

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA ZOTTER

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIALNA FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

ŠPELA ZOTTER

**SINTEZA 3,5-DISUBSTITUIRANIH 1,2,4-OKSADIAZOLOV S
POTENCIJALNIM PROTIMIKROBNIM DELOVANJEM**

**SYNTHESIS OF 3,5-DISUBSTITUTED 1,2,4-OXADIAZOLES WITH
POTENTIAL ANTIBACTERIAL ACTIVITY**

Ljubljana, 2016

Magistrsko naložko sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani, elementno analizo pa so opravili na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem svoji mentorici, prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm. za ves trud in strokovno pomoč. Poleg tega se zahvaljujem vsem sodelavcem na Katedri za farmacevtsko kemijo, predvsem pa tehnični sodelavki Damijani Zalar, za odgovore na vsa moja vprašanja. Prav tako gre zahvala mojim prijateljem za zabavne trenutke, ki smo jih preživeli skupaj. Nazadnje se zahvaljujem svoji družini in fantu, ki so mi stali ob strani in me spodbujali tekom celotnega študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko naložko izdelala samostojno, pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

Ljubljana, 2016

Špela Zotter

Predsednik magistrske komisije: izr. prof. dr. Mojca Kerec Kos

Član magistrske komisije: doc. dr. Rok Dreu

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
 1.1. BAKTERIJSKA ODPORNOST	1
 1.2. PROTIMIKROBNE SNOVI	2
 1.3. MOLEKULA DNA.....	3
1.3.1. ZGRADBA DNA	3
1.3.2. PODVOJEVANJE DNA PROKARIOTSKIH CELIC	4
1.3.3. TOPOLOGIJA DNA.....	5
 1.4. ENCIMI TOPOIZOMERAZE.....	5
1.4.1. DNA-GIRAZA	6
 1.4.1.1. Delovanje DNA-giraze	6
 1.5. ZAVIRALCI DNA-GIRAZE.....	7
1.5.1. ZAVIRALCI PODENOTE A DNA-GIRAZE.....	8
 1.5.1.1. Fluorokinoloni	8
1.5.2. ZAVIRALCI PODENOTE B DNA-GIRAZE	10
 1.5.2.1. Aminokumarini	10
 1.5.2.2. Ciklotialidini	12
 1.5.2.3. Ostali zaviralci.....	13
2. NAČRT DELA	16
3. MATERIALI IN METODE.....	17
 3.1. MATERIALI.....	17
3.1.1. REAGENTI IN TOPILA	17
 3.2. METODE	17
3.2.1. KROMATOGRAFSKE METODE.....	17
 3.2.1.1. Tankoplastna kromatografija	17
 3.2.1.2. Kolonska kromatografija	17
 3.2.1.3. Mobilne faze	17
3.2.2. SPEKTROSKOPSKE METODE.....	18
 3.2.2.1. Jedrska magnetna resonanca (NMR).....	18
 3.2.2.2. Infrardeča spektroskopija (IR).....	18
 3.2.2.3. Masna spektrometrija (MS)	18
3.2.3. ELEMENTNA ANALIZA (CHN).....	18
3.2.4. DOLOČEVANJE TEMPERATURE TALIŠČA	18

3.2.5. RISANJE KEMIJSKIH STRUKTUR IN POIMENOVANJE SPOJIN	18
3.2.6. BIOLOŠKO TESTIRANJE	18
4. EKSPERIMENTALNI DEL.....	20
4.1. REAKCIJSKA SHEMA	20
4.2. SINTEZNI POSTOPKI	21
4.2.1. SINTEZA ETIL 5-{[(TERC-BUTILOKSIKARBONIL)AMINO]METIL}-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA.....	21
4.2.2. SINTEZA SOLI [3-(ETOJSIKARBONIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL]METAN AMINA IN TRIFLUOROOCETNE KISLINE.....	22
4.2.3. SINTEZA ETIL 5-[(1H-INDOL-2-KARBOKSIAMIDO)METIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA	23
4.2.4. SINTEZA ETIL 5-[(4-CIANOBENZAMIDO)METIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA	24
4.2.5. SINTEZA ETIL 5-[(2-ETOKSI-2-OKSOACETAMIDO)METIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA	26
4.2.6. SINTEZA 3-[(t-BUTILOKSIKARBONIL)AMINO]PROPANOJSKE KISLINE	
27	
4.2.7. SINTEZA ETIL 5-{[(t-BUTILOKSIKARBONIL)AMINO]ETIL}-1,2,4-OKSADIAZOL-3- KARBOKSILATA	28
4.2.8. SINTEZA SOLI 2-[3-(ETOJSIKARBONIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL]ETAN-1- AMINA IN TRIFLUOROOCETNE KISLINE.....	29
4.2.9. SINTEZA ETIL 5-[2-(1H-INDOL-2-KARBOKSIAMIDO)ETIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA	30
4.2.10. SINTEZA ETIL 5-[2-(4-CIANOBENZAMIDO)ETIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA	31
4.2.11. SINTEZA ETIL 5-[2-(2-ETOKSI-2-OKSOACETAMIDO)ETIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA	32
4.2.12. SINTEZA 5-[2-(1H-INDOL-2-KARBOKSIAMIDO)ETIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILNE KISLINE	34
4.2.13. SINTEZA 5-[2-(4,5-DIBROMO-1H-PIROL-2-KARBOKSIAMIDO)ETIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA	35
4.2.14. SINTEZA 4-[(t-BUTILOKSIKARBONIL)AMINO]BUTANOJSKE KISLINE	36
4.2.15. SINTEZA ETIL 5-{[(T-BUTILOKSIKARBONIL)AMINO]ETIL}-1,2,4-OKSADIAZOL-3- KARBOKSILATA	37
4.2.16. SINTEZA SOLI 3-[3-(ETOJSIKARBONIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL]PROPAN-1-AMINA IN TRIFLUOROOCETNE KISLINE	38

4.2.17. SINTEZA ETIL 5-[3-(1H-INDOL-2-KARBOKSIAMIDO)PROPIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA	39
4.2.18. SINTEZA ETIL 5-[3-(4-CIANOBENZAMIDO)PROPIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA	41
4.2.19. SINTEZA ETIL 5-[3-(2-ETOKSI-2-OKSOACETAMIDO)PROPIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA	42
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	44
5.1. ZAŠČITA AMINSKIH SKUPIN AMINOKISLIN Z BOC SKUPINO	44
5.2. SINTEZA 3,5-DISUBSTITUIRANIH 1,2,4-OKSADIAZOLOV	44
5.3. ODSTRANITEV BOC SKUPINE S TRIFLUOROOCETNO KISLINO.....	46
5.4. TVORBA AMIDOV	47
5.4.1. TVORBA AMIDOV S POMOČJO KARBODIIMIDNIH REAGENTOV	48
5.4.2. TVORBA AMIDOV S POMOČJO TCT.....	49
5.4.3. TVORBA AMIDOV S KISLINSKIMI KLORIDI	51
5.5. HIDROLIZA ESTRA.....	52
5.6. BIOLOŠKO TESTIRANJE.....	53
6. SKLEPI	55
7. LITERATURA	57

KAZALO SLIK

Slika 1: Zgradba molekule DNA (Povzeto po 4).	4
Slika 2: Podvojevanje DNA in dodatno zvitje molekule (prirejeno po 9).	5
Slika 3: a) Struktura encima tipa IIA iz <i>S. cerevisiae</i> v kompleksu z DNA, b) Delovanje encima topoizomeraze tipa IIA (povzeto po 12).	7
Slika 4: Fluorokinolonske protimikrobne učinkovine (povzeto po 15).	9
Slika 5: Struktura novobiocina in klorobiocina (prirejeno po 14).	10
Slika 6: Vezava novobiocina v vezavno mesto encima DNA-giraze (povzeto po 14).	11
Slika 7: Simociklinon D8 (povzeto po 17).	12
Slika 8: Strukturi ciklotialidina in seco-ciklotialidina (povzeto po 14).	13
Slika 9: Struktura tetracikličnega fenolnega derivata (povzeto po 20).	13
Slika 10: Struktura 1,3,5-triazinskega derivata (povzeto po 14).	14
Slika 11: Strukture 4-amino pirazolo pirimidinskih in 4-amino pirazolo triazinskih derivatov (povzeto po 14).	14
Slika 12: Struktura pirolo amidnih derivatov (povzeto po 20).	15
Slika 13: Indazolno ogrodje in strukture indazolnih derivatov (povzeto po 14).	15
Slika 14: Struktura aminobenzoimidazolnih derivatov (povzeto po 14).	15
Slika 15: Osnovna struktura potencialnih zaviralcev DNA-giraze	16
Slika 16: Zaščita aminske skupine z BOC skupino.	44
Slika 17: Aktivacija karboksilne kisline.	45
Slika 18: Nastanek kislinskega anhidrida.	45
Slika 19: Nastanek 1,2,4-oksadiazolnega obroča.	46
Slika 20: Odstranjevanje BOC zaščite.	47
Slika 21: Nastanek amidne vezi.	47
Slika 22: Nastanek amida s pomočjo EDC.	48
Slika 23: Nastanke amida ob dodatku HOBr (zgoraj), nastanek N-acil sečnine (spodaj).	49
Slika 24: Aktivacija TCT.	50
Slika 25: Tvorba amida s pomočjo TCT.	50
Slika 26: Tvorba amida s kislinskim kloridom.	51
Slika 27: Hidroliza estra.	52
Slika 28: Dekarboksilacija spojine 7b.	52

POVZETEK

Razvoj novih protimikrobnih učinkovin je v današnjem času ključnega pomena zaradi naraščanja odpornosti na že obstoječe antibiotike. Encim DNA-giraza je dandanes eden izmed poglavitnih tarč za načrtovanje novih protimikrobnih snovi, saj ima vlogo pri življensko pomembnih procesih, kot sta podvojevanje in prepisovanje molekule DNA, kjer uravnava njeno topološko stanje. Njegovo zavrto delovanje vodi do celičnega propada. Encim je zgrajen iz dveh podenot GyrA in dveh podenot GyrB. Edini že obstoječi zaviralci DNA-giraze so fluorokinoloni, ki delujejo na podenoto A. Na zavircih, ki delujejo na podenoto B pa trenutno še potekajo številne raziskave. Tudi mi smo se odločili, da v sklopu magistrske naloge sintetiziramo potencialne zaviralce DNA-giraze z delovanjem na podenoto B.

S pomočjo računalniškega programa FlexX (LeadIT 2.1.3 (BioSolveIT)) in na podlagi že poznane povezave med strukturo in delovanjem spojin na podenoto B encima DNA-giraze smo se odločili za sintezo spojin z 1,2,4-oksadiazolnim ogrodjem, ki smo ga na mestu 5 substituirali s karboksilno skupino. Aminsko skupino, vezano na mestu 3 v oksadiazolu pa smo pretvorili v ustrezne amide z uporabo 2-indol karboksilne kislino, 4,5-dibromopirol-2-karboksilne kislino, etil oksalil klorida oz. 4-ciano benzoil klorida. Sintezo smo začeli s tremi aminokislinami: glicinom, β -alaninom in 4-aminobutanojsko kislino, katerim smo z BOC skupino zaščitili aminske skupine. Sledila je ciklizacija do 1,2,4-oksadiazolnega obroča ob dodatku etil 2-oxsiiminooksamata, odstranitev BOC zaščite s trifluoroocetno kislino ter tvorba amidne vezi z zgoraj omenjenimi kislinami in kislinskimi kloridi. Na koncu smo želeli spojine hidrolizirati do karboksilnih skupin, vendar smo ugotovili, da so le-te podvržene spontani dekarboksilaciji. Spojine iz druge, predzadnje in zadnje stopnje sinteze smo testirali na encim DNA-girazo, pri čemer nobena izmed testiranih spojin ni izkazovala inhibicije pri koncentracijah nižjih od 100 μM . Sklepamo lahko, da bi bili rezultati boljši, če bi uspeli ohraniti stabilnost hidroliziranim spojinam.

KLJUČNE BESEDE

DNA-giraza, protimikrobne snovi, zaviralci, 1,2,4-oksadiazol

ABSTRACT

The development of new antibacterial drugs is very important nowadays due to increasing resistance to antibiotics in use. The enzyme DNA-gyrase is one of the main targets for new antibacterial drug design because of its roll in vital processes such as replication and transcription where it regulates the topological state of the DNA molecule. DNA-gyrase inhibition leads to cell death. The enzyme consists of two subunits GyrA and two subunits GyrB. The only DNA-gyrase inhibitors currently in use are fluoroquinolones which operate on subunit A. Inhibitors which operate on subunit B are still in research. For the purpose of the master's thesis, we decided to synthesize the potential DNA-gyrase inhibitors that operate on subunit B.

Using the computer programme FlexX (LeadIT 2.1.3 (BioSolveIT)) and based on the known structure-activity relationship of compounds to subunit B of DNA-gyrase, we decided to synthesize compounds with a 1,2,4-oxadiazole frame, substituted with carboxylic acid in position 5. The amino group in position 3 of the oxadiazole ring was also converted to adequate amides by using indole-2-carboxylic acid, 4,5-dibromo pyrrole-2-carboxylic acid, ethyl oxalyl chloride or 4-cyanobenzoyl chloride. The synthesis started with three amino acids: glycine, β -alanine and 4-aminobutanoic acid of which the amino groups were protected by the BOC group. Later we performed the cyclization to 1,2,4-oxadiazole ring by adding ethyl 2-oxyiminooxamate, followed by the removal of the BOC protection group with trifluoroacetic acid. We wanted to hydrolyse compounds to carboxylic acids in the last phase of the synthesis, but we realized that they are subjected to spontaneous decarboxylation. Compounds of the second, penultimate and last phase of the synthesis were tested on the enzyme DNA-gyrase. None of the tested compounds showed the inhibition at the concentration lower than 100 μM . We can conclude that the results would have been better if we had managed to maintain the stability of hydrolyzed compounds.

