičnost). V zadnjih letih tako narašča trend načrtovanja novih zaviralcev DNA topoizomeraze II α , ki delujejo po alternativnih mehanizmih. Zato se vedno bolj uveljavlja skupina katalitičnih zaviralcev topoizomeraze II α . Kompleksen katalitični cikel človeške topoizomeraze omogoča namreč raznovrstne pristope pri zaviranju tega encima in je kljub temu, da je na voljo že precej učinkovin, ki zavirajo različne korake cikla, še vedno obetavna tarča za nadaljnje raziskave. Najbolj znana delitev pristopov delovanja katalitičnih zaviralcev je: [1] preprečitev vezave DNA na encim, [2] zaviranje cepitve DNA, [3] zasedanje vezavnega mesta za ATP in [4] zaviranje hidrolize ATP (14,17).

Deksrazoksan je trenutno edini predstavnik iz družine katalitičnih zaviralcev topoizomeraze II α , ki se uporablja za zdravljenje v Sloveniji in zavira več korakov v katalitičnem ciklu. Uporablja se sicer kot kardioprotектив pri zdravljenju z antraciklini in deluje preko dveh mehanizmov: zavira topoizomerazo II α tako, da zavira hidrolizo ATP ter kelira železo, saj je derivat EDTA, kar privede do zmanjšanja od železa odvisnega oksidativnega stresa, ki je glavni vzrok za kardiotoksičnost antraciklinov (33). Na **sliki 9** lahko vidimo strukture spojin, ki delujejo zaviralno na katalitični cikel topoizomeraze. Suramin, sicer zdravilo za spalno bolezen, je tako v kliničnih preizkušanjih za zdravljenje raka in je zaviralec topoizomeraze II α (topo II α). Merbaron je bil zelo obetaven katalitični zaviralec, vendar so zaradi premajhnega zaviranja encima *in vivo* ter toksičnosti ustavili raziskave (25).

Spojine, ki zasedejo vezavno mesto za ATP, preprečujejo vezavo ATP in na ta način zaustavijo nadaljnje korake katalitičnega cikla. Celotne kristalne strukture kompleksa človeške topoizomeraze II in zaviralcev, ki bi bili uvedeni v klinično prakso in bi delovali preko tega mehanizma, še nimamo, poteka pa več raziskav, da bi jih pridobili (17,16). Ta

skupina zaviralcev bo tudi predmet raziskav naše naloge. Nekateri že odkriti predstavniki te skupine so na primer monociklični derivati triazinona in triazina, pirazolpirimidina ter gambojska kislina, ki so prikazani na **sliki 9** (14,17,26,34).

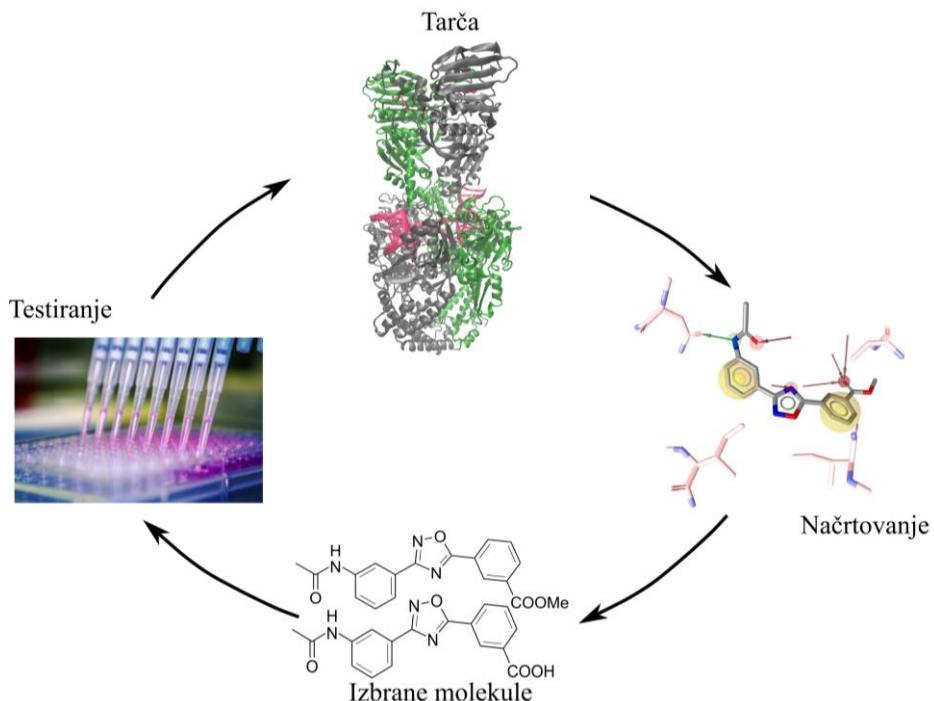


Slika 9. Nekateri predstavniki, ki zavirajo katalitični cikel topoizomeraze II α (14,17,26,34).

1.8. Cikel načrtovanja učinkovin

Razvoj novih zdravil je zapleten postopek, del katerega je tudi načrtovanje novih zdravilnih učinkovin (t.i. *drug design cycle*). To je kompleksen večstopenjski proces in poteka ciklično v več iteracijah, kot je poenostavljeno prikazano na **sliki 10**. V njem uporabljamo kombinacijo računskih in eksperimentalnih metod. Tarča je (najpogosteje protein ali nukleinska kislina) tista ključna makromolekula, ki z učinkovino tvori interakcijo z namenom, da bi spremenili njeno delovanje, ki je povezano z določenim bolezenskim stanjem (35). Predhodno se mora v raziskavah mehanizma posamezne bolezni namreč jasno pokazati, da je tarča, za katero želimo načrtovati učinkovine, ključna v razvoju tega patološkega stanja. Če imamo tarčo poznano, in je le-ta validirana, se nato lahko poslužimo računalniško podprtih metod za načrtovanje novih spojin (ang. *computer-aided drug design*), npr. molekulskega sidranja, farmakofornega modeliranja ter metod

klasičnih molekulskih simulacij (npr. simulacij molekulske dinamike), za kar potrebujemo knjižnice spojin (virtualne ali stvarne) (36).



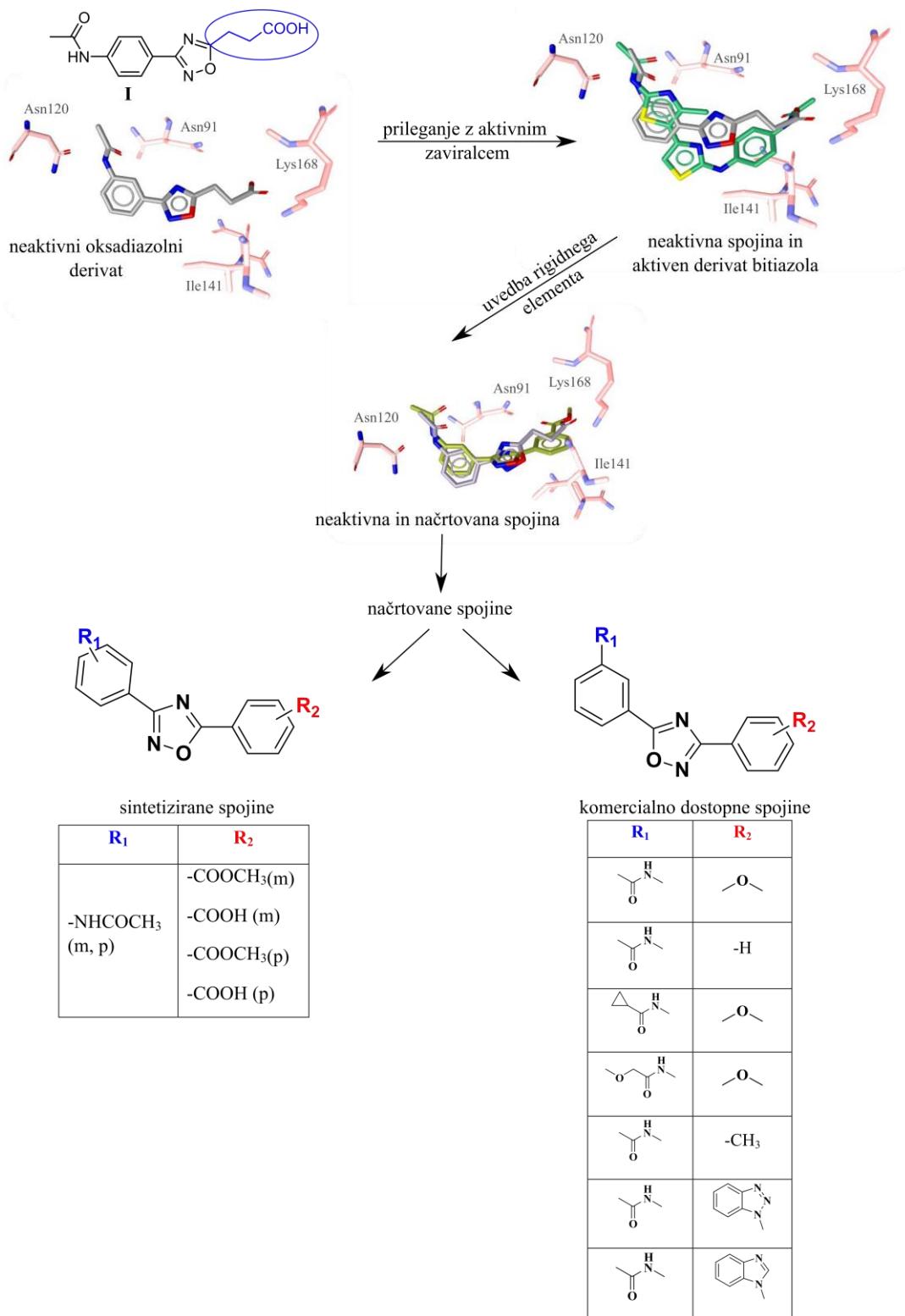
Slika 10. Prikaz poenostavljenega postopka odkrivanja novih zdravilnih učinkovin (29).

V splošnem uporabimo dva pristopa načrtovanja: načrtovanje in rešetanje na osnovi aktivnih ligandov (ang. *ligand-based drug design* LBDD) ali pa načrtovanja in rešetanja na osnovi strukture tarče (ang. *structure-based drug design* SBDD) (35,36). Ko s pomočjo tovrstne metode dobimo potencialno aktivno spojino, jo preizkusimo v *in vitro* testih, s katerimi ocenimo moč modulacije tarče (npr. zaviralne encimske aktivnosti). Nato mehanizem delovanja spojin ovrednotimo v nadalnjih funkcijskih, biokemijskih in biofizičkih testih (npr. v primeru topo II: študija vezave na izolirano domeno s pomočjo metode površinske plazmonske rezonance). V primeru dobrih rezultatov dobimo v prvi stopnji t.i validiran zadetek (ang. *validated hit*), za katerega v idealnem primeru rešimo tudi kristalno strukturo s tarčnim proteinom. Nato s temi podatki ponovno zavrtimo cikel načrtovanja in pridemo tako najprej do spojin vodnic, ki imajo že večino optimalnih lastnosti. Po več ciklih načrtovanja učinkovin lahko dobimo optimizirane spojine vodnice – prve kandidate za predklinične in klinične študije, kar lahko vodi do odkritja novega zdravila.

2. Namen dela

Na Kemijskem inštitut v Ljubljani v okviru raziskav Teoretičnega odseka (Laboratorij za računsko biokemijo in načrtovanje učinkovin) načrtujejo in eksperimentalno vrednotijo nove katalitične zaviralce topo II α , ki se vežejo na vezavno mesto za ATP. Na osnovi analize in ugotovljenih podobnosti vezavnih mest za ATP med bakterijsko DNA girazo in človeško topoizomerazo II α so dostopno serijo analogov 1,2,4-oksadiazola, ki so bili predhodno razviti na Fakulteti za farmacijo kot potencialni zaviralci bakterijske DNA giraze, sidrali v aktivno mesto in izbrali serijo molekul, ki so ji nato ocenili, ali ima zaviralno dejavnost na topo II α . Testirane spojine žal niso zavirale topo II α v koncentracijah nižjih od 1000 μM .

Nato so primerjali sidrane konformacije dobljenih vezavnih poz neaktivnih spojin z najučinkovitejšo molekulo iz kemijske serije bitiazolov, ki jih tudi razvijajo v raziskovalni skupini na Kemijskem inštitutu, in imajo eksperimentalno potrjeno vezavo v vezavno mesto za ATP, da bi ugotovili, kako modificirati neaktivne spojine, da bi potem lahko izkazovale vezavo na topo II α . Ugotovili so, da je del molekule, kjer je karboksilna skupina povezana z obročem preko etilenskega mostička, najverjetneje preveč fleksibilen fragment (na **sliki 11** označena z I). Tako so na osnovi primerjave z molekulami iz aktivnega razreda spojin fleksibilni strukturni element (etilenski mostiček) v razredu spojin 1,2,4-oksadiazolov zamenjali z bolj rigidnim elementom- fenilnim obročem, ki ima vezano karboksilno funkcionalno skupino na para ali meta položaj. Več možnih analogov takšne spojine je izkazovalo dobro vezavo v študijah molekulskega sidranja in na teoretičnem računskem nivoju potrdilo možnost interakcije s tarčnim mestom na topo II α . Shematsko je celoten proces načrtovanja prikazan na **sliki 11**.



Slika 11. Shema predhodnega strukturno podprtga načrtovanja 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov in načrtovane/izbrane spojine za sintezo.

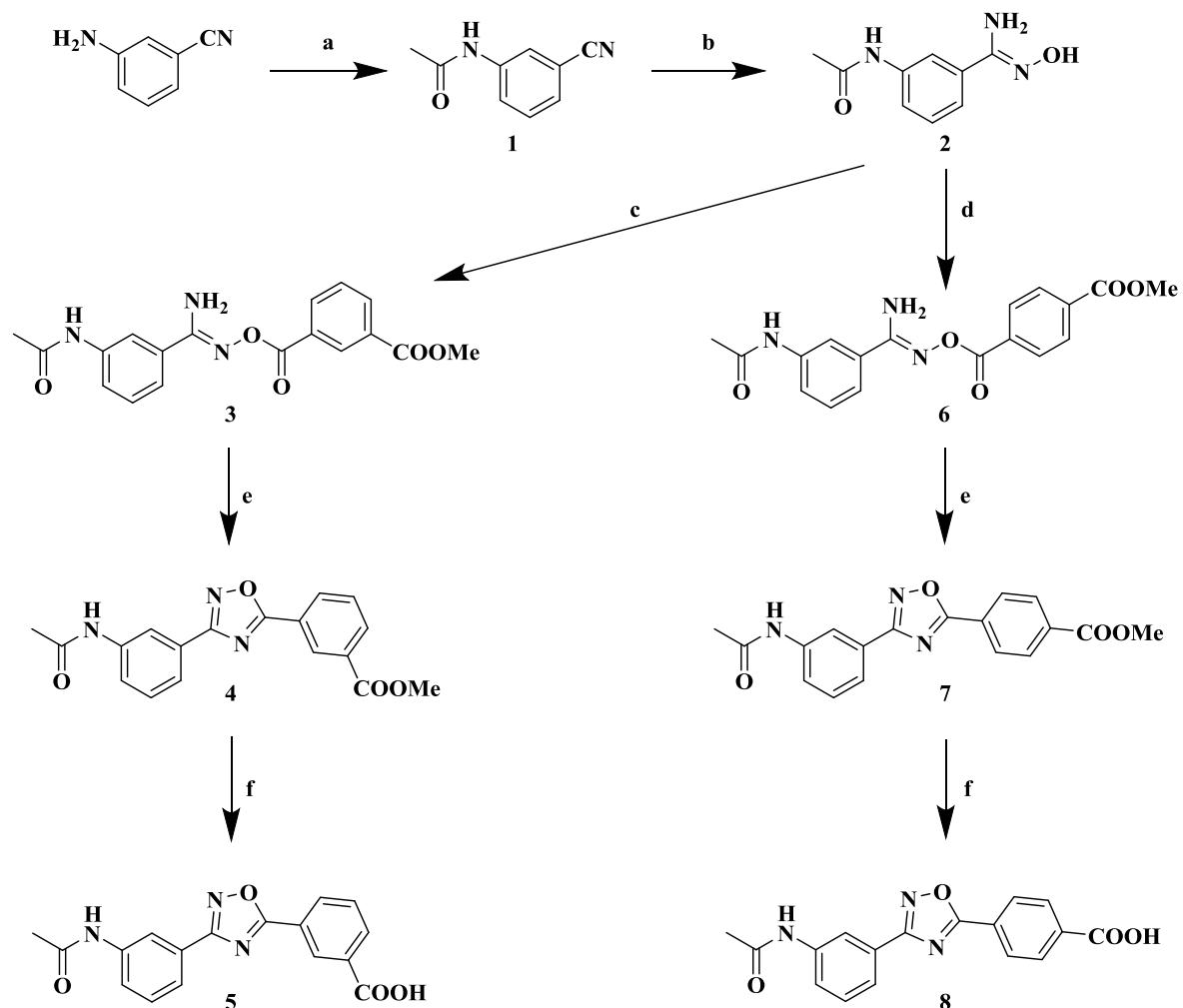
Na osnovi rezultatov opisanega načrtovanja je **namen magistrske naloge** sintetizirati potencialne nove zaviralce človeške DNA topoizomeraze II α (topo II α), derivate 3,5-disubstituiranega 1,2,4-oksadiazola, da bi preverili ustreznost načrtovanja in podali prve podatke o odnosu med strukturo in delovanjem za to skupino spojin.