KEYWORDS

DNA-gyrase, antibacterial substances, inhibitors, 1,2,4-oxadiazole

SEZNAM OKRAJŠAV

ATP: adenozin trifosfat

BOC: *terc*-butiloksikarbonil

CHN: elementna analiza

DCC: N,N-dicikloheksil karbodiimid

DMSO-d₆: devterirani dimetilsulfoksid

DNA: deoksiribonukleinska kislina

E. coli: *Escherichia coli*

EDC: 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid

ESI: ionizacija z razprševanjem v električnem polju

GyrA: podenota A encima DNA-giraze

GyrB: podenota B encima DNA-giraze

HOBr: hidroksibenzotriazol

HRMS: masna spektrometrija visoke ločljivosti

kDa: kilo dalton

Mf: mobilna faza

Mr: molekulska masa

MRSA: proti meticilinu odporni *Staphylococcus aureus*

MS: masna spektrometrija

NMM: N-metilmorfolin

NMR: jedrska magnetna resonanca

RA: rezidualna aktivnost

Rf: retencijski faktor

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

S. cerevisiae: *Saccharomyces cerevisiae*

TBTU: 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminijev tetrafluoroborat

TCT: 2,4,6-trikloro-1,3,5-triazin

Špela Zotter: Sinteza 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov s potencialnim protimikrobnim delovanjem.

TFA: trifluoroocetna kislina

TLC: tankoplastna kromatografija

1. UVOD

Doba protimikrobnih učinkovin se je začela z odkritjem penicilina (leta 1929) in sulfonamidov (leta 1935) ter, zaradi velikih potreb po njih, zacetela med drugo svetovno vojno. Takratno prepričanje, da je infekcijskih bolezni konec, je bilo zmotno, saj so se prvi sevi patogenih bakterij, ki so odporni na to vrsto zdravil, pojavili le nekaj let po njihovem odkritju. Da bi racionalizirali uporabo protimikrobnih učinkovin so, predvsem na področju veterinarskih zdravil, umaknili številne protimikrobne učinkovine z enako oz. podobno strukturo in mehanizmom delovanja, ki se uporablja že v humani medicini. Kljub temu je uporaba protimikrobnih učinkovin še vedno prevelika, kar je tudi glavni razlog za razvoj odpornosti nanje. V sklopu boja proti patogenim bakterijam potekajo mnoge raziskave za razvoj novih učinkovitih protimikrobnih spojin naravnega, polsinteznega ali v celoti sinteznega izvora. Prav tako se poslužujemo genskega inženiringa za izdelavo spojin z izboljšanimi lastnostmi, s katerimi bomo lahko povečali zaščito pred patogenimi sevi bakterij (1, 2).

1.1. BAKTERIJSKA ODPORNOST

Bakterijska odpornost predstavlja velik svetovni problem. Z večanjem uporabe protimikrobnih učinkovin se veča tudi verjetnost za razvoj odpornosti nanje. Največ protimikrobnih učinkovin se uporablja v bolnišnicah, kjer je tveganje za razvoj odpornosti bakterij največje (2). Odpornost se pojavlja pri vseh bakterijskih vrstah, največji problem pa so bolnišnične okužbe povzročene s strani Gram pozitivnih bakterij, med katerimi so enterokoki najpomembnejši (3). Vzroki za pojav odpornosti so prekomerna uporaba protimikrobnih učinkovin, tako v humani medicini, predvsem pa na področju veterine ter slabša kakovost zdravil v razvijajočih se državah. Veliko je tudi primerov napačne uporabe protimikrobnih učinkovin, predvsem ko se predpisujejo za virusne okužbe dihal (2).

Pridobitev bakterijske odpornosti na protimikrobne snovi poteka preko mutacij. Ker se bakterije razmnožujejo zelo hitro, je možnost mutacij pogosta, s tem pa je pogost tudi pojav odpornosti na neko snov. To je tudi razlog, da morajo pacienti dokončati zdravljenje z antibiotiki, čeprav se njihovi simptomi izboljšajo še pred koncem. Če se zdravljenje ustavi prehitro, imajo preživele bakterijske celice možnost podvojevanja ter nastanek novih celic, odpornih na originalno zdravilo. Mutacije pa lahko nastanejo tudi brez prisotnosti učinkovine. Odpornost se lahko prenese tudi med bakterijskimi celicami, s prenosom genskih informacij (4).

Za zmanjšanje bakterijske odpornosti bi bilo potrebno omejiti uporabo protimikrobnih učinkovin. Z večjim sodelovanjem med medicinsko in farmacevtsko stroko ter večjo ozaveščenostjo bolnikov bi lahko zmanjšali njihovo napačno uporabo (2). Poleg tega bi bilo v prihodnosti potrebno vložiti veliko truda v identifikacijo novih tarč ter raziskave in razvoj novih protimikrobnih učinkovin z novimi mehanizmi delovanja. Najbolj obetavne so učinkovine, ki imajo več mehanizmov delovanja ter kombinirane učinkovine s sinergističnim delovanjem, ker je pojav odpornosti nanje manj verjeten. Vzrok za pridobitev odpornosti bakterij v okolju je tudi izločanje velike količine aktivnih metabolitov učinkovin iz telesa bolnikov. Z načrtovanjem molekul z vgrajenim mehanizmom za samo-uničenje bi preprečili ta pojav (4).

1.2. PROTIMIKROBNE SNOVI

Glede na njihov izvor protimikrobne snovi delimo na *antibiotike* - to so naravni produkti mikroorganizmov ali njihovi polsintezni derivati, ki zavirajo razmnoževanje drugih mikroorganizmov ali jih uničujejo in se uporablajo za zdravljenje bakterijskih okužb, ter *kemoterapevtike* - sintezno pridobljene učinkovine z enakim delovanjem (5). Baktericidne protimikrobne snovi bakterije uničijo, bakteriostatične pa zavirajo njihovo razmnoževanje. Delujejo lahko na širok spekter bakterij, kar pomeni tako na po Gramu pozitivne, kot tudi na po Gramu negativne bakterije, na ozek spekter bakterij, kar pomeni le na po Gramu pozitivne ali negativne bakterije, ali le proti določenemu mikroorganizmu oz. bolezni (1).

Protimikrobne snovi, ki se uporabljajo v klinične namene, morajo imeti čim več naslednjih lastnosti (1):

- širok spekter delovanja,
- nizka toksičnost,
- brez neželenih učinkov,
- nealergeni,
- neškodljivi do mikroflore gostitelja,
- enostavni in poceni za izdelavo,
- stabilni,
- dobre farmakokinetične lastnosti,
- majhna verjetnost za pojav odpornosti.

Protimikrobne snovi delujejo po enem izmed naslednjih mehanizmov (4):

- Zaviranje celičnega metabolizma (primer: sulfonamidi)

Na metabolizem bakterijskih celic delujejo t.i. antimetaboliti. Le-ti zavirajo encimsko-katalizirane reakcije, ki potekajo le v bakterijskih celicah in tako ne vplivajo na gostitelja. Njihova tarča so bakterijski encimi katere zavirajo, zaradi česar je preprečena sinteza esencialnih snovi za bakterije. V primeru, da podobne metabolne poti potekajo tudi v človeških celicah, morajo delovati selektivno.

- Zaviranje sinteze celične stene (primer: penicilini, cefalosporini)

Zaviralci sinteze celične stene z zaviralnim delovanjem na encim transpeptidazo preprečujejo izgradnjo celične stene, ki je za bakterije nujno potrebna. Ta mehanizem vodi v razpad in smrt bakterijskih celic. Takšen tip učinkovin ne vpliva na človeške celice, ker celične stene nimajo.

- Interakcija s celično membrano (primer: valinomicin)

Učinkovine, ki interagirajo s celično membrano, vplivajo na njeno permeabilnost, kar vodi v celično smrt.

- Motnja sinteze proteinov (primer: aminoglikozidi, tetraciklini)

Učinkovine v tej skupini se vežejo na bakterijske ribosome in zavirajo proces prevajanja. Proteini, ki so življensko pomembni za celico, se posledično ne morejo več sintetizirati.

- Zaviranje podvojevanja in prepisovanja nukleinskih kislin (primer: fluorokinoloni)

Protimikrobne snovi se vežejo na nukleinske kisline v celici in s tem preprečijo delitev celice ali sintezo življensko pomembnih proteinov.

V zadnjo skupino protimikrobnih snovi prištevamo tudi zaviralce DNA-giraze, encima, ki sodeluje pri procesih, kot sta podvojevanje in prepisanje, kjer se verigi molekule DNA ločita. V nadaljevanju bomo povedali nekaj več o molekuli DNA, procesu podvojevanja in vlogi DNA-giraze pri tem.

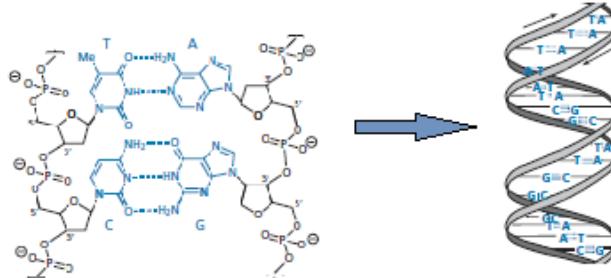
1.3. MOLEKULA DNA

1.3.1. ZGRADBA DNA

DNA sestoji iz dveh polinukleotidnih komplementarnih verig, ovitih druga okrog druge, ki sestavlja dvojno desno vijačnico. Verigi sta antiparalelni, kar pomeni, da tečeta v nasprotni smeri. Osnovni gradniki-nukleotidi, so sestavljeni iz ogljikovega hidrata-deoksiriboze, purinske (adenin, gvanin) ali pirimidinske (citozin, timin) dušikove baze in fosfata. Nukleotidi so med

seboj povezani preko fosfatnih skupin s 3',5'-fosfodiestrsko vezjo. Tako tvorijo kovalentno ogrodje obeh posameznih verig DNA, ti pa sta med seboj povezani z vodikovimi vezmi, ki se tvorijo med pari komplementarnih baz. K dodatni stabilizaciji molekule pripomorejo van der Waalsove vezi in hidrofobne interakcije, ki potekajo med dušikovimi bazami vzdolž verige.

Slika 1 prikazuje zgradbo molekule DNA (4, 6).



Slika 1: Zgradba molekule DNA (Povzeto po 4).

1.3.2. PODVOJEVANJE DNA PROKARIOTNSKIH CELIC

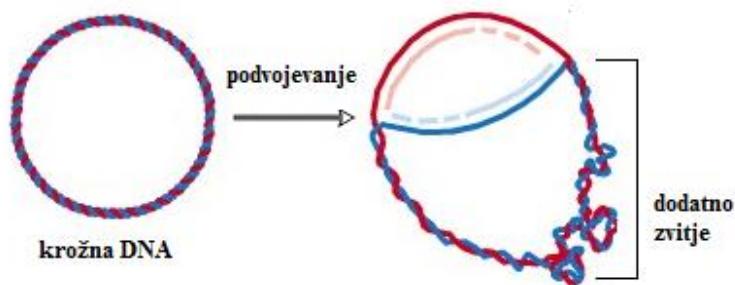
Pri podvojevanju DNA služita obe verigi kot matrici, da se sintetizira nova molekula DNA, ki je sestavljena iz ene originalne in ene na novo nastale verige. Podvojevanje DNA se prične na točno določenem mestu molekule ter poteka v obe smeri. Nastanku replikacijskih vilic sledi nastanek replikacijskega mehurčka, ki se veča, vse dokler se replikacijske vilice, ki potekajo iz obeh strani krožne DNA, ne srečajo (6).

Za začetek podvojevanja je potreben encim helikaza, ki prepozna mesto za izhodišče podvojevanja, se nanj veže in s prekinivijo vodikovih vezi med baznimi pari omogoča razpiranje dvojne vijačnice. Zaradi odvijanja dvojne vijačnice na enem mestu je preostali del molekule izpostavljen veliki napetosti, ki jo zmanjšujejo encimi topoizomeraze z začasnimi cepitvami ene ali obeh verig dvojne vijačnice. Topoizomeraze bomo podrobnejše opisali v naslednjem poglavju. Ločeni verigi sedaj lahko delujeta kot matrici za sintezo novih verig. Začetni oligonukleotid, ki je komplementaren matrici DNA in je potreben za začetek podvojevanja, sintetizira encim primaza. Sedaj je na voljo prosta 3'-hidroksilna skupina na začetnem oligonukleotidu, ki se veže z novimi nukleotidi, komplementarnimi matrici DNA. Sinteza poteka s pomočjo encima DNA-polimeraze III. Ker sinteza DNA vedno poteka v isto smer (5' konca → 3' konca) in ker sta verigi DNA antiparalelni, se ena veriga sintetizira neprekinjeno (vodilna veriga), druga pa po fragmentih (zaostajajoča veriga). DNA-polimeraza I nato odstrani začetne oligonukleotide in zapolni manjkajoča mesta v molekuli, zadnjo fosfoestrsko vez, s katero se zaključi veriga DNA pa katalizira DNA-ligaza (6).