Kot izhodni spojini za sintezo le-teh bomo izbrali 3-aminobenzonitril ter 4-aminobenzonitril. Vse sintetizirane spojine bomo ustrezeno strukturno ovrednotili s pomočjo spektroskopskih metod. Zaviralno delovanje končnih tarčnih spojin bomo ocenili z uporabo validiranega *in vitro* testa relaksacijske encimske aktivnosti topo II α .

Iz reakcijske sheme (**slika 12** in **slika 13**) je razvidno, da bomo načrtovane spojine začeli sintetizirati iz 3-aminobenzonitrica ter 4-aminobenzonitrica z dodatkom acetanhidrida ter tako pripravili N-(3-cianofenil)acetamid (**1**) in N-(4-cianofenil)acetamid (**9**). V naslednjem koraku bomo sintetizirali amidoksimi N-(3-(N'-hidroksikarbamimidoil)fenil)acetamid (**2**) ter N-(4-(N'-hidroksikarbamimidoil)fenil)acetamid (**10**). Preko nukleofilne substitucije O-aciliranja bomo s pomočjo metil 3-(klorokarbonil)benzoata ter metil 4-(klorokarbonil)benzoata amidoksime pretvorili v metil 3-(((3-acetamidofenil)(amino)metilen)amino)oksi)karbonil)benzoat (**3**), metil 4-(((3-acetamidofenil)(amino)metilen)amino)oksi)karbonil)benzoat (**6**), metil 3-(((4-acetamidofenil)(amino)metilen)amino)oksi)karbonil)benzoat (**11**), metil 4-(((4-acetamidofenil)(amino)metilen)amino)oksi)karbonil)benzoat (**14**). Iz nastalih spojin bomo nato pri povišani temperaturi izvedli ciklizacijo, da bomo dobili 4 različne derivate 3,5-disubstituiranega 1,2,4-oksadiazola: metil 3-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoat (**4**), metil 4-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoat (**7**), metil 3-(3-(4-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoat (**12**), metil 4-(3-(4-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoat (**15**). Na koncu bomo izvedli še hidrolizo estrov z natrijevim hidroksidom in nato po nakisanju izolirali proste kislinske derivate (spobine **5**, **8**, **13**, **16**).

Pridobili bomo tudi nekaj komercialno dostopnih derivatov 1,2,4-oksadiazola, ki so strukturno podobni načrtovanim spojinam. Ti nam bodo omogočili širši vpogled v odnos med strukturo in delovanjem (SAR) te skupine spojin na topo II α . Tudi te spojine bomo preizkusili z uporabo relaksacijskega encimskega testa. Skupaj z rezultati za sintetizirane spojine bomo lahko podali SAR za to kemijsko skupino zaviralcev topo II α in oblikovali smernice za nadaljnji razvoj terapevtsko uporabnih učinkovin.

2.1. Reakcijska shema spojin



a: $(CH_3CO)_2O$ / b.v. MeOH

b: $NH_2OH \times HCl$, TEA b.v./ b.v. etanol, T vrenja

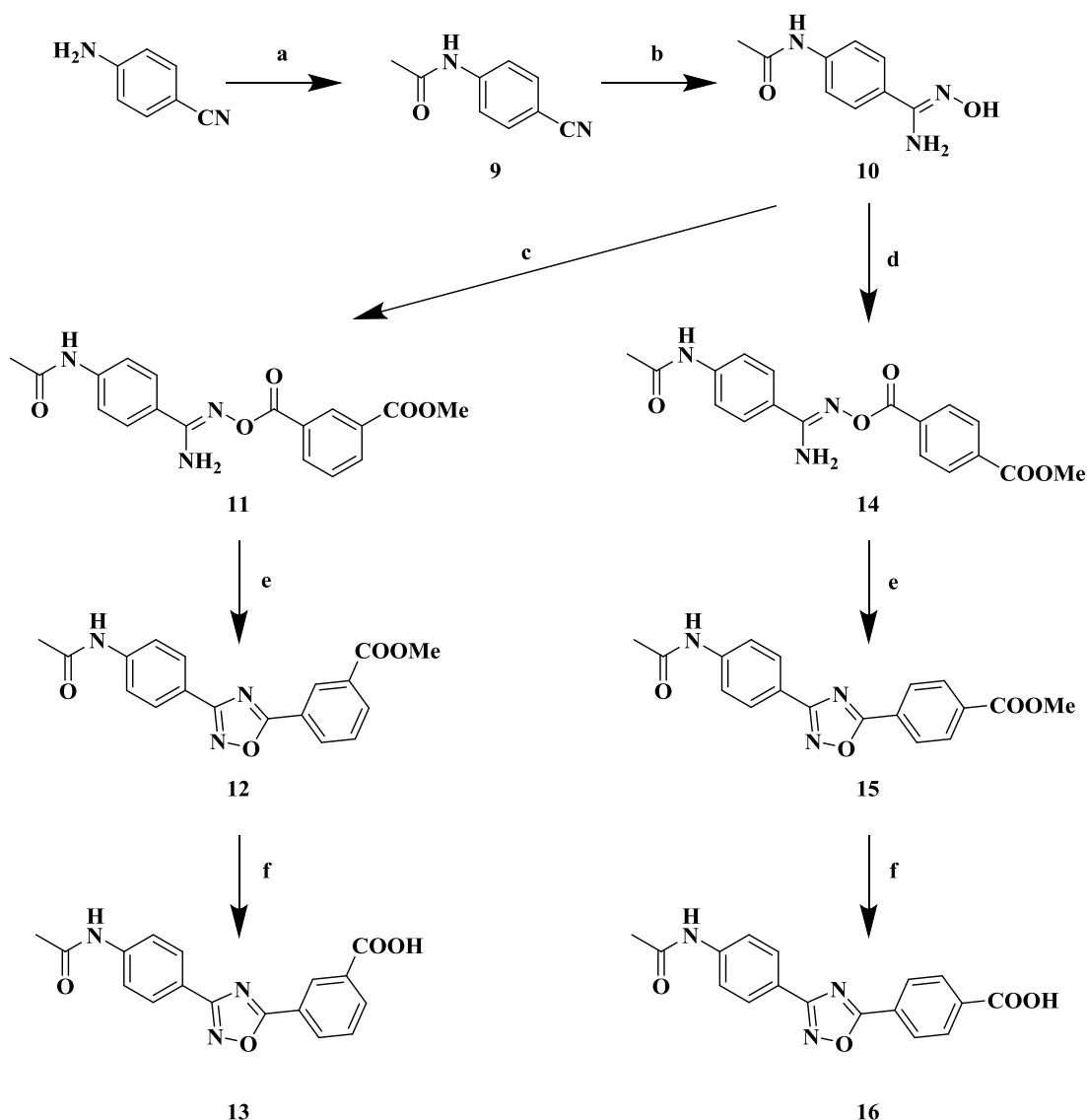
c: TEA, metil 3-(klorokarbonil)benzoat /b.v. CH_2Cl_2 , 0 °C

d: TEA, metil 4-(klorokarbonil)benzoat /b.v. CH_2Cl_2 , 0 °C

e: b.v. toluen, T vrenja

f: 1. NaOH/ dioksan
2. H_2O , HCl, etilacetat

Slika 12. Reakcijska shema 1 za sintezo 3,5-disubstituiranega 1,2,4-oksadiazolov.



a: (CH₃CO)₂O/ b.v. MeOH

b: NH₂OH x HCl, TEA b.v./ b.v. etanol, T vrenja

c: TEA, metil 3-(klorokarbonil)benzoat /b.v. CH₂Cl₂, 0 °C

d: TEA, metil 4-(klorokarbonil)benzoat /b.v. CH₂Cl₂, 0 °C

e: b.v. toluen, T vrenja

f: 1. NaOH/ dioksan

2. H₂O, HCl, etilacetat

Slika 13. Reakcijska shema 2 za sintezo 3,5-disubstituiranega 1,2,4-oksadiazolov.

3. Materiali in metode

3.1. Materiali

3.1.1. Reagenti in topila

V sklopu eksperimentalnega dela magistrske naloge smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev: Fluka, Merck, Sigma Aldrich, Acros organics. Brezvodni toluen in trietilamin (TEA) smo pripravili z destilacijo po standardnem postopku na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

3.1.2. Laboratorijska oprema

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali naslednjo standardno laboratorijsko opremo:

- Laboratorijsko tehnico Sartorius ISO 9001
- Analitsko tehnico Mettler Toledo AG245
- Električni grelnik z magnetnim mešalom IKA[®] RH basic RH B ter IKA[®] ETS D5
- Rotavapor (BÜCHI Rotavapor R-114) z grelno kadičko (BÜCHI Heating Bath) in vakumsko črpalko (BÜCHI Labortechnik I-100)
- Grelno pištolo Einhell[®] TC-HA 2000/1
- UV lučko
- Avtomatsko pipeto Transferpette[®]
- Filter papir (Sartorius), steklovino različnih proizvajalcev
- Oljna kopel

3.2. Metode

3.2.1. Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC)

Kako potekajo same reakcije, smo spremljali s tankoplastno kromatografijo. Tako smo lahko določili konec reakcije in spojino izolirali ter pri nečistih spojinah določili primerno mobilno fazo za čiščenje s kolonsko kromatografijo. TLC-je smo izvajali s ploščami Merck Kieselgel 60 F254 z 0,20 mm nanosa silikagela na aluminijastem nosilcu dimenzijs 20 x 20 cm, ki ima dodan fluorescentni indikator fluorescein. Mobilne faze (MF), ki smo jih uporabljali za razvijanje kromatogramov, so napisane pri vsakem sinteznem postopku posebej. Spojine smo detektirali na kromatografski ploščici s pomočjo UV svetilke z valovno dolžino $\lambda=254$ nm ter orositvenih reagentov ninhidrin (za amine) ter bromkrezolzeleno (za kisline).

Kolonska kromatografija

Za čiščenje nekaterih spojin smo uporabili kolonsko kromatografijo. Pri tem smo uporabljali steklene kolone različnih velikosti in premerov. Kot mobilno fazo smo uporabili mešanico topil kloroforma in metanola, njuno razmerje je napisano pri posameznem postopku sinteze spojine, ki smo jo čistili na tak način. Za stacionarno fazo smo nanesli silikagel Silica Gel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm.

Preparativna kromatografija

Nekatere spojine smo očistili s pomočjo preparativne kromatografije. Za to smo uporabili steklene kromatografske plošče PLC Silica gel 60 F₂₅₄, 2 mm Merck KGaA. Kromatogram smo razvili v različnih mobilnih fazah, ki so navedene pri posamezni sintezni stopnji.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Za preverjanje čistosti končnih spojin smo na Fakulteti za farmacijo izvedli HPLC analize s pomočjo instrumenta Agilent Technologies HP 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B,

kolono Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, 5 μm delci) ob uporabi predkolone in pri pretoku mobilne faze 1 mL/min. Za mobilno fazo smo uporabili zmes 0,1 % trifluoroocetne kisline v vodi in acetonitrila, pri čemer smo delež acetonitrila spremenjali s časom: od 0 do 16 minute se je sestava spremenjala od 30 % acetonitrila do 90 %, od 16 do 20 minute pa smo spirali z mobilno fazo z 90 % acetonitrila. Valovna dolžina detekcije spojin je bila 254 nm. Temperatura kolone je bila 25 °C, volumen injiciranja pa 10 μL .

3.2.2. Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

^1H in ^{13}C NMR spektre smo posneli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani na spektrometru Bruker Avance III 400 pri 400 MHz (^1H NMR) oz. 100 MHz (^{13}C NMR) z magnetom Bruker Ultrashield™ 400 PLUS pri temperaturi 298 K. Kot interni standard smo uporabili tetrametilsilan (TMS), za topilo pa smo uporabili devteriran dimetilsulfoksid (DMSO-d_6) ter devteriran kloroform (CDCl_3). Kemijski premiki (δ) so podani v enotah »parts per million« (ppm).

Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektre smo posneli na spektrofotometru Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Masna spektroskopija (MS)

Na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani smo posneli masne spektre nekaterih spojin na spektrometru Advion expression CMSL z ESI tehniko. Masno ter HR-MS (masna spektroskopija visoke ločljivosti) analizo pa so opravili na Centru za masno spektrometrijo na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani s pomočjo spektromетra Q-TOF Premier z ESI metodo ionizacije.

3.2.3. Določanje tališča

S pomočjo talilnega mikroskopa znamke Leica z ogrevalno mizico smo našim spojinam na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani določili temperaturo tališča. Slednja niso korigirana.

3.2.4. Uporaba računalniških programov

Za poimenovanje spojin, risanje njihovih kemijskih struktur ter pripadajočih reakcijskih shem smo uporabljali program ChemBioDraw 15.1, podjetja CambridgeSoft. Program je del večjega programskega okolja ChemOffice (37).

Za obdelavo ^1H in ^{13}C spektrov naših spojin smo uporabili program MestReNova podjetja Mestrelab Research (38).

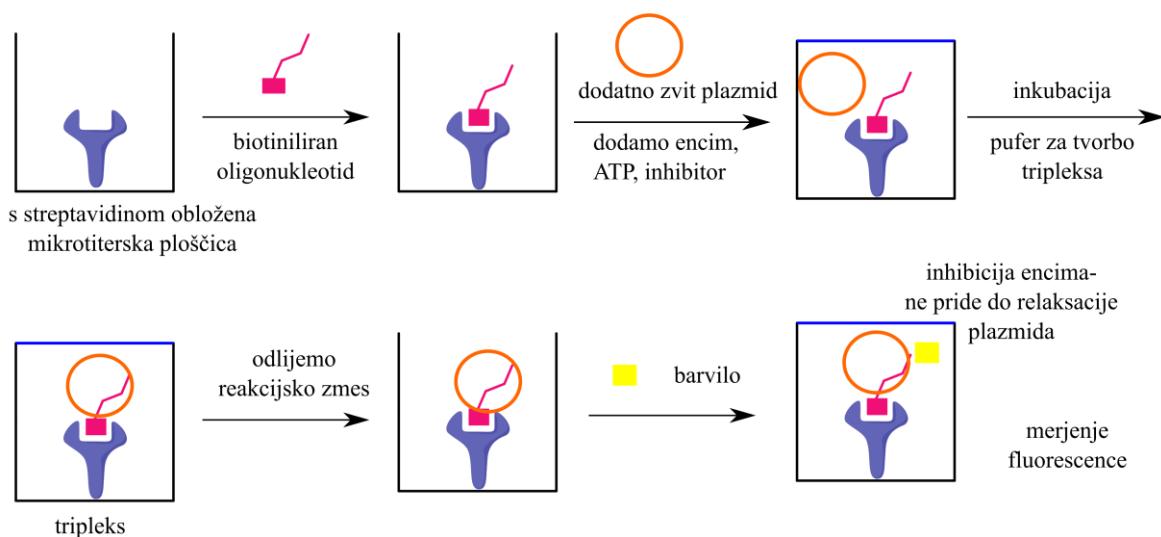
Aktivne molekule smo sidrali v ATP vezavno mesto s programom GOLD (39). Primerjavo sidranih konformacij in vizualizacijo smo nato opravili s programom LigandScout (27). Natančen opis postopka sidranja se nahaja v poglavju 3.2.7.

3.2.5. Biološko testiranje spojin: ovrednotenje topo II α zaviralne aktivnosti

Sintetiziranim spojinam zadnje (**5**, **8**, **13**, **16**) in predzadnje stopnje (**4**, **7**, **12**, **15**), izbranemu intermediatu (**3**) ter komercialno dostopnim spojinam (**17**, **18**, **19**, **20**, **21**, **22**, **23**) iz razreda 1,2,4-oksadiazolov smo ovrednotili njihovo sposobnost za zaviranje encimske aktivnosti človeške DNA-topoizomeraze II α . Meritve je opravila mlada raziskovalka Kaja Bergant na Kemijskem inštitutu v Ljubljani. Izvedli smo *in vitro* test topo II α relaksacijske encimske aktivnosti na ploščici (Human Topo II α Relaxation Plate Assay) po standardnem protokolu (40) na testni ploščici podjetja Inspiralis. Princip testa izkorišča tvorbo tripleksa med dodatno zvitim plazmidom (superzvitim) in biotniliranim oligonukleotidom vezanim na s streptavidinom obloženo mikrotitersko ploščico. Ta kompleks se ne tvori, če superzvit plazmid relaksira delujoča topo II α . V primeru

uspešnega zaviranja s preiskovano spojino se dodano barvilo SybrGOLD veže na tvorjeni tripleks in oddaja večjo fluorescenco kot v primeru, ko se tripleks ne tvori (41,42,43).

Na **sliki 14** je shematsko prikazan dejanski potek testa. Na mikrotitrsko ploščico, ki so obložene s streptavidinom, immobiliziramo biotiniliran oligonukleotid. Sledi dodajanje preiskovane spojine, ATP-ja, dodatno zvitega plazmida in topo II α encima. Po končani inkubaciji dodamo pufer za izpiranje, ki poskrbi za tvorbo tripleksa ter ustavitev relaksacije. Temu sledi ponovna inkubacija. Po končani ponovni inkubaciji odlijemo stran reakcijsko zmes, speremo ploščico ter dodamo barvilo SybrGOLD in pomerimo fluorescenco s fluorescenčnim čitalcem mikrotitrskih ploščic (Synergy Mx, Biotek).

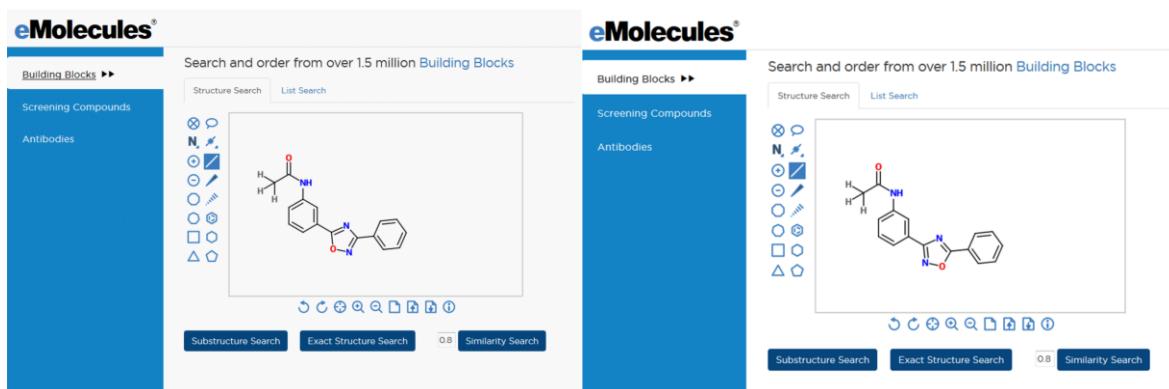


Slika 14. Shematski prikaz principa testa določanja relaksacijske encimske aktivnosti topo II α v primeru aktivne spojine-zaviralca (42).

Kot lahko vidimo iz **slike 14**, pride v primeru aktivne spojine (spojava, ki je sposobna zavirati topoizomerazo II α), do večje izsevane fluorescence, saj se barvilo veže na plazmid, ki s streptavidinom in biotiniliranim oligonukleotidom tvori tripleks (41).

3.2.6. Izbor dodatnih komercialno dostopnih analogov 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov

Dodatne komercialno dostopne spojine smo iskali s pomočjo spletnih strani eMolecules (44), ki omogoča preko brezplačnega iskalnika identifikacijo novih potencialnih učinkovin v bazi z več kot 1,5 milijona spojinami. To spletno stran smo uporabili, da bi našli strukturno podobne derivate, kot so naši načrtovani disubstituirani 1,2,4-oksadiazoli, ki so komercialno dostopni. V bazi spojin smo iskali na podlagi identifikacije podobnih struktur (ang. substructure search), tako smo najprej izrisali disubstituirane 1,2,4-oksadiazole, kot je razvidno iz **slike 15** ter nato med zadetki izbrali komercialno dosegljive strukturno podobne spojine. Direktnega substitucijskega vzorca glede na naš želeni oksadiazol nismo našli.



Slika 15. Načrtvani spojini narisani v e-molecules, za iskanje komercialno dostopnih strukturno podobnih podobnih derivatov.

Na **sliki 15** lahko vidimo molekuli, ki se razlikujeta v položaju kisika in dušika v oksadiazolnem obroču. Na levi strani obeh molekul so atomi H vidni, zato da je bila na tistem mestu preprečena substitucija, fenilni obroč pa je ostal pri obeh narisanih molekulah nesubstituiran. Bazo smo preiskali z obema analogoma. Dobili smo okoli 130 zadetkov, ki so podobni disubstituiranemu oksadiazolu na levi strani na **sliki 15**, ter izmed teh izbrali 7 spojin (**17, 18, 19, 20, 21, 22, 23**), ki so se razlikovale po različnih substituentih na prvem oz. drugem fenilnem obroču (spojne so izrisane v **preglednici V**). Kriterija izbora sta bila cenovna dosegljivost in možnost, da preiščemo vpliv različnih substituentov.

3.2.7. Molekulska sidranje aktivne spojine **4** v vezavno mesto za ATP človeške topo II α

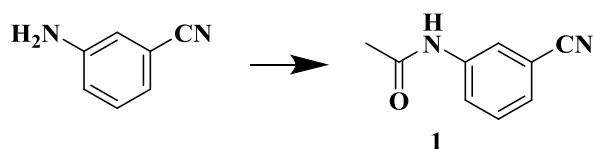
Načrtovanje spojin in molekulska modeliranje smo opravili na Kemijskem inštitutu. Za generiranje tridimenzionalnih struktur obravnavanih ligandov in nadaljnjo geometrijsko optimizacijo za molekulska sidranje smo uporabili program Chem 3D (tudi del okolja ChemOffice) in MMFF94 polje sil. Uporabili smo predhodno predlagane nastavitev geometrijske optimizacije začetne strukture. Dobljeno konformacijo spojine smo shranili v formatu sdf. Molekule so bile sidrane v vezavno mesto za ATP s programom GOLD (39). Primerjavo sidranih konformacij in vizualizacijo smo opravili s programom LigandScout (27).

Za izračun vezanih konformacij molekul v aktivnem mestu topoizomeraze II α z metodo molekulskega sidranja smo uporabili program GOLD. Uporabili smo le 1 protomer (veriga A) tarčne strukture ATPazne domene človeške topoizomeraze II α pridobljene iz baze proteinskih struktur (Protein Data Bank – PDB), dostopne pod oznako 1ZXM (45,34). Vodikovi atomi so bili na protein dodani avtomatsko s privzetimi nastavivami. Aktivno mesto za ATP smo definirali kot kroglo premera 10 Å okoli referenčnega liganda AMP-PNP ($x = 35,7113$; $y = 0,452$; $z = 40,0306$). Odstranili smo tudi v aktivnem mestu prisoten magnezijev ion (Mg^{2+}) in vse vode, ki so bile vidne v mapi elektronske gostote. Obdržali smo kristalni vodi W931 in W924, saj so predhodne raziskave sidranja katalitičnih inhibitorjev pokazale, da sta ti dve vodi lahko pomembni za vezavo molekule in tvorbo indirektnih vodikovih vezi z aminokislinami (26,34). Najprej smo za validacijo uspešno reproducirali vezavno konformacijo ko-kristaliziranega referenčnega liganda AMP-PNP v vezavnem mestu za ATP (34). Dodali smo tudi dodatno geometrijsko omejitev tvorbe vodikove vezi med ligandom in karbonilnim kisikom Asn120, ki interagira z adeninskim fragmentom ATP analoga. Afiniteto sidranih konformacij spojine **4** smo izračunali s cenilno funkcijo GoldScore, ki se je pri validacijskem sidranju izkazala za najprimernejšo (34). Za spojino **4** smo tako pri enakih nastavivah izračunali 10 vezavnih konformacij v topo II α vezavnem mestu za ATP. Ostale nastavitev genetskega algoritma v programu GOLD so bile privzete (populacija = 100, selekcijski pritisk = 1,1, število operacij = 100 000, število otokov = 5, velikost niše = 2, migracija = 10, mutacija = 95, Crossover = 95).

4. Eksperimentalni del

4.1. Sinteza N-(3-cianofenil)acetamida (1)

Reakcija



Postopek

V brezvodni metanol (150 mL) dodamo ob mešanju pri sobni temperaturi 3-aminobazonitril (20 mmol; 2,37 g). Nato počasi dokapavamo (približno 10 min) acetanhidrid (21 mmol; 2 mL). Po 30 minutah od začetka dokapavanja acetanhidrida zmes uparimo in prelijemo z vodo (20 mL), ki smo ji dodali nekaj ledu. Izpadlo oborino odfiltriramo s presesavanjem in posušimo.

Rezultati

Izgled: rjavkasti kristali

Izkoristek: 90,03 %

Rf: 0,44 (MF: kloroform/metanol=9/1, orositveni reagent: ninhidrin)

T_{tališča}: 114-116 °C

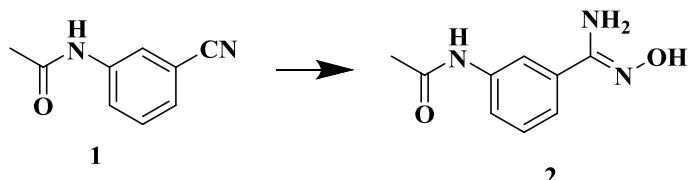
¹H-NMR (400MHz, DMSO-d6): δ[ppm] 2.08 (s, 3H, CH₃CO); 7.48-7.54 (m, 2H, 2H Ar); 7.77 (d, 1H, J=7.4 Hz, 1H Ar); 8.08 (s, 1H, 1H Ar); 10.29 (s, 1H, NH)

IR (cm⁻¹): 3258, 3122, 2225, 1665, 1585, 1556, 1474, 1426, 1365, 1326, 1293, 1262, 1146, 1022, 895, 792, 751, 739, 679, 624, 531

MS (ESI): 160,89 [M+H]⁺, **Mr (izračunana)=**160,17 **Elementna sestava:** C₉H₈N₂O

4.2. Sinteza N-(3-(N'-hidroksikarbamimidoil)fenil)acetamida (2)

Reakcija



Postopek

V brezvodni etanol (100 mL) dodamo ob mešanju hidroksilamonijev klorid (14,9 mmol; 1,04 g) in nato še trietylamin (14,9 mmol; 2,1 mL). Mešamo tako dolgo, dokler se vse ne raztopi (približno 15 min). Nato dodamo spojino **1** (12,5 mmol; 2 g) in segrevamo pri temperaturi vrenja (78 °C). Ker reakcija poteka počasi, dodamo po 23 urah še 0,21 g hidroksilamonijevega klorida in 420 μ L trietylamina. Po 48 urah končamo reakcijo in reakcijsko zmes uparimo. Nato dodamo minimalno količino vode in košček ledu ter nastalo oborino odfiltriramo s presesavanjem ter speremo z malo ledene vode in posušimo.

Rezultati

Izgled: svetlo rjavkasti kristali

Izkoristek: 90,18 %

Rf: 0,27 (MF: kloroform/metanol=9/1, orositveni reagent: ninhidrin)

T_{tališča}: 80-82 °C

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d6): δ [ppm] 2.04 (s, 3H, CH₃CO); 5.74 (s, 2H, NH₂); 7.26-7.31 (m, 2H, 2H Ar); 7.60-7.63 (m, 1H, 1H Ar); 7.89 (s, 1H, 1H Ar); 9.62 (s, 1H, OH); 9.99 (s, 1H, NH)

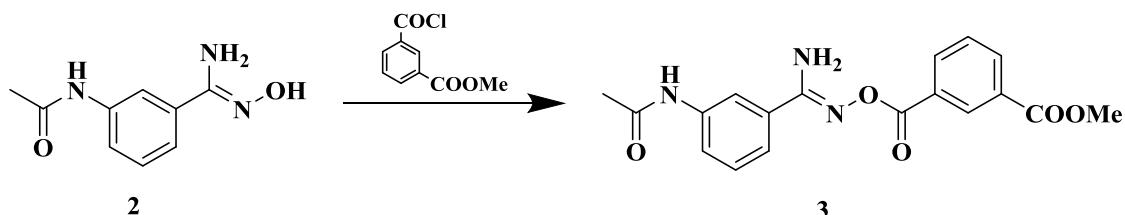
IR (cm⁻¹): 3444, 3194, 1648, 1611, 1560, 1491, 1426, 1384, 1325, 1306, 1265, 1037, 982, 933, 873, 797, 756, 720, 694, 681, 638, 605

MS (ESI): 193,94[M+H]⁺, **Mr (izračunana)=**193,203

Elementna sestava: C₉H₁₁N₃O₂

4.3. Sinteza metil 3-(((3-acetamidofenil)(amino)metilen)amino)oksi)karbonil)benzoata (3)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (35 mL) raztopimo spojino **2** (1,01 mmol; 194,8 mg) in ohladimo na 0 °C ter dodamo trietilamin (1,26 mmol; 0,35 mL). Nato počasi dokapavamo metil 3-(klorokarbonil)benzoat (1,26 mmol; 0,198 mL). Po končani reakciji (45 min od začetka dokapavanja kislinskega klorida) dodamo 15 mL diklorometana in prenesemo zmes v lij ločnik. Organsko fazo speremo z vodo (3 x 20 mL) ter nasičeno vodno raztopino natrijevega klorida (20 mL). Diklorometan odparimo na rotavaporju. Nastali produkt nato očistimo s kolonsko kromatografijo (MF: kloroform/metanol=15/1).

Rezultati

Izgled: bel prah

Izkoristek: 45,56 %

Rf: 0,54 (MF: kloroform/metanol=9/1)

T_{tališča}: 162-164 °C

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d6): δ[ppm] 2.07 (s, 3H, CH₃CO); 3.92 (s, 3H, CH₃COO), 7.04 (s, 2H, NH₂); 7.40-7.42 (d, 2H, J=5,1 Hz, 2H Ar); 7.70-7.74 (t, 1H, J=8,2 Hz, 1H Ar); 7.80-7.83 (t, 1H, J=4,7 Hz, 1H Ar); 7.95 (s, 1H, 1H Ar); 8.22-8.24 (d, 1H, J= 9,5 Hz, 1H Ar); 8.52-8.54 (d, 1H, J=8,3 Hz, 1H Ar); 8.61 (s, 1H, 1H Ar); 10.14 (s, 1H, NH)

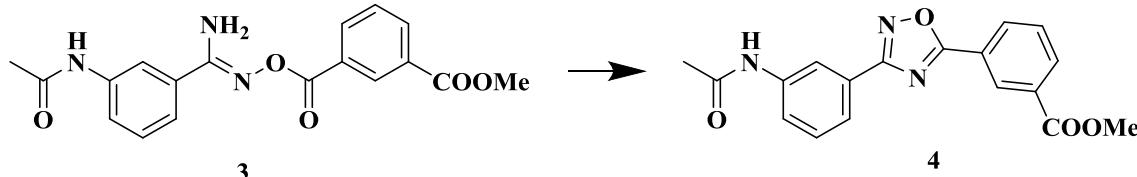
IR (cm⁻¹): 3579, 3470, 3316, 3255, 3088, 2953, 1732, 1711, 1681, 1632, 1596, 1578, 1561, 1484, 1447, 1437, 1401, 1369, 1299, 1235, 1192, 1166, 1129, 1100, 1088, 1071, 998, 976, 944, 921, 889, 823, 778, 726, 714, 653, 612, 582, 540, 504

MS (ESI): 353,97[M-H]⁻, **Mr (izračunana)=**355,34

HR-MS: 356,1246 (izračunana: 356,1238) **Elementna sestava:** C₁₈H₁₇N₃O₅

4.4. Sinteza metil 3-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksodiazol-5-il)benzoata (**4**)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem toluenu (10 mL) raztopimo 100 mg spojine **3**. Segrevamo pri temperaturi vrenja (111 °C) 6 dni. Po končani reakciji odparimo topilo. Čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: kloroform/metanol=20/1).