1.3.3. TOPOLOGIJA DNA

Topologija je veda o legi teles v prostoru (7). Topološke lastnosti molekule DNA so definirane kot tiste lastnosti, ki se lahko spremenijo le s cepitvijo ene ali obeh verig dvojne vijačnice. Zaradi kompleksne zgradbe molekul DNA pride pri procesih podvojevanja in prepisovanja DNA do težav povezanih s topološkim stanjem molekule (8).

Za začetek teh procesov se mora molekula na določenih mestih razpreti in ločiti na dve enojni verigi. Posledično je preostali del molekule izpostavljen torzijski napetosti - del pred razprtjem molekule se še bolj zavija, zaradi česar pride do dodatnega zvitja molekule ter nastanka vozlov in zank (Slika 2). Takšno stanje pa otežuje delovanje nekaterih celičnih procesov (8, 9). Za normalno delovanje celic so zato odgovorni encimi topoizomeraze, ki spreminjajo topološka stanja DNA in s tem molekulo relaksirajo (10).



Slika 2: Podvojevanje DNA in dodatno zvitje molekule (prijejeno po 9).

1.4. ENCIMI TOPOIZOMERAZE

Topoizomeraze so encimi, ki uravnavajo stopnjo dodatnega zvitja molekule DNA in iz verige odstranjujejo vozle in zanke. S kratkotrajnim cepljenjem verig DNA uravnavajo topologijo molekule. Pri cepljenju molekule DNA se encim poveže z molekulom v t.i. cepitveni kompleks, ki je značilen za vse topoizomeraze. Zaradi tega je preprečena prosta rotacija verig DNA. Obstajata dva tipa topoizomeraz: topoizomeraze I in topoizomeraze II (8).

Topoizomeraze I uravnavajo dodatno zvitje molekule DNA z začasno cepitvijo ene verige DNA (8). Za svoje delovanje ne potrebujejo zunanjega vira energije, saj se energija razcepljene fosfodiesterske vezi ohrani zaradi nastanka kovalentnega intermediata med encimom in DNA molekulom. Njihova naloga je sprostitev torzijske napetosti molekule DNA in tvorba energijsko bolj ugodne oblike molekule. Naenkrat iz molekule DNA odstranijo en negativni zavoj (9). Do določenih nukleotidov imajo večjo afiniteto, zato cepitve nastopajo vsakih 5-20 baznih parov (11).

Topoizomeraze II pa začasno cepijo obe verigi molekule DNA in tako iz nje odstranjujejo vozle in zanke. Za delovanje potrebujejo energijo, ki jo dobijo od molekule ATP. Pomembne so za vse evkarijntske in prokarijntske organizme. Evkarijntske celice vsebujejo le en tip tovrstnega encima, medtem ko prokarijntske celice vsebujejo dva različna tipa topoizomeraz II: DNA-girazo in topoizomerazo IV. Vsi so člani poddržine tipa topoizomeraz IIA, medtem ko encim topoizomeraza VI iz poddržine tipa IIB, vsebujejo arheje (8).

1.4.1. DNA-GIRAZA

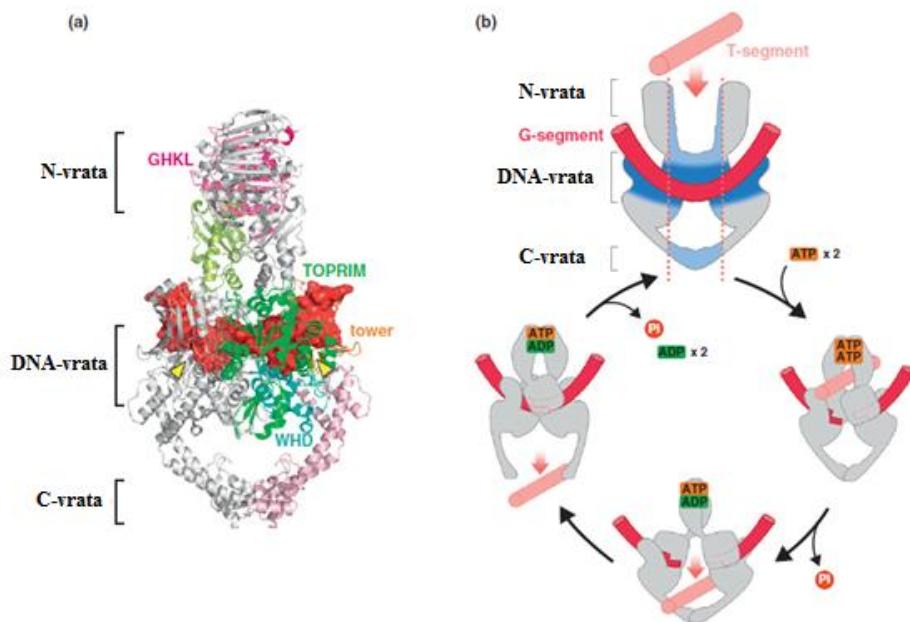
Encim DNA-girazo so, kot prvi encim tipa topoizomeraz II, odkrili leta 1976. Sestavljen je iz dveh podenot imenovanih GyrA (<96 kDa, A) in dveh podenot imenovanih GyrB (88 kDa, B). Zgrajen je v obliki tetramera A₂B₂. Podenota GyrA vsebuje aktivno mesto s tirozinom, ki sodeluje pri cepitvi in začasni vezavi molekule DNA (8). N-končni del podenote GyrB vsebuje vezavno mesto za molekulo ATP, C-končni del pa interagira s podenoto GyrA (10).

Vlogo ima pri podvojevanju in prepisovanju DNA, kjer iz molekule odstranjuje pozitivne dodatne zavoje, ki nastanejo zaradi ločitve verig in se kopijo na delu molekule pred razprtjem. Encim deluje v povezavi z encimom tipa topoizimeraza I, ki odstranjuje negativne dodatne zavoje. Vse topoizomeraze lahko sprostijo dodatno zvito DNA, vendar le DNA-giraza lahko uvede negativni zavoj, pri reakciji z molekulom ATP. V primerjavi s topoizomerazo IV ima slabšo zmožnost odstranjevanja zank in zavojev. Najbolj poznan encim DNA-giraze je iz bakterije *E. coli*. Ker je DNA-giraza prisotna le v prokarijntskeh celicah, je izjemno primerna tarča protimikrobnih učinkovin (8, 10).

1.4.1.1. Delovanje DNA-giraze

Za začetek delovanja encima se del molekule DNA, imenovan G-segment, veže v vezavni žep encima, ki je na Sliki 3b označen z modro barvo. Vezavni žep sestavlja dve TOPRIM (topoizomeraza-primaza) domeni, dve »winged-helix« (krilati vijačni) domeni in dve »tower« (stoljni) domeni (prikazano na Sliki 3a). G-segment dobi, zaradi interkalacije z dvema izolevcinskima ostankoma (na Sliki 3a prikazana z rumenimi puščicami), obliko črke U. Ta segment se nato razcepi in poveže preko fosfodiesterske vezi s tirozinskim ostankom v aktivnem mestu encima. Tako se ustvarijo DNA-vrata. Na N-končnem delu podenote GyrB je vezavno mesto za molekulo ATP. N-končna dela iz obeh podenot GyrB skupaj tvorita N-vrata, ki se po vezavi ATP zaprejo in v notranjost ujamejo drug del molekule DNA, imenovan T-

segment. Le-ta nato potuje skozi DNA-vrata in C-vrata, ki so na spodnjem delu encima in tako odstrani dodatno zvitje molekule. G-segment se nato ponovno združi. Struktura in delovanje encima sta prikazana na Sliki 3 (12).



Slika 3: a) Struktura encima tipa IIA iz *S. cerevisiae* v kompleksu z DNA, b) Delovanje encima topoizomeraze tipa IIA (povzeto po 12).

Za delovanje encima je potrebna energija, ki jo dobi od molekule ATP. Za tvorbo DNA-vrat in prehod T-sementa skozi DNA-vrata se hidrolizira 1 molekula ATP. Za prehod T-sementa skozi C-vrata in za vrniteitv encima v prvotno stanje se hidrolizira druga molekula ATP (12). Molekula ATP se veže na podenoto GyrB, na domeno GHKL (Slika 3a), ki je značilna za encime DNA-girazo, protein topotnega šoka, 90, histidin kinazo in Mut L, po katerih je dobila ime. Glavni elementi vezavnega mesta so 3 α -vijačnice in 4 β -listi, ki tvorijo ogrodje (13). Pri vezavi z molekulo ATP pa sodelujejo aminokislinski ostanki, s katerimi se molekula poveže s številnimi vodikovimi vezmi (14).

1.5. ZAVIRALCI DNA-GIRAZE

Zaradi raznolike in pomembne fiziološke funkcije so topoizomeraze tipa IIA tarče nekaterih protimikrobnih in protirakavih učinkovin (15). Raziskave na njih potekajo že tri desetletja, vse od odkritja DNA-giraze (16). Dva glavna mehanizma sta odgovorna za protimikrobnou aktivnost učinkovin, ki delujejo na DNA-girazo. Prvi je inhibicija aktivnosti DNA-giraze, drugi pa vključuje stabilizacijo kompleksa, ki se imenuje cepitveni kompleks in nastane med encimom ter DNA. Kompleks je pogoj za delovanje encima (15).

Učinkovine, ki stabilizirajo cepitvene komplekse, so bolj učinkovite. Običajno so cepitveni kompleksi, ki so prisotni v nižjih koncentracijih, sprejemljivi za celice. V višji koncentraciji pa postanejo ovira za druge encime, ki delujejo na DNA molekuli (helikaza, DNA polimeraza), kar vodi v trajne cepitve DNA. V celici pride do proizvodnje reaktivnih kisikovih zvrsti, indukcije SOS odgovora in fragmentacije kromosomov kar vodi v smrt celice. Takšne učinkovine spremenijo encime v močne celične toksine, ki fragmentirajo genomske material, zato jih imenujejo tudi »topoizomerazni strupi«. Ta mehanizem poteka pri fluorokinolonskih učinkovinah, kot je npr. ciprofloksacin. Čeprav je opisan mehanizem bolj učinkovit, pa ne smemo zanemariti učinkovin z inhibitornim delovanjem, ki so trenutno še v razvoju (8, 15).

1.5.1. ZAVIRALCI PODENOTE A DNA-GIRAZE

1.5.1.1. Fluorokinoloni

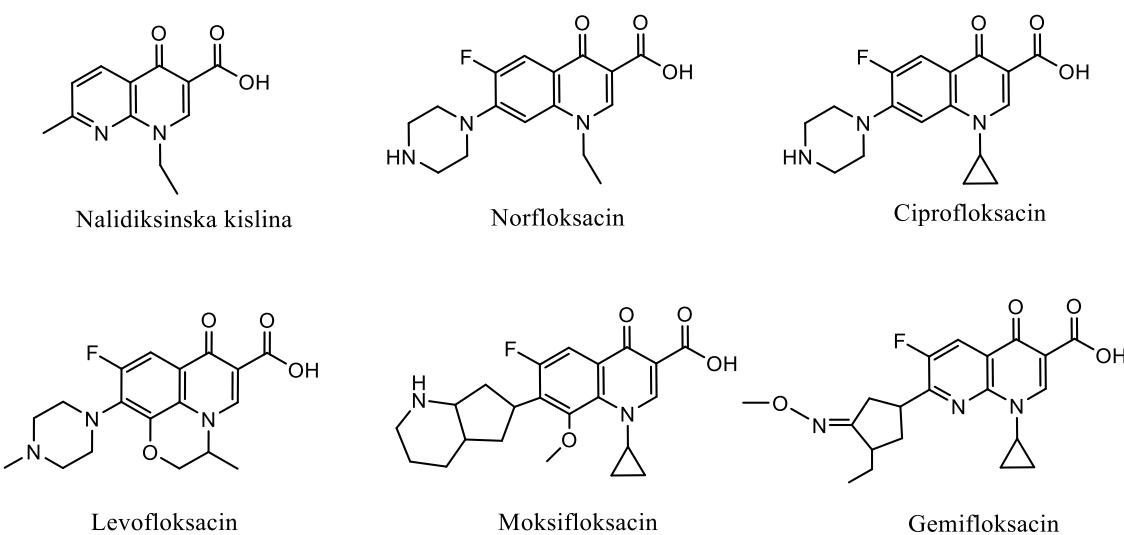
Fluorokinoloni so do zdaj daleč najbolj uspešne protimikrobne učinkovine, ki delujejo na encim DNA-girazo. Izvirajo iz nalidiksinske kislino, ki so jo pomotoma odkrili pri sintezi klorokina - učinkovine za zdravljenje malarije (15). Njihova osnovna struktura je 6-fluorokinolin-4-on, ki ima karboksilno skupino na C3 mestu kinolinskega obroča in različne substituente na obročnem dušiku N1 in mestu C7. Pri po Gramu negativnih bakterijah večinoma delujejo na encim DNA-girazo, medtem ko pri po Gramu pozitivnih bakterijah delujejo na topoizomerazo IV. Zaradi širokega spektra delovanja se uporabljam za zdravljenje urinarnih in sistemskih infekcij ter infekcij respiratornega trakta. Delujejo lahko baktericidno ali bakteristatično (17).

Nalidiksinsko in oksolinsko kislino uvrščamo med prvo generacijo kinolonov, ki imajo slabo protimikrobnost, vendar je njihova optimizacija vodila do razvoja klinično uporabnih spojin (15). Dodatek fluora na C6 je izboljšal aktivnost in celični privzem učinkovin, piperazinski obroč na mestu C7 je izboljšal ostale farmakokinetične lastnosti spojin, ciklopropilna skupina na N1 je razširila spekter delovanja, zamenjava N8 s C8 pa zmanjšala neželene učinke (4).