Rezultati

Izgled: rumen prah

Izkoristek: 46,35 %

Rf: 0,56 (MF: kloroform/metanol=9/1)

T_{tališča}: 123-126 °C

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] 2.10 (s, 3H, CH₃CO); 3.96 (s, 3H, CH₃COO); 7.52-7.56 (t, 1H, J=15,9 Hz, 1H Ar); 7.78 (d, 1H, 1H Ar); 7.88 (t, 2H, 2H Ar); 8.29-8.33 (t, 1H, J=16,3 Hz, 1H Ar); 8.42-8.47 (t, 2H, J=9,6 Hz, 2H Ar); 8.70 (s, 1H, 1H Ar); 10.25 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃): δ[ppm] 24.67, 52.60, 118.66, 122.77, 123.19, 124.62, 127.37, 129.30, 129.41, 129.76, 131.29, 132.13, 133.58, 138.58, 165.98, 168.63, 168.71, 174.84

IR (cm⁻¹): 3270, 3111, 1727, 1664, 1618, 1597, 1564, 1441, 1346, 1288, 1245, 1168, 1132, 1104, 1000, 962, 887, 802, 737, 709, 681, 609, 565, 537

MS (ESI): 338,1 [M+H]⁺, **Mr (izračunana)=**337,33

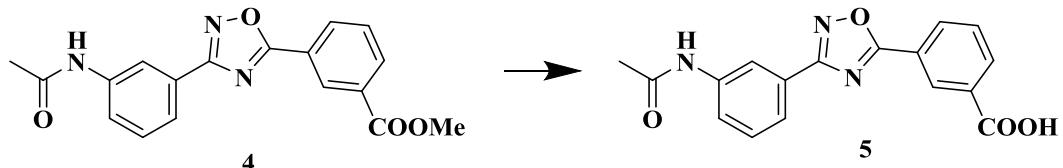
HR-MS: 338,1141 (izračunana: 338,1142)

Elementna sestava: C₁₈H₁₅N₃O₄

HPLC: čistost spojine 100 % pri 254 nm (t_R=8,3 min)

4.5. Sinteza 3-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksodiazol-5-il)benzojske kisline (5)

Reakcija



Postopek

20 mg (0,05 mmol) spojine **4** raztopimo v 20 mL dioksana, dodamo 50 μ L 2 M raztopine natrijevega hidroksida ter pustimo mešati 3 dni pri sobni temperaturi. Po končani reakciji odparimo topilo, ostanek raztopimo v 15 mL vode in speremo s 15 mL etilacetata. Vodno fazo nakisamo s 5 M raztopino klorovodikove kisline do pH 4 ter ekstrahiramo z etilacetatom. Organsko fazo nato speremo dvakrat s 15 mL vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida, sušimo z natrijevim sulfatom, prefiltriramo ter uparimo topilo. Čistimo s spiranjem z etrom.

Rezultati

Izgled: svetlo rjav prah

Izkoristek: 61,73 %

Rf: 0,31 (diklorometan/metanol= 5/1 + 2 % ocetna kislina)

T_{tališča}: 233-235 °C

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d6): δ [ppm] 2.10 (s, 3H, CH₃CO); 7.50-7.56 (t, 1H, 1H Ar); 7.78-7.88 (m, 3H, 3H Ar); 8.26-8.29 (d, 1H, J=9,4 Hz, 1H Ar); 8.41-8.44 (s, 2H, 2H Ar); 8.70 (s, 1H, 1H Ar); 10.24 (s, 1H, NH); 13.54 (s, 1H, COOH)

IR (cm⁻¹): 3272, 2833, 2534, 2350, 2172, 1681, 1605, 1555, 1505, 1405, 1370, 1271, 1082, 1022, 898, 802, 696, 551

MS (ESI): 321,8 [M-H]⁻, **Mr (izračunana)=**323,20

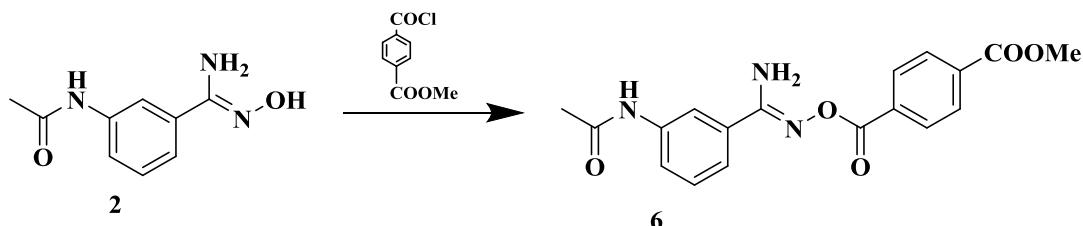
HR-MS: 322,0828 (izračunana: 322,0822)

Elementna sestava: C₁₇H₁₃N₃O₄

HPLC: čistost spojine 96,79 % pri 254 nm (t_R =5,1 min)

4.6. Sinteza metil 4-(((3-acetamidofenil)(amino)metilen)amino)oksi)karbonil)benzoata (**6**)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (35 mL) raztopimo spojino **2** (1,008 mmol; 194,75 mg) in ohladimo na 0 °C ter dodamo trietilamin (1,26 mmol; 0,35 mL). Nato počasi dokapavamo metil 4-(klorokarbonil)benzoat (1,26 mmol; 277,8 mg v 10 mL diklorometana). Po končani reakciji (45 min od začetka dokapavanja kislinskega klorida) dodamo 15 mL diklorometana in prenesemo zmes v lij ločnik. Organsko fazo speremo z vodo (3 x 20 mL) ter nasičeno vodno raztopino natrijevega klorida (20 mL). Diklorometan odparimo na rotavaporju. Produkt čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: kloroform/metanol=15/1).

Rezultati

Izgled: bel prah

Izkoristek: 29,03 %

Rf: 0,58 (kloroform/metanol=9/1)

T_{tališča}: 170-172 °C

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d6): δ[ppm] 2.07 (s, 3H, CH₃CO); 3.92 (s, 3H, CH₃COO); 7.04 (s, 2H, NH₂); 7.35-7.43 (d, 2H, 2H Ar); 7.79-7.84 (m, 1H, 1H Ar); 7.94 (s, 1H, 1H Ar); 8.08-8.11 (d, 2H, J=8,7 Hz, 2H Ar); 8.32-8.34 (d, 2H, J=8,7 Hz, 2H Ar); 10.14 (s, 1H, NH)

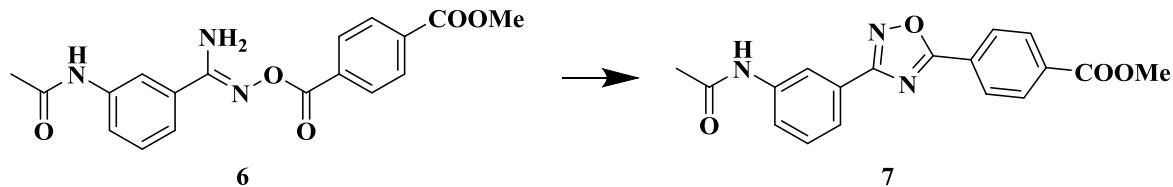
IR (cm⁻¹): 3423, 3208, 3080, 1726, 1711, 1676, 1639, 1602, 1582, 1552, 1508, 1438, 1408, 1371, 1316, 1280, 1249, 1190, 1164, 1116, 1107, 1083, 1020, 965, 920, 899, 889, 874, 853, 827, 799, 757, 722, 694, 672, 652, 616, 593, 531

MS (ESI): 353,91 [M-H]⁺, **Mr (izračunana):** 355,34

HR-MS: 354,1090 (izračunana: 354,1080) **Elementna sestava:** C₁₈H₁₇N₃O₅

4.7. Sinteza metil 4-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoata (7)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem toluenu (10 mL) raztopimo 130 mg spojine **6**. Segrevamo pri temperaturi vrenja (111 °C) 3 dni. Po končani reakciji uparimo topilo. Čistimo s preobarjanjem in s pomočjo preparativne kromatografije.

Rezultati

Izgled: bel prah

Izkoristek: 32,82 %

Rf: 0,53 (kloroform/metanol=9/1)

T_{tališča}: 200-202 °C

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d6): δ[ppm] 2.10 (s, 3H, CH₃CO); 3.94 (s, 3H, CH₃COO); 7.54 (t, 1H, 1H Ar); 7.78 (m, 1H, 1H Ar); 7.88 (t, 2H, 2H Ar); 8.25 (d, 1H, 1H Ar); 8.34 (d, 2H, 2H Ar); 8.44 (s, 1H, 1H Ar); 10.26 (s, 1H, NH) * prisotne nečistote v spektru

IR (cm⁻¹): 3364, 3120, 2606, 2362, 1716, 1656, 1562, 1519, 1490, 1423, 1366, 1350, 1316, 1284, 1240, 1185, 1108, 1050, 1018, 972, 927, 888, 845, 786, 763, 744, 692, 668, 609, 574, 537

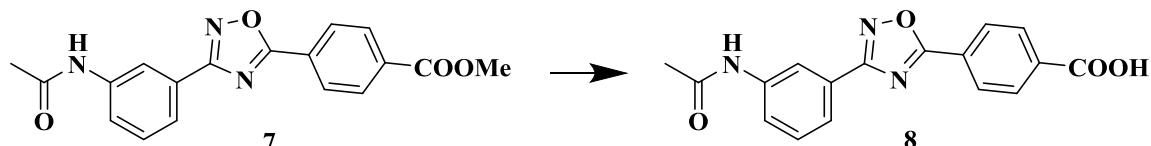
MS (ESI): 336,09[M-H]⁻, **Mr (izračunana)=** 337,33

HR-MS: 336,0986 (izračunana: 336,0984)

Elementna sestava: C₁₈H₁₅N₃O₄

4.8. Sinteza 4-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzojske kisline (8)

Reakcija



Postopek

20 mg (0,05 mmol) spojine **7** raztopimo v 20 mL dioksana, dodamo 50 μ L 2 M raztopine natrijevega hidroksida ter pustimo mešati 3 dni pri sobni temperaturi. Po končani reakciji odparimo topilo, ostanek raztopimo v 15 mL vode in speremo s 15 mL etilacetata. Vodno fazo nakisamo s 5 M raztopino klorovodikove kisline do pH 4 ter ekstrahiramo z etilacetatom. Organsko fazo nato speremo dvakrat s 15 mL vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida, sušimo z natrijevim sulfatom, prefiltriramo ter uparimo topilo. Čistimo s preparativno kromatografijo.

Rezultati

Izgled: rjav trd zaostanek

Izkoristek: 12,65 %

Rf: 0,31 (diklorometan/metanol= 5/1 + 2 % ocetna kislina)

T_{tališča}: >300 °C

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d6): δ [ppm] 1.24 (s, 3H, CH_3CO); 7.51-7.55 (t, 1H, 1H Ar); 7.83-7.84 (m, 2H, 2H Ar); 8.15 (s, 1H, 1H Ar); 8.25-8.27 (m, 3H, 3H Ar); 8.42 (s, 1H, 1H Ar); 10.24 (s, 1H, NH); 13.54 (s, 1H, COOH)* signal ni viden

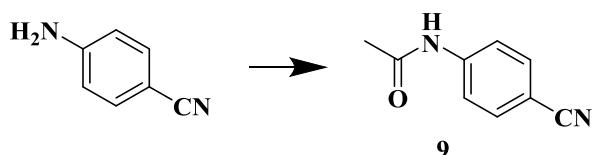
MS (ESI): 321,89 [M-H]⁻, **Mr (izračunana):** =323,30

HR-MS: 322,0829 (izračunana: 322,0828)

Elementna sestava: C₁₇H₁₃N₃O₄

4.9. Sinteza N-(4-cianofenil)acetamida (**9**)

Reakcija



Postopek

V brezvodni metanol (150 mL) dodamo ob mešanju pri sobni temperaturi 4-aminobenzonitril (20 mmol; 2,37 g). Nato počasi dokapavamo (približno 10 min) acetanhidrid (27 mmol; 2,6 mL). Po enem dnevu dodamo 0,6 mL acetanhidrida. Po 2 dneh zmes uparimo in prelijemo z vodo (20 mL), ki smo ji dodali nekaj ledu. Izpadlo oborino odfiltriramo s presesavanjem in posušimo.

Rezultati

Izgled: rumen prah

Izkoristek: 90,18 %

Rf: 0,55 (MF: kloroform/metanol=9/1, orositveni reagent: ninhidrin)

T_{tališča}: 155-157 °C

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d6): δ[ppm] 2.09 (s, 3H, CH₃CO); 7.76 (s, 4H, 4H Ar); 8.08 (s, 1H, 1H Ar); 10.38 (s, 1H, NH)

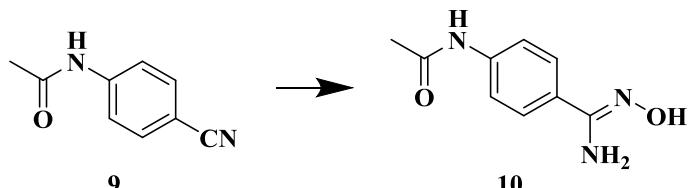
IR (cm⁻¹): 3307, 3250, 3182, 3107, 2217, 1665, 16596, 1529, 1505, 1403, 1360, 1320, 1264, 1175, 1014, 833, 818, 740, 602, 543

MS (ESI): 159,99 [M-H]⁻, **Mr (izračunana)=**160,173

Elementna sestava: C₉H₈N₂O

4.10. Sinteza N-(4-(N'-hidroksikarbamimidoil)fenil)acetamida (10)

Reakcija



Postopek

V brezvodni etanol (100 mL) dodamo ob mešanju hidroksilamonijev klorid (14,9 mmol; 1,04 g) in nato še trietilamin (14,9 mmol; 2,1 mL). Mešamo tako dolgo, dokler se vse ne raztopi (približno 15 min). Nato dodamo spojino **9** (12,5 mmol; 2 g) in segrevamo pri temperaturi vrenja (78 °C). Ker reakcija poteka počasi, dodamo po 23 urah še 0,21 g hidroksilamonijevega klorida in 420 μ L trietilamina. Po 48 urah končamo reakcijo in reakcijsko zmes uparimo. Nato dodamo zmes ledu in vode (75 mL) ter nastalo oborino odfiltriramo s presesavanjem ter speremo z malo ledene vode in posušimo.

Rezultati

Izgled: rumenkast prah

Izkoristek: 94,07 %

Rf: 0,13 (MF: kloroform/metanol=9/1, orositveni reagent: ninhidrin)

T_{tališča}: 150-152 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400MHz, DMSO-d6): δ [ppm] 2.07 (s, 3H, CH_3CO); 5.74 (s, 2H, NH_2); 7.26-7.58 (m, 4H, 4H Ar); 9.52 (s, 1H, OH); 10.03 (s, 1H, NH)

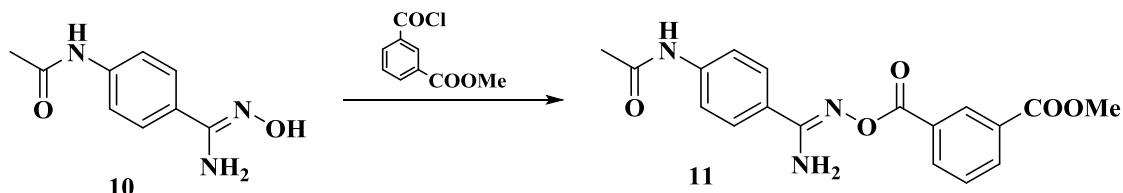
IR (cm⁻¹): 3241, 1638, 1594, 1540, 1406, 1369, 1336, 1307, 1276, 1185, 958, 837, 814, 732, 685, 611, 571, 514

MS (ESI): 193,95 [M+H]⁺, **Mr (izračunana)=**193,203

Elementna sestava: C₉H₁₁N₃O₂

4.11. Sinteza metil 3-(((4-acetamidofenil)(amino)methilen)amino)oksi)karbonil)benzoata (11)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (35 mL) raztopimo spojino **10** (1,008 mmol; 194,75 mg) in ohladimo na 0 °C ter dodamo trietilamin (1,26 mmol; 0,35 mL). Nato počasi dokapavamo metil 3-(klorokarbonil)benzoat (1,26 mmol; 0,198 mL). Po končani reakciji (45 min od začetka dokapavanja kislinskega klorida) dodamo 15 mL diklorometana in prenesemo zmes v lij ločnik. Organsko fazo speremo z vodo (3 x 20 mL) ter nasičeno vodno raztopino natrijevega klorida (20 mL). Diklorometan odparimo na rotavaporju. Čistimo s kolonsko kromatografijo (MF: kloroform/metanol=15/1).

Rezultati

Izgled: bel prah

Izkoristek: 40,2 %

Rf: 0,51 (MF: kloroform/metanol=9/1)

T_{tališča}: 120-123 °C

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d6): δ[ppm] 2.09 (s, 3H, CH₃CO); 3.92 (s, 3H, CH₃COO), 6.97 (s, 2H, NH₂); 7.66-7.75 (m, 5H, 5H Ar); 8.21-8.24 (d, 1H, J=10,8 Hz, 1H Ar); 8.50-8.52 (d, 1H, J=8,8 Hz, 1H Ar); 8.60 (s, 1H, 1H Ar); 10.17 (s, 1H, NH)

IR (cm⁻¹): 3085, 2924, 2855, 1725, 1675, 1607, 1530, 1410, 1372, 1296, 1249, 1184, 1096, 1032, 1011, 967, 926, 841, 723, 675, 577

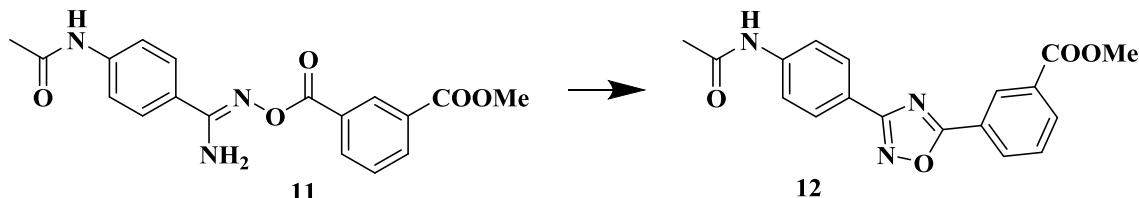
MS (ESI): 353,94 [M-H]⁺, **Mr (izračunana)=**355,34

HR-MS: 356,1246 (izračunana: 356,1251)

Elementna sestava: C₁₈H₁₇N₃O₅

4.12. Sinteza metil 3-(3-(4-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoata (12)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem toluenu (10 mL) raztopimo 90 mg spojine **11**. Segrevamo pri temperaturi vrenja (111 °C) 5 dni. Po končani reakciji odparimo topilo.

Rezultati

Izgled: rjav prah

Izkoristek: 79,63 %

Rf: 0,36 (kloroform/metanol=15/1)

T_{tališča}: 180-183 °C

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] 2.11 (s, 3H, CH₃CO); 3.95 (s, 3H, CH₃COO); 7.80-7.87 (m, 5H, 5H Ar); 8.28-8.31 (d, 1H, 1H Ar); 8.44-8.47 (d, 1H, 1H Ar); 8.29-8.33 (d, 1H, 1H Ar); 8.70 (s, 1H, 1H Ar); 10.29 (s, 1H, NH)

¹³C-NMR (75MHz, CDCl₃): δ[ppm] 23.75, 51.35, 51.54, 118.57, 121.32, 123.66, 127.49, 127.58, 128.23, 128.36, 130.24, 130.26, 131.14, 132.51, 132.79, 133.20, 139.63, 164.93, 167.55, 173.69

IR (cm⁻¹): 3315, 2963, 1722, 1676, 1605, 1547, 1527, 1479, 1435, 1412, 1363, 1295, 1252, 1178, 1100, 996, 962, 925, 841, 723, 599, 518

MS (ESI): 335,94[M-H]⁻, Mr (izračunana)=337,33

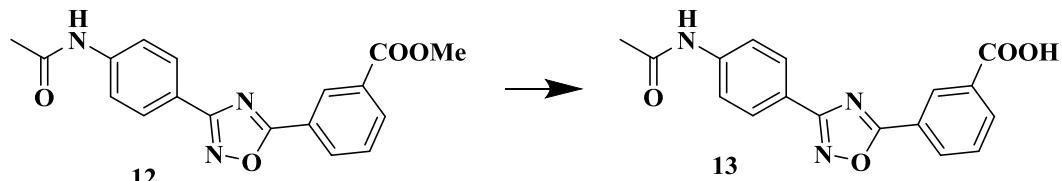
HR-MS: 338,1141 (izračunana: 338,1146)

Elementna sestava: C₁₈H₁₅N₃O₄

HPLC: čistost spojine 96,71 % pri 254 nm (t_R=8,3 min)

4.13. Sinteza 3-(3-(4-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzojske kisline (13)

Reakcija



Postopek

38 mg (0,12 mmol) spojine **9** raztopimo v 20 mL dioksana, dodamo 120 μ L 2 M raztopine natrijevega hidroksida ter pustimo mešati 3 dni pri sobni temperaturi. Po končani reakciji odparimo topilo, ostanek raztopimo v 15 mL vode in speremo s 15 mL etilacetata. Vodno fazo nakisamo s 5 M raztopino klorovodikove kisline do pH 4 ter ekstrahiramo z etilacetatom. Organsko fazo nato speremo dvakrat s 15 mL vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida, sušimo z natrijevim sulfatom, prefiltriramo ter uparimo topilo.

Rezultati

Izgled: rumen prah

Izkoristek: 31,75 %

Rf: 0,35 (diklorometan/metanol= 5/1 + 2 % ocetna kislina)

T_{tališča}: 238-240 °C

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d6): δ [ppm] 2.10 (s, 3H, CH_3CO); 7.80-7.84 (m, 3H, 3H Ar); 8.05-8.07 (d, 2H, $J=8,8$ Hz 2H Ar); 8.25-8.27 (d, 1H, $J=8,2$ Hz, 1H Ar); 8.41-7.43 (d, 1H, $J=8,4$ Hz, 1H Ar); 8.68 (s, 1H, 1H Ar); 10.28 (s, 1H, NH); *ni pik (s, 1H, COOH)

¹³C-NMR (75MHz, DMSO- d6): δ [ppm] 24.13, 113.53, 119.02, 120.18, 123.86, 127.96, 128.43, 130.16, 131.81, 132.02, 133.58, 142.32, 166.21, 167.99, 168.79, 174.44

IR (cm^{-1}): 3280, 2824, 2552, 1675, 1604, 1529, 1479, 1415, 1353, 1299, 1178, 1108, 1020, 926, 846, 717, 674, 594, 509

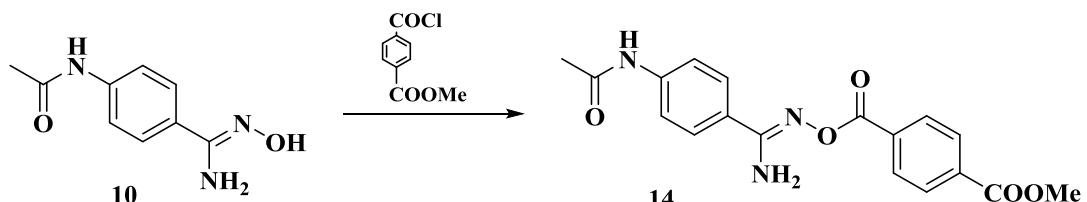
MS (ESI): 322,06[M-H]⁻, **Mr (izračunana):** 323,30

HR-MS: 322,0828 (izračunana: 322,0827)

Elementna sestava: C₁₇H₁₃N₃O₄

4.14. Sinteza metil 4-(((4-acetamidofenil)(amino)metilen)amino)oksi)karbonil)benzoata (14)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (20 mL) raztopimo 194,8 mg (1,01 mmol) spojine **10** in ohladimo na 0 °C ter dodamo 0,35 mL (1,26 mmol) trietilamina. Nato počasi dokapavamo metil 4-(klorokarbonil)benzoat (1,26 mmol v 10 mL diklorometana). Po 1 uri od začetka dokapavanja kislinskega klorida odparimo topilo ter z vodo odfiltriramo s presesavanjem. Čistimo s kolonsko kromatografijo (MF; kloroform/metanol=15/1).

Rezultati

Izgled: svetlo rjav trden produkt

Izkoristek: 51,93 %

Rf: 0,51 (kloroform/metanol=9/1)

T_{tališča}: 170-172 °C

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] 2.07 (s, 3H, CH₃CO); 3.92 (s, 3H, CH₃COO), 6.97 (s, 2H, NH₂); 7.40-7.42 (m, 4H, 4H Ar); 8.08-8.104 (d, 2H, J=8,7 Hz, 2H Ar); 8.31-8.33 (d, 2H, J=8,7 Hz, 2H Ar); 10.17 (s, 1H, NH)

IR (cm^{-1}): 3454, 3296, 3168, 1745, 1720, 1669, 1638, 1608, 1543, 1442, 1407, 1379, 1332, 1310, 1284, 1248, 1190, 1117, 1105, 1078, 1016, 959, 922, 868, 857, 840, 790, 719, 686, 675, 627, 576, 542

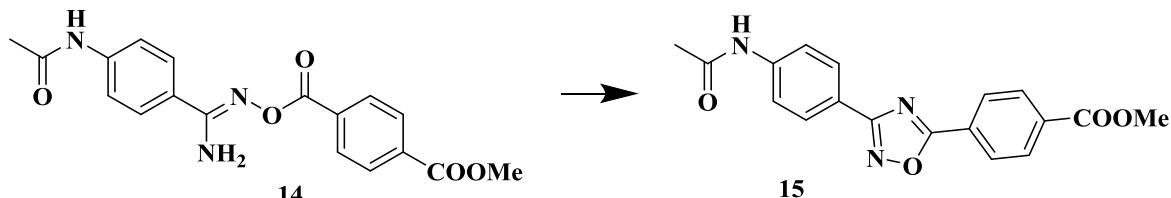
MS (ESI): 353,94[M-H]⁻, **Mr (izračunana)=355,34**

HR-MS: 354,1090 (izračunana: 354,1085)

Elementna sestava: C₁₈H₁₇N₃O₅

4.15. Sinteza metil 4-(3-(4-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoata (15)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem toluenu (10 mL) raztopimo 61 mg spojine **14**. Segrevamo pri temperaturi vrenja (111 °C) 6 dni. Po končani reakciji odparimo topilo. Čistimo s preparativno kromatografijo (MF: diklorometan/metanol=20/1).

Rezultati

Izgled: bel prah

Izkoristek: 37,99 %

Rf: 0,36 (kloroform/metanol=15/1)

T_{tališča}: 95-98 °C

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ[ppm] 2.10 (s, 3H, CH₃CO); 3.92 (s, 3H, CH₃COO); 7.80-7.83 (d, 2H, J=8,8 Hz, 2H Ar); 8.04-8.06 (d, 2H, J=8,8 Hz, 2H Ar); 8.21-8.23 (d, 2H, J=8,7 Hz, 2H Ar); 8.32-8.34 (d, 2H, J=8,7 Hz, 2H Ar); 10.29 (s, 1H, NH)

IR (cm⁻¹): 3120, 2830, 2608, 1707, 1656, 1562, 1487, 1418, 1316, 1284, 1240, 1185, 1111, 1050, 974, 926, 843, 786, 763, 741, 697, 668, 610

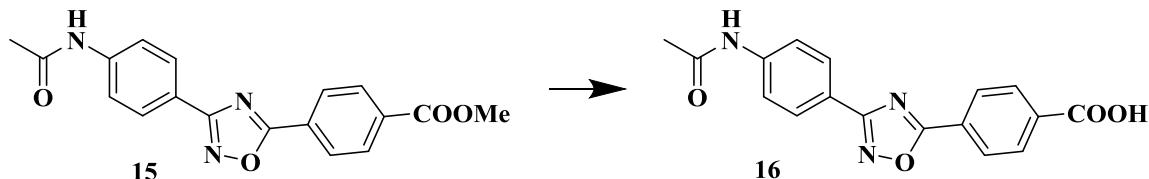
MS (ESI): 335,95 [M-H]⁻, **Mr (izračunana)=**337,33

HR-MS: 336,0984 (izračunana: 336,0987)

Elementna sestava: C₁₈H₁₅N₃O₄

4.16. Sinteza 4-(3-(4-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzojske kisline (**16**)

Reakcija



Postopek

15 mg (0,045 mmol) spojine **15** raztopimo v 20 mL dioksana, dodamo 50 μ L 2 M raztopine natrijevega hidroksida ter pustimo mešati 3 dni pri sobni temperaturi. Po končani reakciji odparimo topilo, ostanek raztopimo v 15 mL vode in speremo s 15 mL etilacetata. Vodno fazo nakisamo s 5 M raztopino klorovodikove kisline do pH 4 ter ekstrahiramo z etilacetatom. Organsko fazo nato speremo dvakrat s 15 mL vode in 15 mL nasičene raztopine natrijevega klorida, sušimo z natrijevim sulfatom, prefiltriramo ter uparimo topilo.

Rezultati

Izgled: rumen prah

Izkoristek: 34,36 %

Rf: 0,36 (diklorometan/metanol= 5/1 + 2 % ocetna kislina)

T_{tališča}: 277-279 °C

¹H-NMR (400MHz, DMSO-d6): δ [ppm] 1.23 (s, 3H, CH₃CO); 7.80-7.82 (d, 2H, J=8,8 Hz, 2H Ar); 8.04-8.06 (d, 2H, J=8,8 Hz, 2H Ar); 8.18-8.20 (d, 2H, J=8,1 Hz, 2H Ar); 8.29-8.31 (d, 2H, J= 8,5 Hz, 2H Ar); 10.29 (s, 1H, NH); 13.45 (s, 1H, COOH)

¹³C-NMR (75MHz, DMSO- d6): δ [ppm] 24.14, 119.05, 120.16, 126.73, 127.96, 128.15, 130.27, 142.36, 168.09, 168.82, 174.50

IR (cm⁻¹): 2923, 2361, 2339, 1684, 1606, 1586, 1556, 1525, 1503, 1471, 1412, 1365, 1317, 1291, 1183, 1136, 1113, 1076, 1018, 971, 928, 868, 841, 751, 723, 693, 633, 604, 554, 522 **MS (ESI):** 321,89 [M-H]⁻, **Mr (izračunana)=**323,30 **HR-MS:** 322,0821 (izračunana: 322,0828) **Elementna sestava:** C₁₇H₁₃N₃O₄

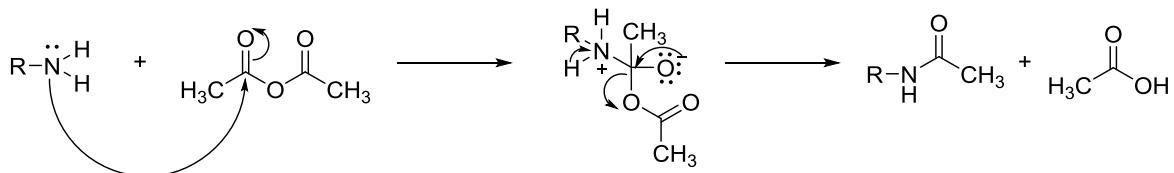
HPLC: čistost spojine 98,51 % pri 254 nm (t_R=4,7 min)

5. Rezultati in razprava

V magistrski nalogi smo sintetizirali serijo spojin, za katere smo na osnovi izvedenega strukturno podprtga načrtovanja predvidevali, da bodo zavirale človeško topo II α . V nadaljevanju bomo najprej opisali potek uporabljenih sinteznih postopkov, ki smo se jih poslužili pri sintezi načrtovanih derivatov 3,5-disubstituiranega 1,2,4-oksadiazola iz izbranih izhodnih spojin 3-aminobenzonitrila ter 4-aminobenzonitrila. Hkrati pa tudi ocenili, ali so za sintezo končnih spojin tudi najbolj optimalni.

5.1. Sinteza acetamidov **1** in **9**

Iz izhodnih spojin 3-aminobenzonitrila in 4-aminobenzonitrila smo po že preizkušenem postopku (46) sintetizirali ustreznega acetamida. N-acetiliranje smo izvedli z acetanhidridom. Mehanizem reakcije je predstavljen na sliki 16. Aminska skupina izhodnih spojin interagira s karbonilnim ogljikovim atomom acetanhidrida, nastane tetraedrični intermediat, iz katerega se nato odcepi acetatna skupina. Tako poleg ustreznih acetamidov **1** in **9** nastane tudi ocetna kislina. Aminsko skupino smo na ta način zaščitili pred nadaljnji reakcijami, saj le-ta izkazuje nukleofilne lastnosti, hkrati pa je acetamidna skupina pomembna tudi za interakcijo z vezavnim mestom topoizomeraze II α .

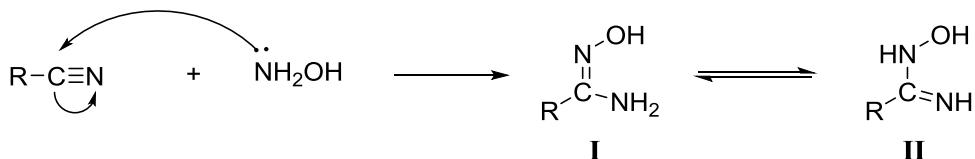


Slika 16. Shematski prikaz mehanizma nastanka acetamidov **1** in **9** (47).

Sinteza spojine **1** je potekala hitro z dokaj visokimi izkoristki (okoli 90 %), ki so bili podobni tudi pri pripravi spojine **9**. Sintetizirali smo jo po enakem postopku kot spojino **1**, vendar je tu reakcija potekala dalj časa (48 ur) za razliko od spojine **1**, kjer je bila reakcija končana v pol ure. Tako je očitna razlika med reaktivnostjo para oz. meta mesta aminske skupine v benzonitrilu, saj reakcija hitreje poteče na meta mestu kot na para, ki je bolj oddaljeno od ciano skupine, kar je posledica elektronskih vplivov te skupine. Za optimalno izvedbo reakcije smo potrebovali brezvodne pogoje, zato smo uporabili brezvodni metanol ter bučko prepihovali z argonom. Kot stranski produkt je nastajala ocetna kislina, ki smo jo v procesu izolacije spojine odparili.