Razdelitev fluorokinolonov in nekateri predstavniki posameznih skupin:

- prva generacija: nalidiksinska in oksolinska kislina,
- druga generacija: norfloksacin, ciprofloksacin,
- tretja generacija: levofloksacin,
- četrta generacija: moksifloksacin, gemifloksacin,

Slika 4 prikazuje strukture fluorokinolonskih protimikrobnih učinkovin (15).



Slika 4: Fluorokinolonske protimikrobne učinkovine (povzeto po 15).

Fluorokinoloni zavirajo dodatno negativno zvitje DNA in reakcije relaksacije preko stabilizacije kovalentnega kompleksa, kjer je podenota GyrA s tirozinskim ostankom kovalentno povezana s 5'-koncem razcepljene verige DNA (15). Aromatski obroč kinolona se poveže z dušikovimi bazami molekule DNA preko van der Waalsovih vezi in π - π interakcij, tik pred ali za mestom cepitve DNA. Polarni del molekule pa se preko vodno kovinskega mostu (2 molekuli vode, magnezijev ion) poveže z aminokislinskimi ostanki na encimu (17). Točne povezave še niso popolnoma znane, najverjetneje pa vključujejo aminokislinske ostanke serina in asparagina (oz. glutamina) na podenoti GyrA, saj so te aminokisline spremenjene pri bakterijah, ki so odporne na kinolone. Zaradi stabilizacije kompleksa med DNA-girazo in DNA je celica izpostavljena oksidativnemu stresu, kar vodi v smrt celice zaradi fragmentacije kromosomov (15).

Odpornost bakterij na kinolonske antibiotike se pojavi zaradi mutacij v genih, ki kodirajo za določene aminokisline, ki sodelujejo pri vezavi učinkovin. Mutacije nastajajo na regijah, ki jih imenujemo »na kinolone odporne regije« (quinolone resistance determining regions-QRDRs). Pred kratkim pa so odkrili tudi gen, ki vsebuje zapis za membranske črpalke, ki črpajo učinkovine iz bakterijskih celic ter encime, ki spreminjajo kinolone v neaktivne spojine. Vzrok za odpornost po Gramu negativnih bakterij je lahko tudi nižja permeabilnost celičnih membran. Zaradi večanja odpornosti bakterij na kinolone je ključnega pomena razvoj novih nekinolonskih zaviralcev, ki delujejo na DNA-girazo (15, 17, 18).

1.5.2. ZAVIRALCI PODENOTE B DNA-GIRAZE

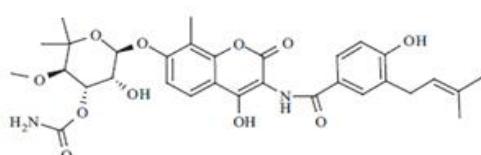
1.5.2.1. Aminokumarini

Aminokumarini so klinično manj pomembna skupina učinkovin zaradi citotoksičnosti na človeške celice, slabe topnosti in slabe aktivnosti proti po Gramu negativnim bakterijam. S stališča *in vitro* študij pa so zelo pomembni, saj nakazujejo, da je tudi podenota GyrB, na katero delujejo, primerna tarča za razvoj novih protimikrobnih učinkovin (10). Pod skupino aminokumarinskih antibiotikov prištevamo klasične aminokumarine, ki vsebujejo aminokumarinski obroč, ter simociklinone, ki imajo poleg aminokumarinskega dela še poliketidni del. Oboji delujejo na DNA-girazo, vendar se razlikujejo po načinu delovanja (15).

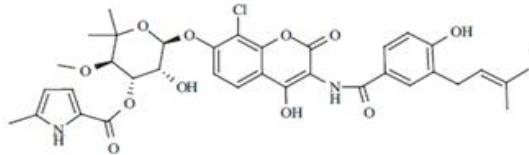
Pod klasične aminokumarine prištevamo spojine, kot so novobiocin, klorobiocin in kumermicin A1, ki so naravni produkti, izolirani iz vrste *Streptomyces*. Sedaj pa obstaja tudi več aminokumarinskih spojin, proizvedenih s pomočjo genskega inženiringa in kemične sinteze (15). Novobiocin se je včasih uporabljal za zdravljenje okužb z bakterijo *S. aureus*, vključno z MRSA sevi, vendar so ga zaradi prevelike toksičnosti umaknili s trga (19).

Njihovi glavni struktturni deli so:

- 3-amino-4,7-dihidroksikumarinski obroč,
- sladkor L-novioza,
- aromatična acilna komponenta, ki je pripeta na amino skupino aminokumarinskega dela.



Novobiocin

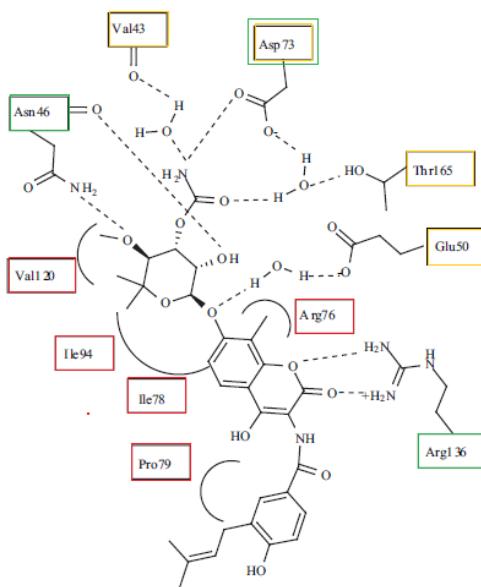


Klorobiocin

Slika 5: Struktura novobiocina in klorobiocina (prirejeno po 14).

Razlika med klorobiocinom in novobiocinom (Slika 5) je v skupini (metilna, kloro), ki je vezana na C8 na kumarinskem obroču, ter v skupini, ki je vezana na sladkor L-novioza (pirolna, karbamatna). Kumermicin A1 pa ima bolj zapleteno strukturo, kjer se glavni elementi (kumarinski obroč, pirolni obroč, L-novioza) ponavljajo (15).

Zaradi inhibicije sinteze nukleinskih kislin v bakterijah so poznani dobrih 60 let, kasneje pa so ugotovili, da delujejo tudi na DNA-girazo. Encim je inhibiran zaradi tekmovanja aminokumarinov za isto vezavno mesto z molekulo ATP, ki je nujna za delovanje encima. Čeprav imajo le malo strukturnih podobnosti z molekulo ATP, so njeni kompetitivni zaviralci. S pomočjo kristalnih struktur med encimom in aminokumarini so odkrili, da je molekuli ATP preprečena vezava, ker aminokumarini prekrijejo njeno vezavno mesto (15). Sladkor L-novioza iz aminokumarinov se na encim veže podobno kot adeninski obroč molekule ATP. Slika 6 prikazuje vezavo novobiocina v vezavno mesto encima. Novobiocin tvori 5 neposrednih vodikovih vezi z aminokislinskimi ostanki Asn46, Asp73, Arg136 (zeleni kvadratki) ter dodatne vodikove vezi preko 3 molekul vode z ostanki Val43, Glu50, Asp73 in Thr165 (rumeni kvadratki). K stabilizaciji molekule pripomorejo tudi hidrofobne interakcije z Arg76, Ile78, Pro79, Ile94 in Val120 (rdeči kvadratki). Vezava novobiocina vpliva na spremembo konformacije encima. Klorobiocin se z DNA-girazo poveže na podoben način, razlika je le v vezavi metilpirolnegra obroča v hidrofoben žep (14).

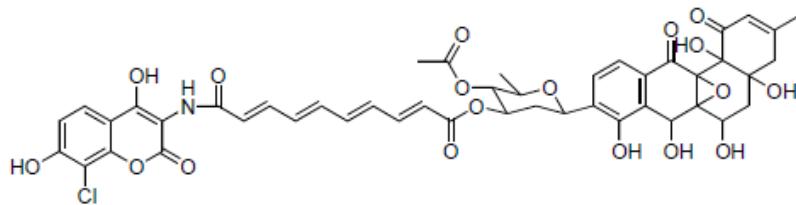


Slika 6: Vezava novobiocina v vezavno mesto encima DNA-giraze (povzeto po 14).

Aminokumarini imajo močne protibakterijske lastnosti proti po Gramu pozitivnim bakterijam. Zaradi drugačne vezave na DNA-girazo v primerjavi s fluorokinoloni delujejo tudi na seve, ki so odporni na njih. Ugotovili so tudi, da lahko aminokumarini zmanjšajo odpornost na flurokinolone zaradi nasprotnega učinka na encim RecA, ki sodeluje pri popravljanju molekule DNA. Fluorokinoloni namreč povečajo njegovo izražanje, kar pa vodi tudi do večjega izražanja »error prone« DNA-polimeraze, encima ki katalizira sintezo DNA na poškodovanih delih

molekule. Posledica so pogostejše točkovne mutacije, zaradi katerih se poveča odpornost na fluorokinolone. Aminokumarini ta mehanizem zavirajo, zato bi se lahko pri kombinirani uporabi obeh vrst protimikrobnih učinkovin ta njun nasprotni učinek izrazil in zmanjšal možnost odpornosti (19).

Pod aminokumarine prištevamo tudi simociklinone, ki poleg aminokumarinskega obroča vsebujejo tudi poliketidne elemente. Raziskave so pokazale, da so njihova glavna tarča Gram pozitivne bakterije, nedavno pa so odkrili aktivnost tudi proti Gram negativnim bakterijam. Kljub strukturni podobnosti z aminokumarini je njihovo delovanje drugačno. Zaradi pomanjkanja sladkorne komponente, vezane na hidroksilno skupino na mestu C7, se ne vežejo na aminokumarinsko vezavno mesto, ampak v bližini fluorokinolonskega mesta (19). Predstavnik simociklinonov SD8 je prikazan na Sliki 7.

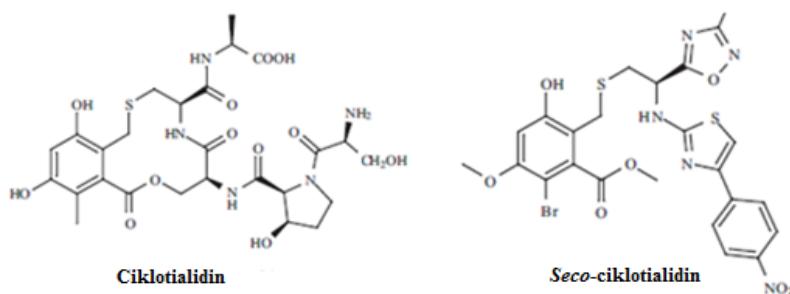


Slika 7: Simociklinon D8 (povzeto po 17).

1.5.2.2. Ciklotialidini

Ciklotialidin je ciklični peptid s protimikrobnou aktivnostjo, ki ga proizvajajo bakterije *Streptomyces*. Sintetiziranih je bilo tudi več njegovih analogov. Delujejo na N-končno domeno GyrB in preprečijo vezavo molekuli ATP zaradi prekritja njenega vezavnega mesta (15). S pomočjo kristalnih struktur so odkrili, da adeninski obroč iz molekule ATP in rezorcinolni obroč ciklotialidina interagirata z encimom na podoben način-preko molekule vode se z vodikovimi vezmi povežeta z aminokislinskim ostankom Asp73, kar pojasni tekmovanje z molekulom ATP za vezavo (17, 20). V primerjavi z novobiocinom so dva krat močnejši zaviralci in selektivno delujejo na prokariontske celice, vendar imajo zaradi slabega prehajanja v notranjost celice slabo protimikrobnou aktivnost. Glavne strukturne značilnosti so 12 členski laktonski obroč z integrirano pentapeptidno verigo ter rezorcinolnim obročem. Kasneje so sintetizirali tudi *seco*-ciklotialidine, ki imajo odprt laktonski obroč. *Seco*-ciklotialidini imajo boljše protimikrobnne lastnosti proti Gram pozitivnim bakterijam v primerjavi s ciklotialidini. Učinek je še vedno nezadosten v primerjavi z drugimi registriranimi antibiotiki. Nizka *in vivo*

učinkovitost je posledica visoke vezave na serumske proteine. Slika 8 prikazuje predstavnika obeh razredov ciklotrialidinov (14).

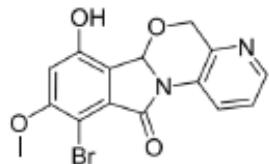


Slika 8: Strukturi ciklotrialidina in seco-ciklotrialidina (povzeto po 14).

1.5.2.3. Ostali zaviralci

Kristalne strukture med DNA-girazo in obstoječimi zaviralci so pokazale podobnosti pri umeščanju zaviralcev v vezavno mesto encima. Karbamatni del novobiocina, karboksipirolni del klorobiocina in rezorcinolni obroč ciklotrialidina interagirajo z ostankom Asp73 preko molekule vode z vodikovimi vezmi (20). Ta podatek je pripomogel pri načrtovanju novih zaviralcev. Triazinski, indazolni, fenolni in različni azolni strukturni elementi novejših zaviralcev interagirajo z encimom na enak način (14).