5.2. Sinteza amidoksimov **2** in **10**

Pri nadaljnji pripravi amidoksimov smo prav tako sledili že znanim postopkom (46,48). Gre za reakcijo nukleofilne adicije aminske skupine hidrosilamina na elektrofilni ogljik ciano skupine na benzenovem obroču spojin **1** in **9**, kar vodi v nastanek amidoksima, kot lahko shematsko vidimo na sliki 17. Amidoksimi obstajajo v dveh tautomernih oblikah, pri čemer je bolj stabilizirana prva oblika, na sliki označena z **I** (47). Hidrosilamin smo sprostili iz hidrosilamonijevega klorida s pomočjo trietilamina, ki je nato reagiral z nitrilno skupino na benzenovem obroču.

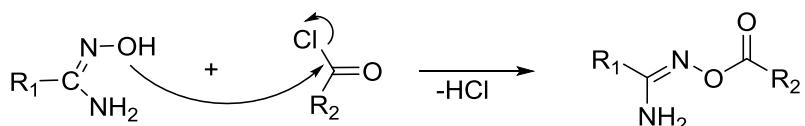


Slika 17. Mehanizem reakcije za nastanek amidoksima (49).

Izkoristek reakcije je bil pri obeh spojinah **2** in **10** nad 90 %. Pri poteku reakcije ni bilo opaznih razlik med spojinama **2** in **10**, kot je bilo to v prvem koraku sinteze. Reakcijo smo izvajali v brezvodnih pogojih, uporabili smo brezvodni etanol, trietilamin smo pred reakcijo predestilirali, prav tako pa smo v sušilniku posušili zelo higoskopen hidrosilamonijev klorid, ki smo ga pred uporabo še zdrobili v terilnici, bučko z reagenti pa smo prepihali z argonom. Ker je reakcija potekala več dni, smo vmes še dodali hidrosilamonijev klorid in trietilamin in s tem omogočili, da je reakcija potekla do konca.

5.3. Sinteza O-aciliranih amidoksimov 3, 6, 11, 14

Tretji korak v sintezi končnih spojin je bil O-aciliranje amidoksimov, ki smo jih sintetizirali v prejšnji stopnji. Kot acilirno sredstvo smo izbrali kislinski klorid, v našem primeru sta bila to metil (3-klorokarbonil)benzoat ter metil (4-klorokarbonil)benzoat, ki smo ga ob prisotnosti trietilamina nato dodajali po kapljicah amidoksimu raztopljenem v brezvodnem diklorometanu pri 0 °C. Potekla je reakcija aciliranja, kot je prikazano na **sliki 18**. Mehanistično najprej hidroksilna skupina amidoksima nukleofilno interagira s karbonilno skupino kislinskega klorida, temu sledi izstop HCl in tvorba končnega O-aciliranega amidoksima. Da smo še dodatno zagotovili brezvodne pogoje, smo bučko prepihovali z inertnim plinom argonom. O-aciliranje bi lahko namesto s kislinskim kloridom izvedli tudi z ustrezno karboksilno kislino, ki pa bi jo morali predhodno aktivirati npr. z uporabo dicikloheksilsečnine (DCC) ali 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimida (EDC) (50).



Slika 18. Mehanizem nastanka O-aciliranih amidoksimov.

Sintetizirali smo 4 različne O-acilirane spojine (3, 6, 11, 14), ki so se med sabo razlikovale po para oz. meta položajih substituentov na obeh fenilnih obročih glede na oksadiazolni obroč. Reakcije smo izvajali enako za vse štiri derivate, smo pa ugotovili, da je bil reakcijski čas za posamezne derivate različen, kar smo zasledovali s pomočjo tankoplastne kromatografije. Spojine 3, 6 in 11 so nastale v 45 min, medtem ko je reakcija za spojino 14 potekala eno uro. Najhitreje smo opazili nastajanje reagentov s pomočjo tankoplastne kromatografije pri sintezi spojine 3, najkasneje pa pri spojini 14. Tako je meta pozicija amidoksima na benzenovem obroču bolj ugodna za reakcijo, najmanj ugodna pozicija je bila na para mestu, saj je tam reakcija tekla dalj časa, najverjetneje zaradi stericnih vplivov. Kislinski klorid smo postopoma dokapavalni v reakcijsko zmes, kjer smo imeli raztopljljene amidoksime, in izvajali reakcijo pri 0 °C, da bi preprečili nastajanje stranskih produktov, bodisi N-aciliranega bodisi N,O-diaciliranega produkta. Reakcije so potekale relativno

hitro (45 min oz. 1 uro), produkte smo izolirali z ekstrakcijo z vodo in nasičeno raztopino natrijevega klorida, le v primeru spojine **14** smo topilo odparili in odfiltrirali s presesavanjem, saj s pomočjo ekstrakcije in odparevanja nismo izolirali trdnega produkta. Ni nam uspelo preprečiti nastajanja stranskih diaciliranih produktov, ki smo jih opazili kot dodatne lise na našem kromatogramu in so se nahajale pod lisami želenih produktov na kromatografski plošči. Tako smo morali vse spojine čistiti s kolonsko kromatografijo. Izkoristki reakcij so se razlikovali med posameznimi derivati in so bili po končnem čiščenju spojin med 40-50 % za spojine **3**, **11** in **14**. Le za spojino **6** je bil izkoristek pod 30 %. Da bi izboljšali izkoristke reakcij, bi morali preprečiti nastajanje diaciliranih stranskih produktov, tako da bi še bolj znižali začetno temperaturo reakcije ter upočasnili dokapavanje kislinskega klorida. Reakcijo bi lahko načrtovali tudi brez vmesne izolacije O-aciliranih amidoksimov in bi kar takoj prešli na sintezo oksadiazolnega obroča s pomočjo ciklizacije nastalih O-aciliranih amidoksimov.

5.4. Sinteza 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov **4**, **7**, **12**, **15**

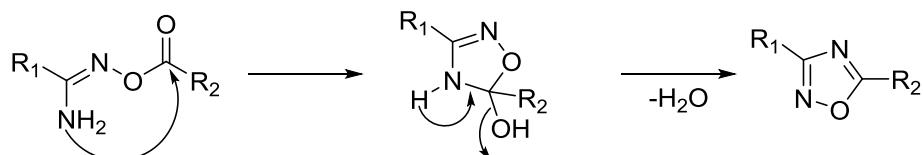
Oksadiazoli so pet členski heterociklični obroči, ki vsebujejo dva dušikova ter en kisikov atom. Glede na položaj heteroatomov ločimo štiri različne skupine oksadiazolov, ki so predstavljene na **sliki 19** (51).



Slika 19. Strukture različnih položajnih izomerov oksadiazolov (50).

Za sintezo oksadiazolnih obročev v literaturi obstaja več možnih sinteznih poti: 1,3-dipolarna cikloadicija nitrilov z nitril oksidi, kondenzacija amidoksimov s karboksilnimi kislinami in njihovimi derivati, oksidacija aldoksimov in N-substituiranih amidoksimov (50). V našem primeru smo izbrali ciklizacijo O-acilamidoksimov, ki smo jih uspeli izolirati v prejšnji stopnji sinteze. Potekla je intramolekularna kondenzacija, najprej nukleofilna adicija med aminsko skupino in acilnim karbonilnim ogljikovim atomom,

sledil je izstop vode, kot je razvidno iz prikazanega mehanizma na **sliki 20**. Načrtovane 3,5-disubstituirane 1,2,4-oksadiazole smo sintetizirali v brezvodnem toluenu pri temperaturi vrenja ($111\text{ }^{\circ}\text{C}$), za zagotovitev brezvodnih pogojev pa smo reakcijsko zmes preprihovali z argonom.

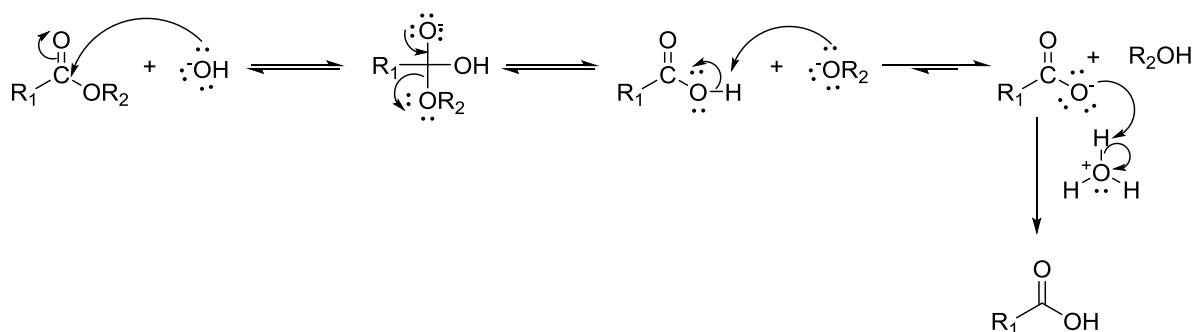


Slika 20. Mehanizem nastanka 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov (50).

Reakcija je potekala več dni, nastajanje produktov pa smo spremljali s pomočjo tankoplastne kromatografije. Uspešno smo sintetizirali 4 derivate oksadiazolov, spojine **4**, **7**, **12**, **15**. Tudi tu so se izkoristki reakcij med seboj kar precej razlikovali- najvišji izkoristek reakcije smo dobili za spojino **12** (79 %), sledila je spojina **4** s 46 %, spojini **7** in **15** pa sta imeli izkoristek reakcije okoli 30 %. Nižji izkoristki so verjetno posledica čiščenja. Spojino **4** smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije, spojini **7** in **15** pa s pomočjo preparativne kromatografije. Žal spojini **7** nismo uspeli odstraniti nečistot, kar je bilo razvidno tudi iz NMR spektrov. V teh dveh primerih nismo uspeli z nobeno mobilno fazo dovolj ločiti želenih spojin in nastalih stranskih produktov zaradi podobnih kemijskih lastnosti nečistot. Poskusili bi lahko še z metodo tekočinske kromatografije visoke ločljivosti, ki je nismo izvedli zaradi premajhne količine spojine.

5.5. Hidroliza estrov in izolacija kislin **5**, **8**, **13**, **16**

Zadnji korak sinteze končnih spojin je bila hidroliza estrov ter izolacija kislin **5**, **8**, **13** in **16**. Izvedli smo bazično hidrolizo oz. saponifikacijo estra, ki je mehanistično prikazana na **sliki 21**. Hidroksilni anion kot nukleofil interagira z elektrofilnim karbonilnim ogljikovim atomom v estru, nastane teraedrični intermediat, izstopi metoksi skupina, na katero se prenese proton nastale karboksilne kisline. Tako dobimo alkohol in ionizirano kislino, ki jo z nakisanjem pretvorimo v neionizirano obliko. Poslužili smo se alkalne hidrolize z natrijevim hidroksidom, nakisanje pa smo izvedli z raztopino 5 M HCl.



Slika 21. Mehanizem saponifikacije/bazične hidrolize estra (47).

Reakcije so med različnimi derivati potekale približno enako hitro ter trajale 3 dni, nastanek produktov smo preverjali ves čas s pomočjo tankoplastne kromatografije. Po končani reakciji smo s pomočjo ekstrakcije in nato nakisanja izolirali kisline. Uspeli smo hidrolizirati 3 estre- spojine **5**, **13**, **16**. Spojino **8** smo prav tako uspeli hidrolizirati, vendar so bile v estru prisotne nečistote, ki jih nismo uspeli odstraniti s preparativno kromatografijo že v prejšnjem koraku sinteze. Tudi tu smo poskusili očistiti produkt s preparativno kromatografijo, vendar pri tem nismo bili uspešni.

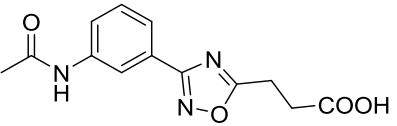
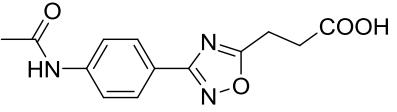
Prav tako so se zelo razlikovali izkoristki reakcij med posameznimi derivati. Najvišji izkoristek smo dobili pri sintezi spojine **5**- 61 %, pri spojinah **13** in **16** je bil izkoristek okoli 30 %.

5.6. Rezultati biološkega testiranja spojin

Za določitev zaviralne aktivnosti smo uporabili uveljavljen *in vitro* encimski test (bolj podrobno je postopek opisan v poglavju 3.2.5), ki določi, koliko je zaradi prisotnosti spojine moteno razvijanje dodatno zvitega plazmida, procesa, ki ga katalizira človeška topo II α . Kot standard smo pri testiranju uporabili etopozid, znan zaviralec človeške topo II α , ki je tudi v terapevtski uporabi. Eksperimentalno določena IC₅₀ etopozida je znašala 37,3 μM , v literaturi opisana IC₅₀ pa je 60,3 μM (52). V **preglednici III** so prikazani rezultati meritev spojin, ki so bile sintetizirane kot potencialni zaviralci bakterijske DNA giraze, ki je tudi topoizomeraza tipa II, vendar so jih zaradi podobnosti vezavnega mesta in prej opisanih izvedenih računih testirali tudi na človeški topoizomerazi II α , kot je že opisano v poglavju 2, prikazano pa je tudi na **sliki 11**. Na podlagi testiranja teh spojin so tako načrtovali razvoj novih spojin, ki smo jih sintetizirali in tudi testirali na encim topo II α .

Preglednica III: Rezultati biološkega testiranja z uporabo *in vitro* topo II α relaksacijskega testa spojin, ki so bile prvotno sintetizirane kot potencialni zaviralci bakterijske DNA giraze in testirane na topo II α ter so služile za nadaljnje načrtovanje.

Številka spojine	Oznaka spojine	Kemijske formula	Mr	logP	IC ₅₀ topo II α [μM]
	etopozid		588,56	1,12	37,3
Predhodna spojina 1	a-COOEt		303,31	2,09	>1000
Predhodna spojina 2	a-COOEt-para		303,31	2,09	>1000

Predhodna spojina 3	a-COOH SJG-4		275,26	1,49	>1000
Predhodna spojina 4	a-COOH-para		275,26	1,49	>1000

Žal nobena spojina iz te izhodne serije ni izkazovala zaviralne aktivnosti pod 1000 μM . Predvidevamo, da je glede na izračunane afinitete vezavne konformacije najverjetnejši razlog za to prevelika fleksibilnost etilenskega repa molekul. Pri vezavi se dostopne prostorske stopnje liganda namreč zmanjšajo, to pa s stališča entropije neugodno vpliva na vezavo. Zaradi ugodne postavitve 3,5-disubstituiranega 1,2,4-oksadiazola v izvedenih studijah molekulskega sidranja so te molekule vseeno služile za nadaljnje načrtovanje nove serije spojin, kot smo opisali v namenu dela, s primerjavo vezavnih konformacij nekaterih aktivnih spojin iz drugega strukturnega razreda-različnih bitiazolov, kot je razvidno iz **slike 11**.

Rezultati topo II α relaksacijskega testa serije spojin 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov, ki smo jih sintetizirali, so prikazani v **preglednici IV**. Kot lahko vidimo, je najbolj obetavna spojina **4**, za katero smo v testu relaksacijske aktivnosti določili IC_{50} vrednost 140,2 μM .

Zaviranje encima je primerljivo, čeprav še vedno manjše, z aktivnostjo zdravilne učinkovine etopozida, uveljavljenega topoizomeraznega strupa, ki ima IC_{50} vrednost za topo II α 60,3 μM (52) oziroma po naših meritvah 37,3 μM . Spojina **4** je bila tudi najboljši zadetek, ki smo ga uspeli sintetizirati na podlagi načrtovanja, kjer smo iz neaktivnih spojin uspeli načrtovati spojine z zaviralno topo II α aktivnostjo v spodnjem mikromolarnem območju. S tem smo tudi potrdili izhodno hipotezo, da uvedba rigidnega fragmenta v 1,2,4-oksadiazolni obroč prve serije preizkušenih 1,2,4-oksadiazolnih spojin lahko vodi do spojin z zaviralno topo II α aktivnostjo.

Nadalje sta spojina **5**, ki je kislinski analog spojine **4**, ter spojina **12**, ki se od spojine **4** razlikuje po para substituciji na prvem fenilnem obroču glede na oksadiazolni obroč, tudi izkazovali zaviralno aktivnost na topo II α , čeprav šibkejšo. Za spojino **5** smo določili IC_{50}

657,8 μM , IC_{50} spojine **12** pa je bil 700,6 μM . Ostale spojine niso zavirale encima oz. so bile njihove določene IC_{50} vrednosti nad 1000 μM .

Preglednica IV: Rezultati biološkega zaviranja topo II α za sintetizirane spojine iz razreda 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov.

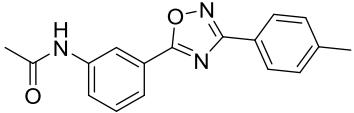
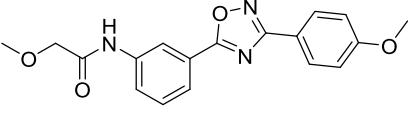
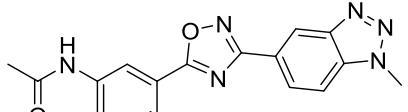
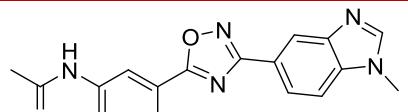
Številka spojine	Oznaka spojine	Kemijska formula	Mr	logP	IC_{50} [μM]
etopozid			588,56	1,12	37,3
3	SSB3		355,34	2,08	>1000
4	SSB4		337,33	3,11	140,2
5	SSB5		323,30	2,84	657,8
7	SSB22		337,33	3,11	>1000
8	SSB23		323,30	2,84	>1000
12	SSB9		337,33	3,11	700,6
13	SSB10		323,30	2,84	>1000

15	SSB25		337,33	3,11	>1000
16	SSB26		323,30	2,84	>1000

Nadalje smo ovrednotili tudi komercialno dostopne 3,5-disubstituirane 1,2,4-oksadiazole, ki smo jih izbrali po iskanju z uporabo spletne platforme eMolecules. Rezultati meritev zaviranja topo II α so prikazani v **Preglednici V**. Dve izbrani spojini sta imeli izmerjeni IC₅₀ vrednosti pod 1000 μM , spojina **17** z metoksi skupino na fenilnem obroču, in zanimivo tudi 1,2,4-oksadiazol **18**, ki na tem obroču nima nobene dodatne substitucije, prva z IC₅₀ vrednostjo 507,7 μM ter druga z IC₅₀ 455,3 μM .

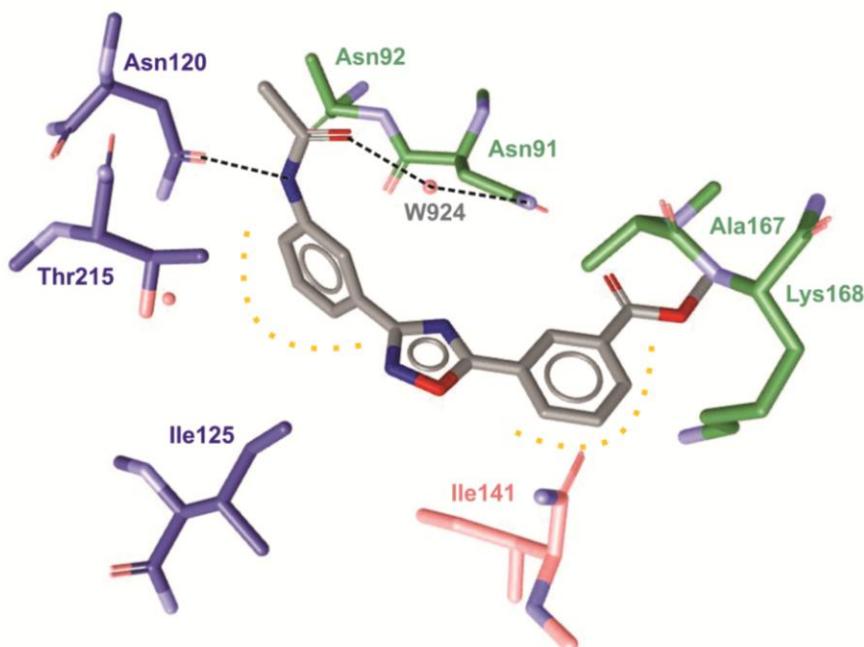
Preglednica V: Rezultati biološkega testiranja zaviranja topo II α izbranih komercialno dostopnih spojin.

Številka spojine	Oznaka spojine	Kemijska formula	Mr	logP	IC ₅₀ [μM]
etopozid			588,56	1,12	37,3
17	STK229		309,11	3,16	507,7
18	STL253012		279,10	3,29	455,3
19	STL232981		335,13	3,88	>1000

20	D400-2070		293,12	3,77	>1000
21	D400-2174		339,12	2,82	>1000
22	G944-0114		334,12	2,71	>1000
23	G945-0114		333,12	2,3	>1000

Na podlagi dobljenih rezultatov lahko sklepamo, kateri substituenti in položaji relativno glede na oksadiazolni obroč so ugodni in kateri ne za topo II α zaviralno aktivnost in postavimo prve zaključke odnosa med strukturo in delovanjem (SAR), ki bodo pomembni za nadaljnjo optimizacijo spojine **4**. Tako sintetizirane kot kupljene spojine se razlikujejo po para oz. meta položajih substituentov na fenilnih obročih vezanih na oksadiazolni obroč. Iz tega lahko ugotovimo, katera pozicija je ugodna za zaviralno dejavnost. Tako se je izkazala najbolje meta-meta substitucija fenilnih obročev vezanih na mestih 3 in 5 v 1,2,4-oksadiazolu, kot je to razvidno pri spojini **4** na sliki **22**.

Natančneje na tej sliki lahko vidimo izračunano vezavno konformacijo spojine **4** v vezavnem mestu za ATP in predvidene interakcije, ki jih tvori spojina z vezavnim mestom. Primerjava interakcijskega vzorca nehidrolizirajočega ATP analoga in vezavnega mesta za ATP topo II α je predstavljena na sliki **7**. Vezavno konformacijo smo izračunali z molekulskim sidranjem s programom GOLD in uporabili dostopno kristalno strukturo ATPazne domene človeške topo II α (45). Pri sidranju smo upoštevali tudi položaj dveh kristalnih molekul vode, ki so bile v prejšnjih vezavnih študijah raziskovalcev na Kemijskem inštitutu predpostavljene kot pomembne pri vezavi zaviralcev (29,26,34). Medmolekulska prepoznavanje smo ovrednotili tudi s programom LigandScout in izračunali na strukturi temelječ farmakoforni model, ki prikaže na bolj splošnem nivoju, kateri strukturni elementi liganda tvorijo interakcije s preiskovanim aktivnim mestom.

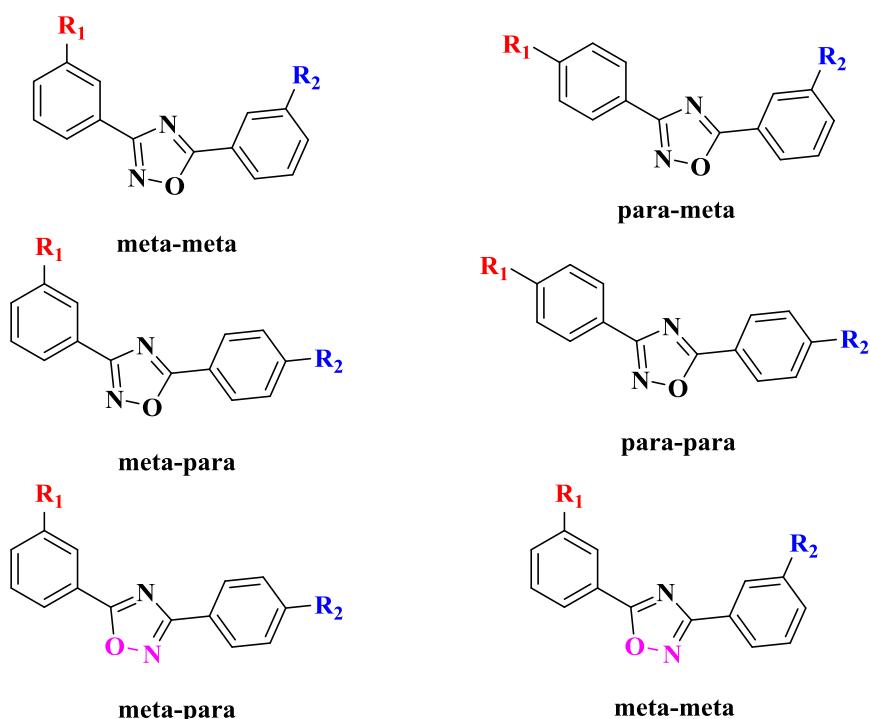


Slika 22. Izračunana vezavna konformacija sintetizirane spojine **4** iz razreda 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov s prikazanimi interkacijami v vezavnem mestu za ATP N-terminalne domene topo II α (uporabljena dostopna kristalna struktura PDB: 1ZXM). Z modro so obarvane aminokisline, ki interagirajo z adeninskim delom ATP v tej kristalni strukturi, z rdečo aminokisline, ki interagirajo s sladkorjem ter z zeleno tiste, ki interagirajo s fosfatnim delom.

Tako rumene pikice okoli fenilnih obročev prikazujejo hidrofobne interakcije, opaženi vodikovi vezi pa sta prikazani s črtkanimi črnicami, ki jih tvorita karbonilni kisik aminokislinskega preostanka Asn120 in aminska skupina acetamida spojine **4**. Druga opažena vodikova vez pa je posredna preko vmesne kristalne molekule vode W934 med karbonilno skupino molekule **4** in amidnim dušikom Asn91.

Na **sliki 23** so prikazani različni položaji substituentov na fenilnih obročih glede na oksadiazolni obroč. Para-para (spojini **15** in **16**) ter meta-para (spojini **7** in **8**) substitucija fenilnih obročev 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov se nista izkazali kot ugodni za zaviranje topo II α , prav tako ne para-meta (spojina **13**) substitucija. Iz analize vezavnih konformacij žal nismo uspeli natančno ugotoviti, kaj je bil vzrok neaktivnosti, predvidevamo pa, da je to lahko posledica neoptimalne interakcije substituenta na fenilnem

obroču. Nadalje morajo biti tudi vodikove vezi poleg ustrezne razdalje med donorjem in akceptorjem pravilno prostorsko usmerjene za zagotovitev močne vezave. Določeno vlogo za dosego zaviralne aktivnosti pa lahko igrajo tudi entropijski efekti, tako zaradi vezave liganda kot drugačne solvatacije aktivnega mesta (53).



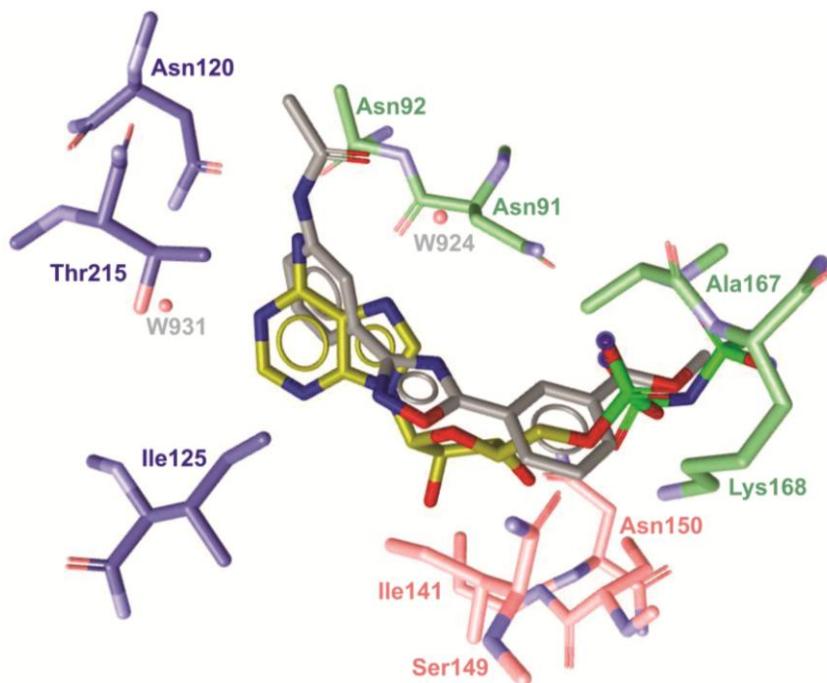
Slika 23. Različni položaji substituentov na fenilnih obročih glede na oksadiazol. Z rozo barvo sta označena kisik in dušik pri molekulah, kjer je bil položaj teh dveh atomov v oksadiazolu obrnjen (pri komercialno dostopnih spojinah).

Spojina **3**, ki je intermedijat v sintezi spojine **4**, je očitno preveč fleksibilna, da bi izkazovala zaviralno delovanje, kar potrjuje, da je za učinek potrebna rigidizacija vezi med aminsko skupino ter karbonilnim kisikom, kot to opazimo pri spojini **4**. Tu nadalje opazimo tudi analogijo z izhodnimi molekulami (predhodna spojina 1, 2, 3 in 4 v **preglednici IV**), ki so bile sintetizirane kot potencialni zaviralci DNA giraze, ki so prav tako bile preveč fleksibilne za doseg zaviralne aktivnosti na tem encimu.

Iz opravljenih testov smo tudi opazili, da so se bolje izkazale spojine z estrskimi skupinami na enem izmed fenilnih obročev vezanem na 1,2,4-oksadiazol in ne tiste, ki imajo karboksilne. Primer sta sintetizirani spojini **4**, **12**, ki imata obe esterski fragment na enem izmed fenilnih obročev v primerjavi z njunima kislinama- spojinama **5** in **13**. Tudi odsotnost substituentov na drugem fenilnem obroču lahko omogoča šibko zaviralno aktivnost, kot vidimo pri komercialno dostopni spojini **18**, ki nima na njem nobenega substituenta. Spojina **17** ima namesto metilnega estra metoksi skupino, katere uvedba prav tako omogoča zaviralno aktivnost, čeprav šibko, kot sledi iz ocenjene IC₅₀ vrednosti, ki je 507,7 μ M. Opazimo lahko tudi, da preveliki substituenti, kot sta imidazol ter triazol, na drugem fenilnem obroču niso primerni, kot se je izkazalo pri komercialno dostopnih spojin **22**, **23**, saj ti dve ne izkazujeta zaviralne aktivnosti. Prav tako tudi predolga veriga na prvem fenilnem obroču ni bila najbolj ugodna za vezavo, kot smo opazili pri komercialno dostopnih testiranih 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolih **19** in **21**. Spojina **19** ima na acetamidni del pripet še ciklopropanski obroč, spojina **21** pa ima dodatno etersko skupino na dušiku N-acetamida. Nadalje pri spojini **20**, ki se od spojine **18** razlikuje le po dodatni metilni skupini na drugem fenilnem obroču, lahko opazimo, da ta očitno ni ugodna za interakcijo z vezavnim mestom.

Ovrednotili smo tudi fizikalno-kemijske lastnosti testiranih 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov. Vrednosti dobljenih log P spojin, določenih s programom ChemDraw, so ugodne in se nahajajo v intervalu med 2,84 in 3,29. Prav tako je molekulska masa vseh spojin manjša od 500 (med 279 in 337), kar daje še veliko prostora za nadaljnjo optimizacijo in skladnost s pravilom petic, ki se uporablja pri ovrednotenju spojin vodnic in njihovi primernosti za nadaljnjo optimizacijo v terapevtsko uporabne učinkovine (54,55).

Na **sliki 24** je prikazano še prileganje sidrane spojine **4** ter eksperimentalno določene konformacije nehidrolizirajočega derivata ATP molekule (AMP-PNP) v ATP žepu N-terminalne domene topo II α kristalne strukture 1ZXM. Prikaz celotnega interakcijskega vzorca nehidrolizirajočega ATP analoga in vezavnega mesta za ATP topo II α je predstavljen na **sliki 7**.



Slika 24. Primerjava sidrane vezavne konformacije spojine **4** in nehidrolizirajočega derivata ATP molekule (AMP-PNP) v vezavnem mestu za ATP človeške topoizomeraze II α (PDB: 1ZXM). Modro obavane aminokisline interagirajo z adeninskim delom AMP-PNP, rdeče s slatkornim in zelene predstavljajo segment aktivnega mesta, ki tvori interakcije s fosfatnimi skupinami.

Vidimo lahko, da fenilna skupina z uvedeno acetamidno skupino (predvsem amidnim dušikom) oponaša adeninski del ATP molekule in omogoča interakcije s tem delom žepa, ki ga med drugimi tvorijo aminokisline Asn120, Thr215 in Ile125. Oksadiazolni fragment se umešča med adeninski in slatkorni del (aminokisline Ile141, Ser149 in Asn150). V slatkorni regiji vezavnega mesta je tudi del drugega fenilnega obroča, vezanega na oksadiazol, ki pa večinoma že sega v fosfatni žep (Ala167, Lys168 in Asn91).

Ta primerjava nam lahko tudi pomaga pri nadaljnji optimizaciji zadetkov in boljšem razumevanju, kateri deli molekule se vežejo v posamezne podžope aktivnega mesta glede na predvideno vezavo ATP na ATPazno domeno topo II α .

Trenutno pridobljeni SAR podatki kažejo, da je najbolj optimalna meta-meta pozicija fenilnih substituentov vezanih na mestih 3 in 5 na oksadiazolnem obroču s prisotno

estersko funkcionalno skupino na drugem vezanem fenilnem obroču. Iz teh podatkov, ki smo jih dobili na podlagi testiranja, lahko za konec navedemo nekaj potencialno uporabnih smernic za nadaljnjo optimizacijo. V molekuli **4** bi lahko nadomestili metoksikarbonilno skupino s trifluorometilno ali tercbutilosikarbonilno. S temi spremembami bi preiskali predvsem možnosti za izboljšano interakcijo s fosfatnim žepom vezavnega mesta za ATP. Za preiskovanje optimalne interakcije z Asn120, pa bi lahko na prvem fenilnem obroču amidno skupino reducirali do aminske.