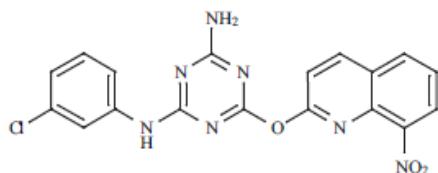
Na podlagi strukture ciklotrialidina so pripravili njegove fenolne derivate. Njihova optimizacija je vodila do nastanka tetracikličnih fenolnih derivatov s piridinskim ali kinolinskim obročem (Slika 9). Bromidni ion v molekuli teh derivatov je nujen za aktivnost proti Gram pozitivnim bakterijam. Spojine iz te skupine zaviralcev imajo, zaradi metabolne glukuronidacije fenolnega obroča, slabo inhibitorno aktivnost (14, 20).



Slika 9: Struktura tetracikličnega fenolnega derivata (povzeto po 20).

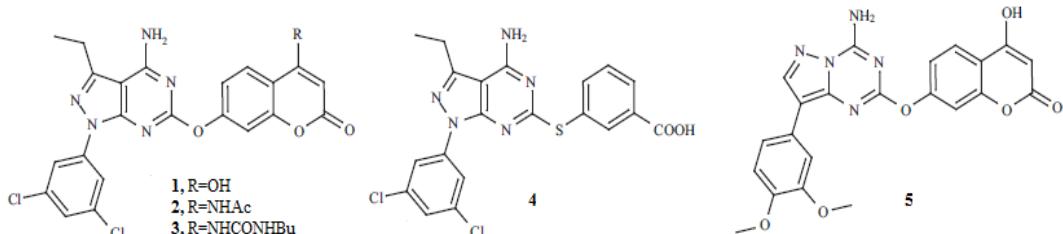
Podjetje Astra Zeneca je vložilo patentno prijavo za 1,3,5-triazinske derivate, ki imajo zaviralen učinek na DNA-girazo Gram pozitivnih bakterij. Spojina prikazana na Sliki 10 deluje tudi proti MRSA ter proti sevom *S. aureus*, ki so odporni na novobiocin in kinolone. 3D kristalna

struktura med triazinskimi derivati ter podenoto GyrB nakazuje, da se te spojine vežejo na ATP vezavno mesto na podoben način kot aminokumarini in ciklotialidini (14).



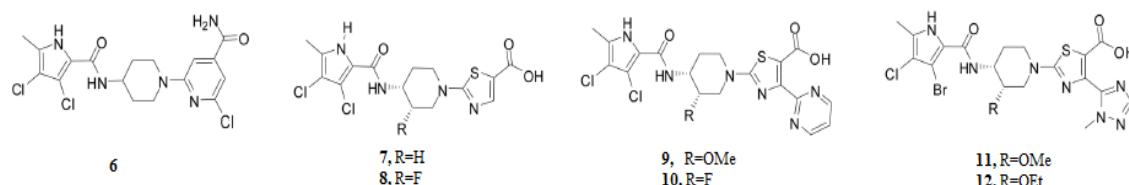
Slika 10: Struktura 1,3,5-triazinskega derivata (povzeto po 14).

Skupina iz podjetja Hoffman La Roche je združila strukturne elemente molekul ATP, novobiocina ter 1,3,5-triazinskih derivatov in pripravila 4-amino pirazolo pirimidine in 4-amino pirazolo triazine. Najboljšo inhibitorno aktivnost imata spojini 1 in 5 (Slika 11), vendar ne izkazujeta protimikrobne učinkovitosti. Z optimizacijo spojine 1 (zamenjava hidroksilne skupine kumarinskega obroča z aminom ali ureo) se je izboljšala permeabilnost spojin in aktivnost proti Gram pozitivnim bakterijam. Kristalna struktura kompleksa med spojino 4 in podenoto GyrB potrjuje interakcije zaviralca z Asp73 in Arg136, ki potekajo tudi pri aminokumarinih, dikrolofenilna skupina pa se veže v hidrofoben žep, kar niso zasledili pri triazinskih derivatih (14).



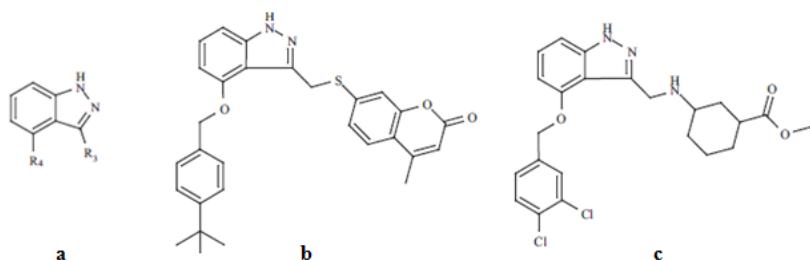
Slika 11: Strukture 4-amino pirazolo pirimidinskih in 4-amino pirazolo triazinskih derivatov (povzeto po 14).

Na podlagi karboksiplrolnega dela klorobiocina so razvili novo vrsto zaviralcev, to so pirolo amidni derivati (Slika 12), ki inhibirajo DNA-girazo *E. coli* v mikromolarnih koncentracijah. Kloridna iona na pirolnem obroču se vežeta v hidrofoben žep encima, poleg tega pa povečata kislost pirolnega vodika, kar poveča interakcije z ostankom Asp73. Karboksamid na piridinskem obroču pa interagira z Arg136. Z optimizacijo spojine 6 je nastala spojina 7, kjer je piridinski obroč zamenjan s tiazolnim. Spojina 7 je izkazovala dobro protimikrobnou aktivnost proti *S. pneumoniae* zaradi karboksilne skupine na tiazolnem obroču, ki vpliva na interakcije z Arg136. Zelo aktivni so še zaviralci s heterocikličnim obročem in fluoridnim ionom ali metoksi skupino, ki se vežeta v hidrofoben žep encima (spojine 9-12). Uvedba triazolne skupine (spojini 11 in 12) poslabša topnost spojin, vendar poveča aktivnost, ker preprečuje glukuronidacijo (20).



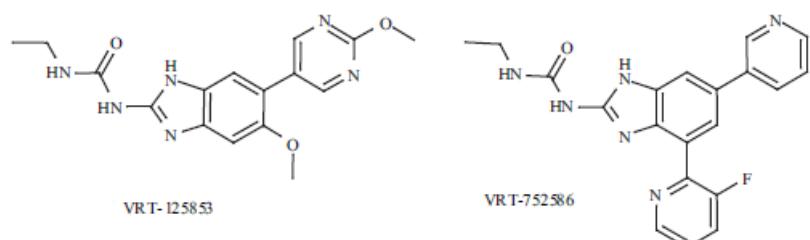
Slika 12: Struktura pirolo amidnih derivatov (povzeto po 20).

S preučevanjem 3D strukture ATP vezavnega mesta na DNA-girazi so odkrili indazolne derivate. Osnovo spojin predstavlja indazolno ogrodje (Slika 13, spojina a), na katerega so pripenjali različne substituente. Dodatek fenilne skupine na mesto 3 izboljša inhibitorno aktivnost. Z uvedbo kumarinskega obroča preko tiolne skupine so se želeli približati interakcijam, ki potekajo pri aminokumarinih z Arg136. Dodatek lipofilne (butilfenilne) skupine na mesto 4 močno poveča inhibicijo encima zaradi vezave skupine v hidrofoben žep, vendar je molekula preveč lipofilna, da bi prehajala bakterijsko membrano (Slika 13, spojina b). Lipofilnost so zmanjšali z zamenjavo aminokumarinskega obroča z amini (Slika 13, spojina c). Te spojine kažejo dobro protimikrobnou aktivnost na odporne seve stafilokokov in enterokokov (14, 20).



Slika 13: Indazolno ogrodje in strukture indazolnih derivatov (povzeto po 14).

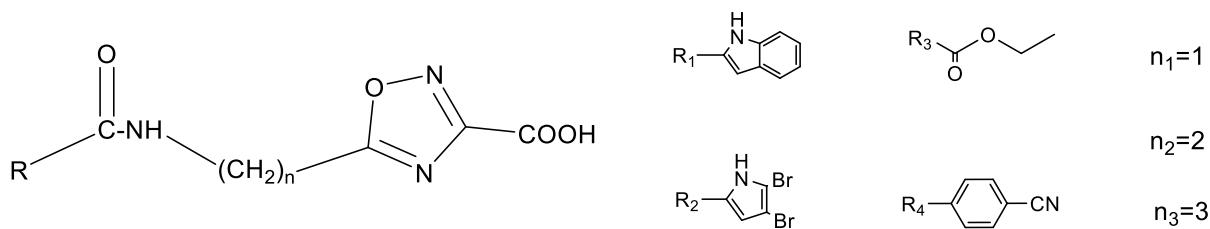
Podjetje Vertex je patentiralo substituirane aminobenzoimidazolne derivate, ki inhibirajo DNA-girazo. Spojini VRT-125853 in VRT-752586 (Slika 14) delujeta tako na DNA-girazo, kot tudi na topoizomerazo IV, ne delujeta pa na humano topoizomerazo II. Izkazujeta dobro protimikrobnou aktivnost proti *E. coli* in *S. aureus*. Zaradi delovanja na 2 tarči je razvoj odpornosti nanje manj verjeten (14).



Slika 14: Struktura aminobenzoimidazolnih derivatov (povzeto po 14).

2. NAČRT DELA

V okviru magistrske naloge bomo sintetizirali različne spojine, za katere predvidevamo potencialno zaviralno aktivnost na podenoto B encima DNA-giraze. Na podlagi že poznane povezave med strukturo in delovanjem spojin na podenoto B DNA-giraze, ki smo jo predstavili v uvodu, so sodelavci Fakultete za farmacijo s pomočjo računalniškega programa FlexX (LeadIT 2.1.3 (BioSolveIT)) določili strukturne elemente potencialnih zaviralcev DNA-giraze. Na podlagi njihovih rezultatov smo se odločili za sintezo spojin z 1,2,4-oksadiazolnim ogrodjem, ki imajo karboksilno skupino pritrjeno direktno na obroč, poleg tega bomo v molekulo preko amidne vezi uvedli tudi 2-indol karboksilno kislino oz. 4,5-dibromopirol-2-karboksilno kislino, ki pripomoreta k vezavi v aktivno mesto encima. Odločili pa smo se tudi za tvorbo amida s kislinskimi kloridi. Osnovna struktura potencialnih zaviralcev je prikazana na Sliki 15.



Slika 15: Osnovna struktura potencialnih zaviralcev DNA-giraze

Izhajali bomo iz treh osnovnih aminokislin: glicina, β-alanina in 4-aminobutanojske kisline, ki jim bomo najprej z BOC skupino zaščitili aminske skupine. V naslednji stopnji sinteze bomo aminokislinske karboksilne skupine aktivirali s pomočjo *N,N*-dicikloheksil karbodiimida (DCC) do anhidridov in jih s pomočjo etil 2-oxsiiminoooksamata pretvorili v ustrezne 1,2,4-oksadiazole. Tako pripravljenim spojinam bomo s trifluorooacetno kislino odstranili BOC zaščito ter na aminski del molekule uvedli različne substituente preko tvorbe amidne vezi in tako dobili potencialne protimikrobne zaviralce. Nastale spojine bomo na koncu hidrolizirali do kislin. Spojine bomo ovrednotili z ustreznimi fizikalno-kemijskimi in spektroskopskimi metodami. Končnim spojinam in nekaterim spojinam iz vmesnih stopenj sinteze bomo testirali tudi njihovo zaviralno aktivnost na encim DNA-girazo.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

3.1.1. REAGENTI IN TOPILA

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge smo v laboratoriju uporabljali reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Acros Organics (Belgija), Carlo Erba (Italija), Fluka (Švica), Merck (Nemčija), Panreac (Španija) in Sigma-Aldrich (ZDA). 4,5-dibromopirol karboksilna kislina ter BOC-glicin pa sta bila sintetizirana na Fakulteti za farmacijo v sklopu drugega magistrskega dela. Čistota reagentov in topil je bila najmanj 95 %.

3.2. METODE

3.2.1. KROMATOGRAFSKE METODE

3.2.1.1. Tankoplastna kromatografija

Tankoplastno kromatografijo smo uporabljali za spremjanje poteka reakcij, izolacije spojin ter za izbiro primerne mobilne faze, ki smo jo nato uporabili pri kolonski kromatografiji. Izvajali smo jo na ploščah DC Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, velikosti 20 x 20 cm in z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu, proizvajalca Merck (Nemčija). Za detekcijo spojin na ploščah smo uporabljali UV svetilko z valovno dolžino 254 nm in orositveni reagent ninhidrin, s katerim smo detektirali amine.

3.2.1.2. Kolonska kromatografija

Nekatere spojine smo očistili s pomočjo kolonske kromatografije, ki smo jo izvajali v steklenih kolonah različnih velikosti, odvisno od količine vzorca. Za stacionarno fazo smo uporabili Silikagel 60 (Kieselgel 60), proizvajalca Merck (Nemčija), z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm (flash silikagel). Kot mobilno fazo pa smo uporabili različna topila oz. njihove zmesi (poglavje 3.2.1.3.).

3.2.1.3. Mobilne faze

Pri tankoplastni in kolonski kromatografiji smo uporabljali štiri mobilne faze:

- MF 1: diklorometan/metanol : 9/1
- MF 2: heksan/etilacetat : 3/2
- MF 3: metanol/voda/acetonitril : 1/1/3
- MF 4: kloroform/etanol : 9/1

3.2.2. SPEKTROSKOPSKE METODE

3.2.2.1. Jedrska magnetna resonanca (NMR)

Za potrditev struktur spojin smo posneti NMR spektre. Spektri so bili posneti na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani s pomočjo spektrometra Bruker UltraShieldTM Plus pri 400 MHz in temperaturi 295 K. Vzorce smo raztopili v devteriranem topilu DMSO-d6. Za inertni standard smo uporabili trimetilsilan. Spektre smo računalniško obdelali s programom MestRec 4.8.6. proizvajalca Mestrelab Research (Španija).

3.2.2.2. Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektri so bili posneti na spektrometu Perkin Elmer Spectrum BX FT-IR System na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

3.2.2.3. Masna spektrometrija (MS)

Masni in HR-MS spektri so bili posneti na spektrometu Q-TOF Premier, proizvajalca Waters-Micromass (Velika Britanija), z ESI in HRMS tehniko na Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

3.2.3. ELEMENTNA ANALIZA (CHN)

Vsebnosti ogljika, vodika in dušika so bile izmerjene z analizatorjem Perkin Elmer 2400 CHN na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

3.2.4. DOLOČEVANJE TEMPERATURE TALIŠČA

S pomočjo talilnega mikroskopa Leica z ogrevalno mizico (Koflerjev talilni mikroskop) smo določali tališča spojin. Tališča niso korigirana.

3.2.5. RISANJE KEMIJSKIH STRUKTUR IN POIMENOVANJE SPOJIN

Za risanje kemijskih struktur in IUPAC poimenovanje spojin smo uporabljali računalniški program ChemBioDraw Professional 15.0, proizvajalca Perkin Elmer (ZDA).

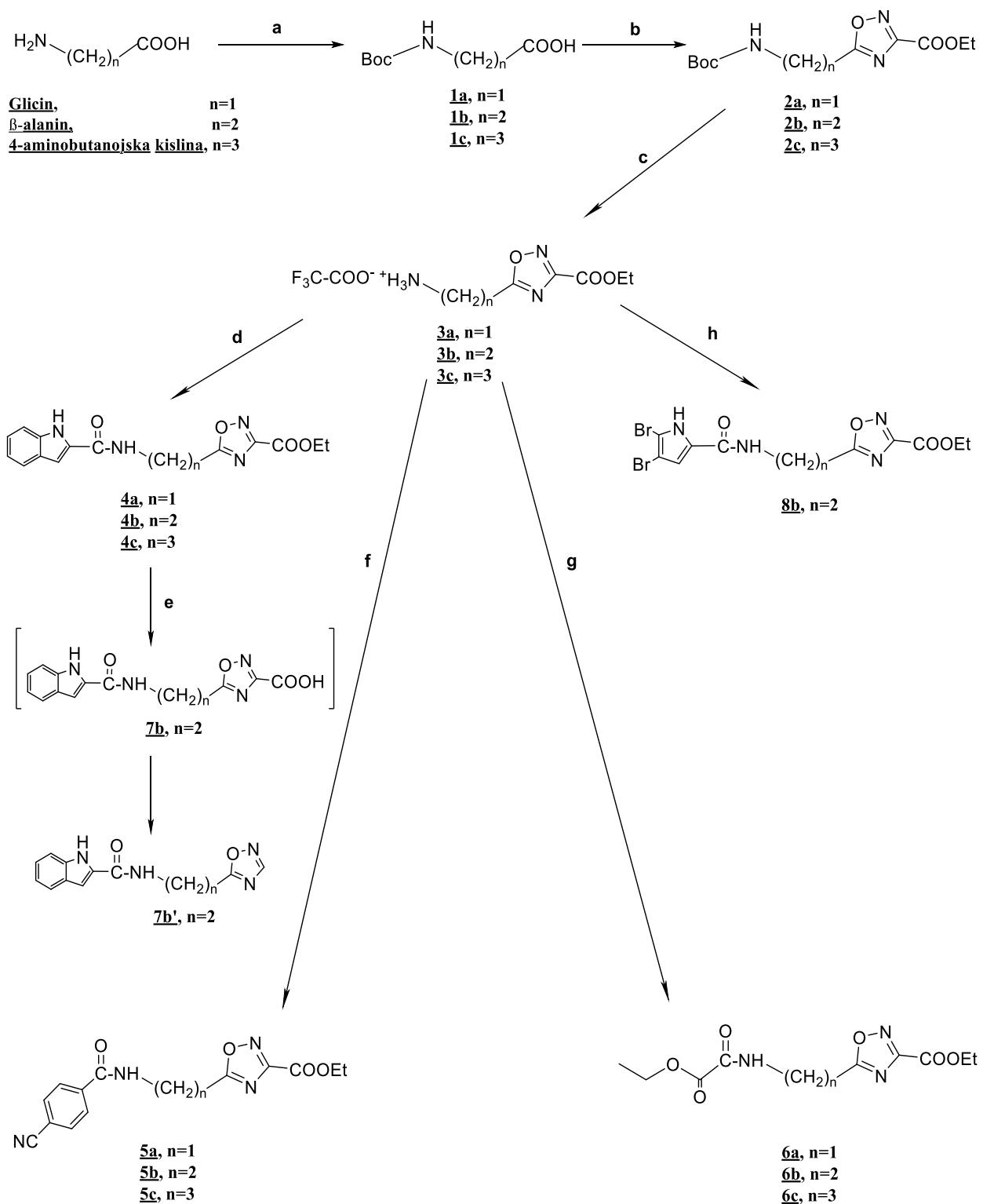
3.2.6. BIOLOŠKO TESTIRANJE

Spojinam iz druge in zadnje stopnje sinteze smo ovrednotili zaviralno aktivnost na encim DNA-girazo, pri čemer smo uporabili set *E. coli* mikroplošč podjetja Spiralis, ki vsebuje encim DNA-girazo, substrat DNA plazmida, oligonukleotid ter pufre za redčenje, določanje aktivnosti

in spiranje. Meritve je opravil izr. prof. Janez Ilaš, mag. farm., na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, po patentiranem postopku podjetja Plant Biosciences Ltd (21). Vrednost IC₅₀ smo ocenili s testiranjem pri 10 µM in 100 µM koncentracijah učinkovin.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. REAKCIJSKA SHEMA



a: Boc₂O / NaOH, dioksan, voda

b: DCC / kloroform; etil 2-oksiiminoooksamat / piridin

c: trifluorooacetna kislina / diklorometan

d: 2-indol karboksilna kislina, HOBt, NMM, EDC / dimetilformamid

e: NaOH / etanol; HCl

f: 4-ciano benzoil klorid, trietylamin / diklorometan

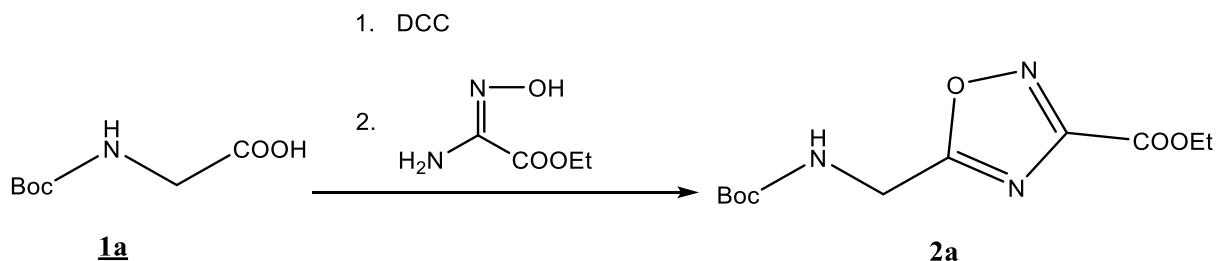
g: etil oksalil klorid, trietylamin / diklorometan

h: 4,5-dibromopirol-2-karboksilna kislina, TCT, NMM / diklorometan

4.2. SINTEZNI POSTOPKI

4.2.1. SINTEZA ETIL 5-{[(TERC-BUTILOKSIKARBONIL)AMINO]METIL}-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA

Reakcija:



Postopek:

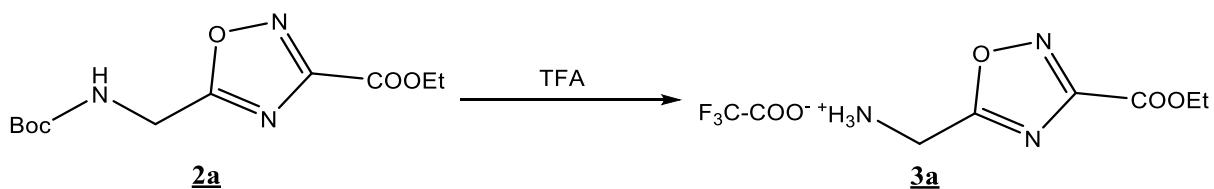
V 30 mL kloroforma raztopimo 4,00 g (22,8 mmol) BOC-glicina (**1a**) in zmes damo na ledeno kopel. Ko zmes doseže temperaturo med 0 in -5 °C, dodamo 2,36 g (11,4 mmol) DCC ter reakcijo pustimo teči pri isti temperaturi. Po 2 urah zmesi odfiltriramo nastalo dicikloheksil sečnino, filtrat pa uparimo. Pri odparevanju ne smemo preseči temperature 40 °C. Nastalo viskozno raztopino raztopimo v 10 mL piridina, dodamo 1,00 g (7,6 mmol) etil 2-oksiiminoooksamata ter zmes segrevamo 3 ure na oljni kopeli ob vrenju (124 °C). Po končani reakciji odparimo piridin ter zaostanek raztopimo v 30 mL etra in speremo z 2-krat 10 mL vode, nasičene raztopine NaHCO₃, 1 M HCl in nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, prefiltiramo ter uparimo topilo. Zmes raztopimo v MF-2 ter produkt (**2a**) ločimo na koloni.

Preglednica I: Rezultati za spojino **2a**

Izkoristek:	1,16 g (56 %)		
Tališče:	88-91 °C		
Rf:	0,35 (MF-2), detekcija: ninhidrin		
IR (KBr, cm ⁻¹):	3349, 2976, 2936, 1747, 1682, 1578, 1521, 1494, 1447 1422, 1387, 1371, 1313, 1280, 1255, 1227, 1203, 1160, 1059, 1022, 986, 936, 862, 840, 794, 773, 756, 730, 665, 641, 607, 562, 507		
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆):	δ [ppm]= 1,32 (t, 3H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 1,39 (s, 9H, BOC), 4,40 (q, 2H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 4,50 (d, 2H, <i>J</i> =5,8 Hz, CH ₂ -NH), 7,76 (t, 1H, <i>J</i> =5,8 Hz, CH ₂ -NH)		
Elementna analiza za C ₁₁ H ₁₇ N ₃ O ₅ :		Izračunana	Ugotovljena
%C	48,70	48,77	
%H	6,32	6,08	
%N	15,49	15,41	
MS (ESI):	272 [M+H] ⁺		
HR-MS:	272,1239 [M+H] ⁺ , (izračunana: 272,1246)		
Mr (izračunana):	271		

4.2.2. SINTEZA SOLI [3-(ETOKSIKARBONIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL]METAN AMINA IN TRIFLUOROOOCETNE KISLINE

Reakcija:



Postopek:

V 30 mL diklorometana raztopimo 1,00 g (3,7 mmol) spojine **2a** ter zmes ohladimo na ledeni kopeli do 0 °C. Dodamo 2 mL trifluoroocetne kisline ter reakcijo pustimo čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji odparimo topilo, viskozni zaostanek prelijemo z etrom (v

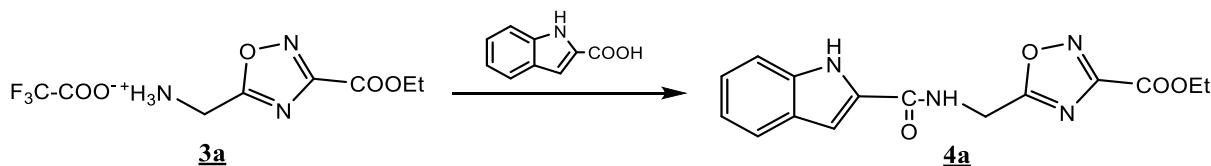
katerem spojina izпадa) in ponovno odparimo topilo. To ponovimo 3-krat. Nastanejo belo-oranžni kristali.

Preglednica II: Rezultati za spojino **3a**

Izkoristek:	0,97 g (92 %)		
Tališče:	134-135 °C		
Rf:	0,60 (MF-3), detekcija: ninhidrin		
IR (KBr, cm ⁻¹):	2970, 1742, 1686, 1643, 1600, 1557, 1495, 1479, 1429, 1386, 1353, 1323 1246, 1200, 1169, 1129, 1055, 1021, 910, 829, 798, 721, 670, 636, 600, 519		
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆):	δ [ppm]= 1,34 (t, 3H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 4,44 (q, 2H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 4,64 (s, 2H, NH ₃ ⁺ -CH ₂), 8,81 (s, 3H, NH ₃)		
Elementna analiza za C ₈ H ₁₀ N ₃ O ₅ F ₃ :		Izračunana	Ugotovljena
%C	33,69	33,81	
%H	3,53	3,34	
%N	14,74	15,07	
MS (ESI):	172 [M+H] ⁺		
HR-MS:	172,0726 [M+H] ⁺ , (izračunana: 172,0722)		
Mr (izračunana):	172 [M-F ₃ CCOO] ⁺		

4.2.3. SINTEZA ETIL 5-[(1H-INDOL-2-KARBOKSIAMIDO)METIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA

Reakcija:



Postopek:

V 15 mL dimetilformamida raztopimo 0,10 g (0,4 mmol) spojine **3a** in 0,06 g (0,4 mmol) 2-indol karboksilne kisline ter zmes ohladimo na -10 °C na ledeni kopeli. Dodamo 0,07 g (0,5 mmol) HOBr, 142 µL (1,3 mmol) NMM in 0,10 g (0,5 mmol) EDC. Pazimo, da se temperatura med dodajanjem reagentov ne dvigne. Reakcijo pustimo mešati čez noč pri sobni temperaturi.