6. Sklep

V sklopu magistrske naloge smo na osnovi strukturno podprtega načrtovanja sintetizirali in izvedli začetno *in vitro* karakterizacijo novih zaviralcev človeške DNA topoizomeraze II α , iz kemijskega razreda 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov, ki še ni bil opisan v literaturi kot nosilni skelet za zaviralce tega encima. Uspeli smo sintetizirati 8 različnih derivatov disubstituiranega 1,2,4-oksadiazola ter jih spektroskopsko analizirali. Pripravili smo: metil 3-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoat (**4**), metil 4-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoat (**7**), metil 3-(3-(4-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoat (**12**), metil 4-(3-(4-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)benzoat (**15**) ter njihove ustreznne kisline **5**, **8**, **13** in **16**.

Sintezo načrtovanih 3,5-disubstituiranih oksadizolov smo začeli s sintezo acetamidov, sledil je nastanek amidoksimov. Nato smo sintetizirali O-acilirane amidoksime, iz katerih smo pripravili s pomočjo intramolekularne ciklizacije želene 3,5-disubstituirane 1,2,4-oksadiazole. O-aciliranje amidoksimov je uspelo, nastajali so sicer tudi diacilirani stranski produkti, ki pa smo jih nato odstranili s pomočjo kolonske kromatografije. Ciklizacijo O-aciliranih spojin smo dosegli s pomočjo povišane temperature v brezvodnem toluenu. Estrske skupine na drugem fenilnem obroču glede na oksadiazol smo nato še hidrolizirali pod bazičnimi pogoji do ustreznih kislin.

Uspešno smo sintetizirali večino spojin, le spojini **7** in **8** nismo uspeli očistiti nečistot iz prejšnje stopnje reakcije. Sintezna pot je bila ustrezena, lahko pa bi jo še optimizirali in na ta način prišli do boljših izkoristkov reakcij. Predvsem bi skušali optimizirati sintezo

O-aciliranih amidokismov, spojin **3**, **6**, **11** in **14**, da bi preprečili nastajanje diaciliranih stranskih produktov.

S pomočjo *in vitro* testa topo II α relaksacijske encimske aktivnosti smo izmerili zaviralno delovanje 9 sintetiziranim spojinam (8 končnih spojin in izbrani intermediati) ter še 7 strukturno podobnim komercialno dostopnim spojinam. 2 komercialno dostopni (**17**, **18**) in 3 sintetizirane spojine (**4**, **5**, **12**) so izkazale zaviralno aktivnost na topo II α ; njihova IC₅₀ vrednost je bila pod 1000 μ M. Pri testiranju je najboljše rezultate pokazala spojina **4** z določeno IC₅₀ vrednostjo 140,2 μ M. S tem smo potrdili začetno hipotezo strukturno podprtga načrtovanja, da uvedba rigidnega fragmenta na mestu 5 na 1,2,4-oksadiazolnem obroču vodi do spojin z zaviralno aktivnostjo encima topo II α .

Ugotovili smo, da je za zaviralno aktivnost najbolj ugodna meta-meta pozicija fenilnih substituentov, vezanih na mestih 3 in 5 1,2,4-oksadiazola, ter da sintetizirane spojine v obliki estrov izkazujejo večjo zaviralo aktivnost kot kisline. Ugotovili smo tudi, kateri substituenti niso ugodni za zaviranje topo II α .

Rezultati magistrske naloge bodo uporabni pri nadalnjem načrtovanju in optimizaciji spojin tega kemijskega razreda kot potencialnih novih protirakovih učinkovin.

7. Literatura

1. World Health Organization. <http://www.who.int/cancer/en/> (dostopano: 22.2.2018)
2. Stewart BW, Wild CP: World Cancer Report 2014. Lyon: IARS Press, 2014.
3. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100: 57-70.
4. Hanahan D, Weinberg RA: Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144 (5): 646-674.
5. Serša G: Biološke in molekularne značilnosti malignih celic ter njihove tarče pri zdravljenju raka. *Farmacevtski vestnik* 2009; 60: 43-47.
6. Valjavec K, Bavcon S, Perdih A: DNA topoizomeraze pomembne tarče protirakovih zdravilnih učinkovin. *Kemija v šoli in družbi* 2018, št. 1.
7. Fortune JM, Osheroff N: Topoisomerase II as a Target for Anticancer Drugs: When Enzymes Stop Being Nice. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 2000; 64: 221-253.
8. Alberts B, et al: *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition. Garland Science, New York, 2002: 238-266, 313-315.
9. Supercoiling. <https://www.biology-online.org/dictionary/Supercoiling> (dostopano: 4. 4. 2018)
10. DNA replication. https://en.wikipedia.org/wiki/DNA_replication (dostopano: 10.1.2018)

11. Nitiss JL: Investigating the biological functions of DNA topoisomerases in eukaryotic cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1400: 63-81.
12. Bates AD, Maxwell A: DNA topology: Topoisomerases keep it simple. *Current Biology* 1997; 7: R778-R781.
13. Champoux JJ. DNA topoisomerases: Structure, Function, and Mechanism. *Annual Review of Biochemistry* 2001; 70: 396-413.
14. Pogorelčnik B, Janežič M, Perdih A: Zaviralci DNA topoizomeraze II α -pomembne tarče protirakavih učinkovin. *Farmacevtski vestnik* 2015; 66: 326-333.
15. Pommier Y, Leo E, Zhang HL, Marchand C: DNA Topoisomerases and Their Poisoning by Anticancer and Antibacterial Drugs. *Chemistry and Biology* 2010; 17: 421-433.
16. Pommier Y: DNA Topoisomerases and Cancer. Humana Press, New York, 2012: 53-69.
17. Pogorelčnik B, Perdih A, Solmajer T: Recent Advances in the Development of Catalytic Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II α Inhibitors as Novel Anticancer Agents. *Current Medicinal Chemistry* 2013; 20: 694-709.
18. Forterre P, Gribaldo S, Gadelle D, Serre MC: Origin and evolution of DNA topoisomerases. *Biochimie* 2007; 89:427-446.
19. Bollimpelli VS, Dholaniya PS, Kondapi AK: Topoisomerase II β and its role in different biological contexts. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 2017; 633: 78-84.
20. Pogorelčnik B, Perdih A, Solmajer T: Recent Developments of DNA Poisons-Human DNA Topoisomerase II α Inhibitors-as Anticancer Agents. *Current Pharmaceutical Design* 2013; 19: 2474-2488.
21. Nitiss JL: DNA topoisomerase II and its growing repertoire of biological functions. *Nature Reviews Cancer* 2009; 9: 327-337.
22. Dutta R, Inouye M: GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. *Trends in Biochemical Sciences* 2000; 25: 24-28.

23. Wendorff TJ, Schimdt BH, Heslop P, Austin CA, Berger JM: The Structure of DNA-Bound Human Topoisomerase II Alpha: Conformational Mechanisms for Coordinating Inter-Subunit Interactions with DNA Cleavage. *Journal of Molecular Biology* 2012; 424:109-124.
24. Schmidt BH, Osheroff N, Berger JM: Structure of a topoisomerase II-DNA-nucleotide complex reveals a new control mechanism for ATPase activity. *Nature Structural & Molecular Biology* 2012; 19: 1147-1154.
25. Larsen AK, Eseargueil AE, Skladanowski A: Catalytic topoisomerase II inhibitors in cancer therapy. *Pharmacology & Therapeutics* 2003; 99:167-181.
26. Pogorelčnik B, Brvar M, Žegura B, Filipič M, Solmajer T, Perdih A: Discovery of Mono- and Disubstituted 1H-pyrazolo[3,4]pyrimidines and 9H-Purines as Catalytic Inhibitors of Human DNA Topoisomerase II α . *ChemMedChem* 2015; 10: 345-359.
27. Wolber G, Langer T: LigandScout: 3-D Pharmacophores Derived from Protein-Bound Ligands and Their Use as Virtual Screening Filters. *Journal of Chemical Information and Modeling* 2005; 45: 160-169.
28. Wei H, Ruthenburg AJ, Bechis SK, Verdine GL: Nucleotide-dependent Domain Movement in the ATPase Domain of a Human Type IIA DNA Topoisomerase. *Journal of Biological Chemistry* 2005; 280: 37041-37047.
29. Pogorelčnik B: Strukturno podprto načrtovanje novih zaviralcev človeške DNA topoizomeraze II α : doktorska disertacija. Ljubljana, 2015.
30. Hande KR: Etoposide: four decades of development of a topoisomerase II inhibitor. *European Journal of Cancer* 1998; 34: 363-372.
31. SMPC Etopozid Kabi.
[http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/2FB68A42793637E8C1257CE00082F7B4/\\$File/s-014300.pdf](http://www.cbz.si/cbz/bazazdr2.nsf/o/2FB68A42793637E8C1257CE00082F7B4/$File/s-014300.pdf) (dostopano: 12.2.2018)
32. SMPC ADRIBLASTINA.
[http://www.cbz.si/zzzs/pao/bazazdr2.nsf/o/5AD816D7F06DB633C12579C2003F5D00/\\$File/s-014190.pdf](http://www.cbz.si/zzzs/pao/bazazdr2.nsf/o/5AD816D7F06DB633C12579C2003F5D00/$File/s-014190.pdf) (dostopano: 5.4.2018)

33. SMPC Savene. http://www.ema.europa.eu/docs/sl_SI/document_library/EPAR_-_Product_Information/human/000682/WC500049102.pdf (dostopano: 12.2.2018)
34. Pogorelčnik B, Brvar M, Zajc I, Filipič M, Solmajer T, Perdih A: Monocyclic 4-amino-6-(phenylamino)-1,3,5-triazines as inhibitors of human DNA topoisomerase II α . *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2014; 24: 5762-5768.
35. Imming P, Sinning C, Meyer A: Drugs, their targets and the nature and number of drug targets. *Nature Reviews* 2007; 5: 821-835.
36. Perdih A, Kotnik M, Oblak M, Šolmajer T: Uporaba računalniške kemije pri načrtovanju novih spojin vodnic. *Farmacevtski vestnik* 2010; 61: 195-202.
37. ChemOffice.
http://www.cambridgesoft.com/Ensemble_for_Chemistry/details/Default.aspx?fid=16 (dostopano: 5.4.2018)
38. Mnova, Mestrelab Research. <http://mestrelab.com/> (dostopano: 5.4.2018)
39. Jones G, Willett P, Glen RC, Leach AR, Taylor R: Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible docking. *Journal of Molecular Biology* 1997; 267: 727-748.
40. Human topoisomerase II Relaxation High Throughput Plate Assay. <https://www.inspiralis.com/assets/TechnicalDocuments/human-topo-ii-relaxation-plate-assay-protocol.pdf> (dostopano: 17.1.2018)
41. Bergant K, Janežič M, Perdih A: Bioassays and In Silico Methods in the Identification of Human DNA Topoisomerase II α Inhibitors. *Current Medicinal Chemistry* 2018; DOI: 10.2174/0929867325666180306165725.
42. Janežič M: In silico načrtovanje in ovrednotenje 1H-indazolnih zaviralcev človeške topoizomeraze II α . Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2016.
43. Nitiss JL, Soans E, Rogojina A, Seth A, Mishina M: Topoisomerase Assays. *Current Protocols Pharmacology* 2012; Unit 3.3.
44. eMolecules. <https://www.emolecules.com/> (dostopano: 13.10.2016)
45. Protein Data Bank. <https://www.rcsb.org/structure/1zxm> (dostopano: 23. 4. 2017)

46. Grah J: Sinteza derivatov 3-aminobenznonitrila s potencialnim protibakterijskim delovanjem. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2014.
47. Dewick PM: Essentials of Organic Chemistry: For Students of Pharmacy, Medicinal Chemistry and Biological Chemistry. John Wiley & Sons Ltd, New Delhi, 2006: 258, 263, 347.
48. Nadrah K: Načrtovanje, sinteza in biološko vrednotenje delovanja intergrinskih receptorjev. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2008, 32-35; 87-88.
49. Tišler M., 1991. Polarne adicije na polarne, heterogene multiple vezi. Tišler, M. ur. Organska kemija: Tretja, popravljena in dopolnjena izdaja. Tretja izdaja. Ljubljana: DZS. 195, 245
50. Jakopin Ž, Sollner Dolenc M: Recent advances in the synthesis of 1,2,4- and 1,3,4 oxadiazoles. Current organic chemistry 2008; 12: 850-898.
51. Kaboudin B, Kazemi F, Pirouz M, Khoshkhoo AB, Kato J, Yokomatsu T: Iron(III) Chloride/L-Proline as an Efficient Catalyst for the Synthesis of 3-Substituted 1,2,4-Oxadiazoles from Amidoximes and Triethyl Orthoformate. Synthesis 2016; 48: 3597-3602.
52. Huang ZS et al.: Synthesis and evaluation of mansonone F derivate as topoisomerase inhibitors. European Journal of Medicinal Chemistry 2011; 46: 3339-3347.
53. Ajay, Murcko MA: Computational Methods to Predict Binding Free Energy in Ligand-Receptor Complexes. Journal of Medicinal Chemistry 1995; 38: 4953-4967.
54. Lipinski CA: Lead- and drug-like compounds: the rule-of-five revolution. Drug Discovery Today: Technologies 2004; 1: 337-341.
55. Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ: Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. Advanced Drug Delivery Reviews 1997; 23: 3-25.

8. Priloga A

Preglednica VI: Razdelitev družine encimov topoizomeraz (14,13).

Družina	Ime topoizomeraze (izolirana iz)	Funkcija	Potrebna prisotnost ATP, kovin
IA	Bakterijska DNA topoizomeraza I (<i>Escherichia coli</i>)	Odstrani negativne zavoje, vendar ne pozitivnih superzank	Mg^{2+}
	Bakterijska DNA topoizomeraza III (<i>Escherichia coli</i>)		
	Kvasovkina DNA topoizomeraza III (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)		
	Človeška DNA topoizomeraza III α (<i>Homo sapiens</i>)		
	Človeška DNA topoizomeraza III β (<i>Homo sapiens</i>)		
	Bakterijska in arhejska reverzna DNA giraza (<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)		
	Bakterijska reverzna DNA giraza (<i>Methanopyrus kandleri</i>)		
IB	Evkarijantska DNA topoizomeraza I (<i>Homo sapiens</i>)	Odstrani pozitivne in negativne superzanke	/
	Poksivirusna topoizomeraza (<i>Vaccinia</i>)	/	
	Bakterijska DNA topoizomeraza V (<i>Methanopyrus kandleri</i>)	/	
IC	Arhejska DNA topoizomeraza V (<i>Methanopyrus kandleri</i>)	Sprosti pozitivne in negativne superzanke, vpletena v popravilo DNA	/

IIA	Bakterijska DNA giraza (<i>Escherichia coli</i>)	Generira negativne superzanke (edina topoizomeraza, ki to počne)	Mg^{2+} , ATP
	Bakterijska DNA topoizomeraza IV (<i>Escherichia coli</i>)	Sprosti negativne superzanke	
	Kvasovkina DNA topoizomeraza II (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	/	
	Človeška DNA topoizomeraza II α (<i>Homo sapiens</i>)	Razplete prepletene hčerinske duplekse pri replikaciji, prispeva k sprostitvi DNA med replikacijo	
	Človeška DNA topoizomeraza II β (<i>Homo sapiens</i>)	Vloga pri preprečevanju rekombinacije ali podpore transkripcije v nevronih	
IIB	Arhejska DNA topoizomeraza VI (<i>Sulfolobus shibatae</i>)	Sprosti pozitivne in negativne superzanke	Mg^{2+} , ATP
	Rastlinska DNA topoizomeraza VI (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	/	

Preglednica VII: Nekatere izbrane zdravilne učinkovine iz skupine zaviralcev DNA topoizomeraz II (14).

UČINKOVINA	ZDRAVILO	MEHANIZEM DELOVANJA	INDIKACIJA
 Etopozid	EBEPPOSID, EPOSIN, Etopozid Accord, Etopozid Kabi, Vepesid	Interkalirajoči stup	rak testisov, rak pljuč, limfom, akutna mielotična levkemija
 Doksorubicin	CAELYX, DEBDOX, Doksorubicin Accord, Doksorubicin Teva, Myocet, Xorucin	Interkalator	levkemija, limfom, sarkom
 Epirubicin	EPIRUBICIN EBEWE, Epirubicinijev klorid PHC, Episindan	Interkalator	sarkom mehkih tkiv, levkemija, hormonsko neodvisni rak prostate
 Idarubicin	ZAVEDOS	Interkalator	akutna nelimfoblastna levkemija, akutna limfoblastna levkemija
 Mitoksantron	NOVANTRONE, ONKOTRONE	Interkalator	multipla skleroza, rak dojke, levkemija