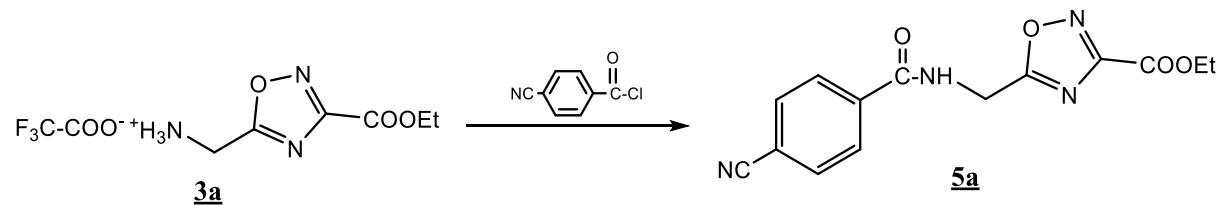
Po končani reakciji odparimo topilo ter zmes raztopimo v 15 mL etilacetata. Organsko fazo spiramo z 2-krat 15 mL nasičene raztopine NaHCO₃, 1M HCl, vode in nasičene raztopine NaCl ter sušimo z Na₂SO₄. Po odparitvi topila dobimo belo-rumene kristale.

Preglednica III: Rezultati za spojino **4a**

Izkoristek:	0,06 g (46 %)		
Tališče:	208-210 °C		
Rf:	0,57 (MF-4), detekcija: ninhidrin		
IR (KBr, cm ⁻¹):	3368, 3315, 2919, 2850, 1732, 1631, 1582, 1545, 1500, 1477, 1447, 1421, 1390, 1373, 1354, 1343, 1317, 1282, 1261, 1200, 1158, 1134, 1114, 1039, 1010, 999, 948, 916, 848, 816, 802, 790, 771, 744, 734, 694, 661, 637, 613, 585, 548		
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆):	δ [ppm]= 1,31 (t, 3H, J=7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 4,40 (q, 2H, J=7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 4,86 (d, 2H, J=5,6 Hz, CH ₂ -NH), 7,06 (m, 1H, 1HAr), 7,20 (m, 2H, 2HAr), 7,43 (m, 1H, 1HAr), 7,65 (m, 1H, 1HAr), 9,41 (t, 1H, J=5,6 Hz, NH-CH ₂), 11,68 (s, 1H, NH-indol)		
Elementna analiza za C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₄ :		Izračunana	Ugotovljena
%C	57,32	57,31	
%H	4,49	4,41	
%N	17,83	17,38	
MS (ESI):	315 [M+H] ⁺		
HR-MS:	315,1091 [M+H] ⁺ , (izračunana: 315,1093)		
Mr (izračunana):	314		

4.2.4. SINTEZA ETIL 5-[(4-CIANOBENZAMIDO)METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA

Reakcija:



Postopek:

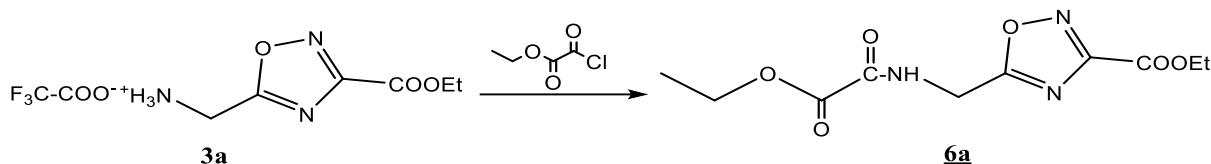
0,30 g (1,1 mmol) spojine **3a** raztopimo v 10 mL diklorometana, dodamo 307 µL (2,2 mmol) trietilamina ter mešamo 10 minut. Nato reakcijsko zmes ohladimo na 0 °C ter po kapljicah dodajamo 0,18 g (1,1 mmol) 4-ciano benzoil klorida, raztopljenega v 10 mL diklorometana. Reakcijo pustimo čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji uparimo diklorometan. Dobljeno zmes prelijemo z 20 mL vode ter izpadel produkt (**5a**) ločimo s filtracijo. Po potrebi produkt raztopimo v 15 mL etilacetata in speremo z 2-krat 15 mL nasičene raztopine NaHCO₃, 1M HCl, vode in nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄ ter uparimo topilo.

Preglednica IV: Rezultati za spojino **5a**

Izkoristek:	0,19 g (58 %)	
Tališče:	116-119 °C	
Rf:	0,47 (MF-4), detekcija: ninhidrin	
IR (KBr, cm ⁻¹):	3309, 2933, 2243, 1752, 1646, 1612, 1577, 1553, 1498, 1474, 1408, 1379, 1356, 1322, 1311, 1290, 1197, 1160, 1068, 1036, 1024, 1013, 997, 989, 915, 869, 841, 799, 769, 741, 657, 634, 562, 546, 528, 505	
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)*:	δ [ppm]= 1,31 (t, 3H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 4,40 (q, 2H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 4,85 (d, 2H, <i>J</i> =5,6 Hz, CH ₂ -NH), 8,10-8,50 (m, 4H, 4HAr), 9,71 (t, 1H, <i>J</i> =5,6 Hz, NH-CO) *V spektru je viden signal za vodo.	
Elementna analiza za C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₄ :	Izračunana	
%C	56,00	
%H	4,03	
%N	18,66	
Elementna analiza za C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₄ × 0,1H ₂ O:	Izračunana	Ugotovljena
%C	55,67	55,28
%H	4,07	3,78
%N	18,55	18,14
MS (ESI):	301 [M+H] ⁺	
HR-MS:	301,0933 [M+H] ⁺ , (izračunana: 301,0937)	
Mr (izračunana):	300	

4.2.5. SINTEZA ETIL 5-[(2-ETOksi-2-OKSOACETAMIDO)METIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA

Reakcija:



Postopek:

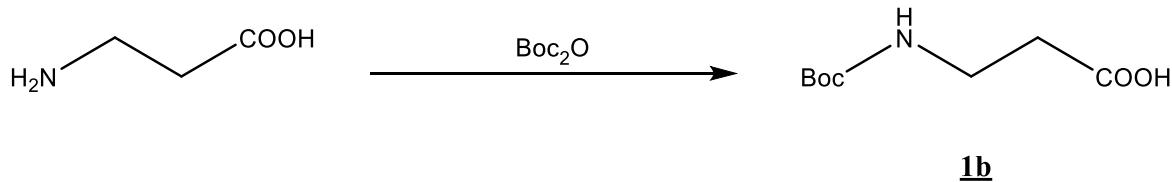
0,30 g (1,1 mmol) spojine **3a** raztopimo v 10 mL diklorometana, dodamo 307 µL (2,2 mmol) trietilamina ter mešamo 10 minut. Nato reakcijsko zmes ohladimo na 0 °C ter po kapljicah dodajamo 122 µL (1,1 mmol) etil oksalil klorida, raztopljenega v 10 mL diklorometana. Reakcijo pustimo čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji uparimo diklorometan. Zmes raztopimo v 15 mL etilacetata in speremo z 2-krat 15 mL nasičene raztopine NaHCO₃, 1M HCl, vode in nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄ ter uparimo topilo.

Preglednica V: Rezultati za spojino 6a

Izkoristek:	0,16 g (53 %)	
Tališče:	95-99 °C	
Rf:	0,51 (MF-4), detekcija: ninhidrin	
IR (KBr, cm ⁻¹):	3253, 2987, 1744, 1713, 1698, 1673, 1580, 1540, 1494, 1472, 1450, 1420, 1393, 1373, 1314, 1276, 1202, 1115, 1076, 1036, 1011, 917, 892, 860, 841, 799, 714, 665, 640, 559, 526	
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆):	δ [ppm]= 1,28 (t, 3H, J=7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 1,32 (t, 3H, J=7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 4,27 (q, 2H, J=7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 4,40 (q, 2H, J=7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 4,72 (d, 2H, J=5,8 Hz, NH-CH ₂), 9,76 (t, 1H, J=5,7 Hz, NH-CH ₂)	
Elementna analiza za C ₁₀ H ₁₃ N ₃ O ₆ :	Izračunana %C %H %N	Ugotovljena 44,28 4,83 15,49
MS (ESI):	272 [M+H] ⁺	
HR-MS:	272,0888 [M+H] ⁺ , (izračunana: 272,0883)	
Mr (izračunana):	271	

4.2.6. SINTEZA 3-[(t-BUTILOKSIKARBONIL)AMINO]PROPANOJSKE KISLINE

Reakcija:



1b

Postopek:

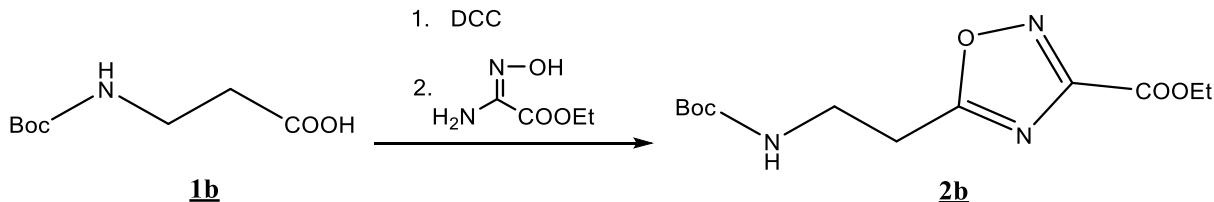
V 55 mL 1 M NaOH, 55 mL vode in 55 mL dioksana raztopimo 4,72 g (53,0 mmol) β -alanina ter zmes ohladimo na ledeni kopeli. Ko dosežemo temperaturo 10 °C, po kapljicah dodajamo 13,881 g (63,6 mmol) di-t-butil dikarbonata raztopljenega v 55 mL dioksana. Pri sobni temperaturi mešano 30 minut, nato zmesi pri znižanem tlaku odparimo dioksan. Preostanku dodamo 20 mL vode ter ekstrahiramo z 2-krat 25 mL dietilnega etra. Vodno fazo nakisamo z 2 M HCl do pH=2-3, nato ponovno ekstrahiramo s 3-krat 25 mL etilacetata. Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , prefiltriramo ter uparimo topilo. Nastane brezbarvna viskozna tekočina, ki kristalizira v bele kristale.

Preglednica VI: Rezultati za spojino **1b**

Izkoristek:	8,64 g (86 %)	
Tališče:	76-79 °C	Lit. podatki: 76-78 °C (22)
Rf:	0,37 (MF-1), detekcija: ninhidrin	
IR (KBr, cm^{-1}):	3438, 2967, 2911, 1698, 1509, 1456, 1440, 1407, 1392, 1378, 1365, 1353, 1292, 1237, 1216, 1159, 995, 979, 938, 891, 863, 838, 780, 762, 646, 552	
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d_6):	δ [ppm]= 1,37 (s, 9H, BOC), 2,34 (t, 2H, $J=7,1$ Hz, $\text{CH}_2\text{-CO}$), 3,11 (m, 2H, NH-CH_2), 6,81 (t, 1H, $J=5,2$ Hz, NH-CH_2), 12,17 (s, 1H, COOH)	

4.2.7. SINTEZA ETIL 5-{[(t-BUTILOKSIKARBONIL)AMINO]ETIL}-1,2,4-OKSADIAZOL-3- KARBOKSILATA

Reakcija:



Postopek:

V 70 mL kloroformu raztopimo 10,00 g (52,9 mmol) spojine **1b** in zmes damo na ledeno kopel. Ko zmes doseže temperaturo med 0 in -5 °C, dodamo 5,47 g (26,5 mmol) DCC ter reakcijo pustimo teči pri isti temperaturi. Po 2 urah zmesi odfiltriramo nastalo dicikloheksil sečnino, filtrat pa uparimo. Pri odparevanju ne smemo preseči temperature 40 °C. Nastalo viskozno raztopino raztopimo v 20 mL piridina, dodamo 2,33 g (17,6 mmol) etil 2-oksiiminooksamata ter zmes segrevamo 3 ure na oljni kopeli ob vrenju (132 °C). Po končani reakciji zmesi odparimo piridin ter zaostanek raztopimo v 80 mL etra in speremo z 2-krat 20 mL vode, nasičene raztopine NaHCO₃, 1 M HCl in nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, prefiltriramo ter uparimo topilo. Zmes raztopimo v MF-2 ter produkt (**2b**) ločimo na koloni.

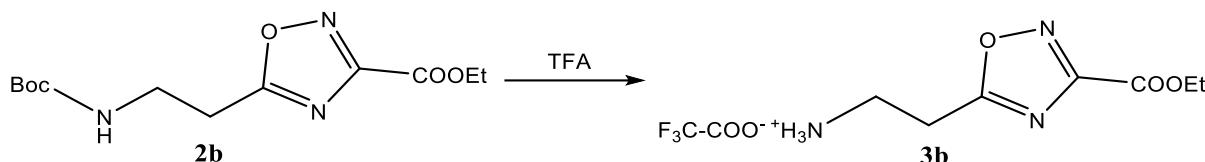
Preglednica VII: Rezultati za spojino **2b**

Izkoristek:	2,89 g (58 %)
Tališče:	53-56 °C
Rf:	0,38 (MF-2), detekcija: ninhidrin
IR (KBr, cm ⁻¹):	3332, 2981, 2933, 2854, 1743, 1716, 1686, 1644, 1582, 1529, 1496, 1479, 1450, 1422, 1392, 1366, 1340, 1292, 1268, 1247, 1206, 1167, 1116, 1073, 1026, 1012, 997, 971, 903, 891, 853, 841, 800, 782, 747, 643, 566, 548
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)*:	δ [ppm]= 1,31-1,34 (m, 12H, BOC, CH ₂ -CH ₃), 3,11 (t, 2H, <i>J</i> =6,6 Hz, CH ₂ -oksadiazol), 3,36 (m, 2H, NH-CH ₂), 4,40 (q, 2H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 7,05 (t, 1H, <i>J</i> =5,8 Hz, NH-CH ₂)

	*V spektru je viden signal za heksan.	
Elementna analiza za $C_{12}H_{19}N_3O_5$:	Izračunana	
	%C	50,52
	%H	6,71
Elementna analiza za $C_{12}H_{19}N_3O_5 \times 0,1C_6H_{14}$:	%N	14,73
	Izračunana	Ugotovljena
	%C	51,49
MS (ESI):	%H	7,00
	%N	14,30
HR-MS:	308,1226 [M+Na] ⁺ , (izračunana: 308,1222)	
Mr (izračunana):	285	

4.2.8. SINTEZA SOLI 2-[3-(ETOJSIKARBONIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL]ETAN-1-AMINA IN TRIFLUOROOOCETNE KISLINE

Reakcija:



Postopek:

V 20 mL diklorometana raztopimo 0,50 g (1,8 mmol) spojine **2b** ter zmes ohladimo na ledeni kopeli do 0 °C. Dodamo 1 mL trifluoroocetne kisline ter reakcijo pustimo čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji odparimo topilo, viskozni zaostanek pa prelijemo z etrom (v katerem spojina izpade) in ponovno odparimo topilo. To ponovimo 3-krat. Spojina je rumeno-prozorna viskozna tekočina.

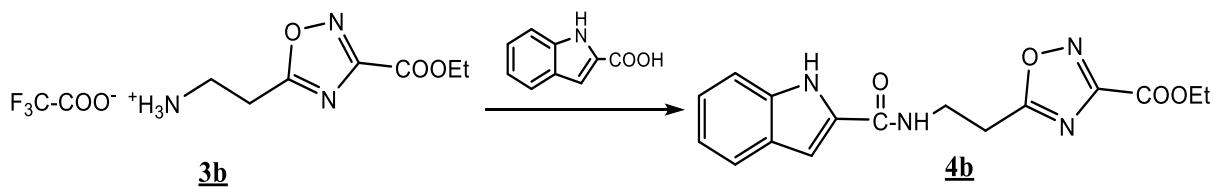
Preglednica VIII: Rezultati za spojino **3b**

Izkoristek:	0,49 g (91 %)
Rf:	0,40 (MF-3), detekcija: ninhidrin
IR (KBr, cm^{-1}):	2944, 2361, 1740, 1671, 1579, 1507, 1386, 1353, 1137, 1034, 1010, 961, 914, 842, 797, 723, 705, 641, 598, 518

¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)*:	δ [ppm]= 1,33 (t, 3H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 3,35 (m, 4H, NH ₃ -CH ₂ , CH ₂ -CH ₂), 4,42 (q, 2H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 8,06-8,08 (rs, 3H, NH ₃ ⁺ -CH ₂) *V spektru je viden signal za diklorometan.		
Elementna analiza za C ₉ H ₁₂ N ₃ O ₅ F ₃ :	Izračunana		
%C	36,13		
%H	4,04		
%N	14,04		
Elementna analiza za C ₉ H ₁₂ N ₃ O ₅ F ₃ × 0,75CH ₂ Cl ₂ :	Izračunana	Ugotovljena	
%C	32,27	32,57	
%H	3,75	3,67	
%N	11,58	11,10	
MS (ESI):	186 [M+H] ⁺		
HR-MS:	186,0874 [M+H] ⁺ , (izračunana: 186,0879)		
Mr (izračunana):	186 [M-F ₃ CCOO] ⁺		

4.2.9. SINTEZA ETIL 5-[2-(1H-INDOL-2-KARBOKSIAMIDO)ETIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA

Reakcija:



Postopek:

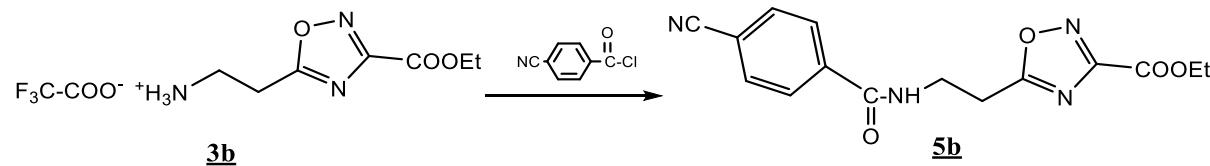
V 20 mL dimetilformamida raztopimo 0,30 g (1,0 mmol) spojine **3b** in 0,16 g (1,0 mmol) 2-indol karboksilne kisline ter zmes ohladimo na -10 °C na ledeni kopeli. Dodamo 0,16 g (1,2 mmol) HOBt, 363 µL (3,3 mmol) NMM in 0,25 g (1,3 mmol) EDC. Pazimo, da se temperatura med dodajanjem reagentov ne dvigne. Reakcijo pustimo mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji odparimo topilo ter zmes raztopimo v 15 mL etilacetata. Organsko fazo spiramo z 2-krat 15 mL nasičene raztopine NaHCO₃, 1M HCl, vode in nasičene raztopine NaCl ter sušimo z Na₂SO₄. Po odparitvi topila dobimo bele kristale.

Preglednica IX: Rezultati za spojino **4b**

Izkoristek:	0,18 g (55 %)		
Tališče:	215-218 °C		
Rf:	0,66 (MF-4), detekcija: ninhidrin		
IR (KBr, cm ⁻¹):	3363, 3264, 1737, 1726, 1635, 1577, 1549, 1498, 1468, 1441, 1418, 1384, 1343, 1312, 1302, 1269, 1250, 1211, 1173, 1136, 1116, 1067, 1049, 1023, 983, 922, 849, 821, 778, 749, 719, 694, 642, 613, 579, 545		
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆):	δ [ppm] = 1,31 (t, 3H, J=7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 3,29-3,32 (m, 2H, CH ₂ -oksadiazol), 3,72-3,75 (m, 2H, NH-CH ₂ -CH ₂), 4,39 (q, 2H, J=7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 7,04 (m, 2H, 2HAr), 7,17 (m, 1H, 1HAr), 7,41 (m, 1H, 1HAr), 7,60 (m, 1H, 1HAr), 8,72 (m, 1H, NH-CO), 11,59 (s, 1H, NH-indol)		
Elementna analiza za C ₁₆ H ₁₆ N ₄ O ₄ :		Izračunana	Ugotovljena
%C	58,53	58,25	
%H	4,91	4,99	
%N	17,06	16,57	
MS (ESI):	329 [M+H] ⁺		
HR-MS:	329,1253 [M+H] ⁺ , (izračunana: 329,1236)		
Mr (izračunana):	328		

4.2.10. SINTEZA ETIL 5-[2-(4-CIANOBENZAMIDO)ETIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA

Reakcija:



Postopek:

0,30 g (1,0 mmol) spojine **3b** raztopimo v 10 mL diklorometana, dodamo 279 µL (2,0 mmol) trietilamina ter mešamo 10 minut. Nato reakcijsko zmes ohladimo na 0 °C ter po kapljicah dodajamo 0,17 g (1,0 mmol) 4-ciano benzoil klorida, raztopljenega v 10 mL diklorometana. Reakcijo pustimo čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji uparimo diklorometan.

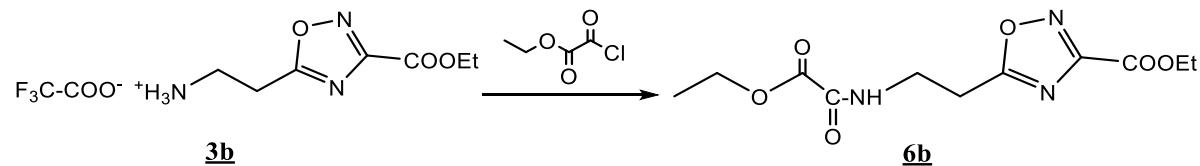
Dobljeno zmes prelijemo z 20 mL vode ter izpadel produkt (**5b**) ločimo s filtracijo. Po potrebi produkt raztopimo v 15 mL etilacetata in speremo z 2-krat 15 mL nasičene raztopine NaHCO₃, 1M HCl, vode in nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄ ter uparimo topilo.

Preglednica X: Rezultati za spojino **5b**

Izkoristek:	0,14 g (45 %)		
Tališče:	135-136 °C		
Rf:	0,63 (MF-4), detekcija: ninhidrin		
IR (KBr, cm ⁻¹):	3309, 2231, 1742, 1640, 1581, 1540, 1493, 1441, 1383, 1328, 1291, 1276, 1199, 1164, 1118, 1098, 1062, 1018, 985, 908, 862, 843, 766, 739, 695, 676, 639, 566, 527		
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆):	δ [ppm]= 1,32 (t, 3H, J=7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 3,30 (t, 2H, J=6,8 Hz, NH-CH ₂ -CH ₂), 3,70 (m, 2H, NH-CH ₂), 4,40 (q, 2H, J=7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 7,93-7,98 (m, 4H, 4HAr), 8,96 (t, 1H, J=5,6 Hz, NH-CO)		
Elementna analiza za C ₁₅ H ₁₄ N ₄ O ₄ :		Izračunana	Ugotovljena
%C	57,32	57,42	
%H	4,49	4,46	
%N	17,83	17,72	
MS (ESI):	315 [M+H] ⁺		
HR-MS:	315,1092 [M+H] ⁺ , (izračunana: 315,1093)		
Mr (izračunana):	314		

4.2.11. SINTEZA ETIL 5-[2-(2-ETOKSI-2-OKSOACETAMIDO)ETIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA

Reakcija:



Postopek:

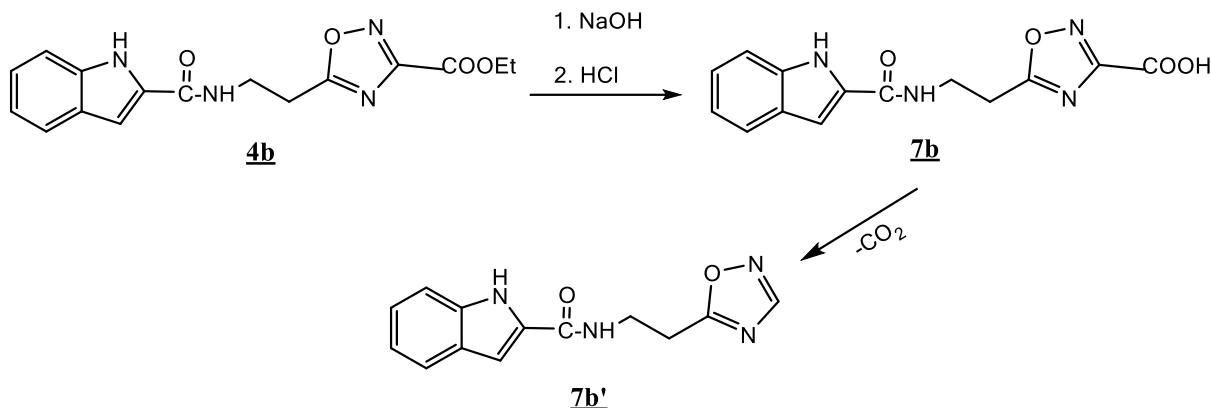
0,30 g (1,0 mmol) spojine **3b** raztopimo v 10 mL diklorometana, dodamo 279 µL (2,0 mmol) trietilamina ter mešamo 10 minut. Nato reakcijsko zmes ohladimo na 0 °C ter po kapljicah dodajamo 111 µL (1,0 mmol) etil oksalil klorida, raztopljenega v 10 mL diklorometana. Reakcijo pustimo čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji uparimo diklorometan. Zmes raztopimo v 15 mL etilacetata in speremo z 2-krat 15 mL nasičene raztopine NaHCO₃, 1M HCl, vode in nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄ ter uparimo topilo.

Preglednica XI: Rezultati za spojino **6b**

Izkoristek:	0,22 g (76 %)		
Tališče:	70-73 °C		
Rf:	0,53 (MF-4), detekcija: ninhidrin		
IR (KBr, cm ⁻¹):	3300, 1749, 1735, 1706, 1676, 1577, 1545, 1494, 1470, 1381, 1309, 1268, 1204, 1114, 1074, 1052, 1015, 986, 915, 863, 842, 798, 772, 726, 699, 643, 525		
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆):	δ [ppm]= 1,26 (t, 3H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 1,32 (t, 3H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 3,23 (t, 2H, <i>J</i> =6,8 Hz, NH-CH ₂ -CH ₂), 3,57 (m, 2H, NH-CH ₂ -CH ₂), 4,22 (q, 2H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 4,40 (q, 2H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 9,15 (t, 1H, <i>J</i> =5,8 Hz, NH-CO)		
Elementna analiza za C ₁₁ H ₁₅ N ₃ O ₆ :	Izračunana	Ugotovljena	
%C	46,32	46,08	
%H	5,30	5,31	
%N	14,73	14,40	
MS (ESI):	286 [M+H] ⁺		
HR-MS:	286,1031 [M+H] ⁺ , (izračunana: 286,1039)		
Mr (izračunana):	285		

4.2.12. SINTEZA 5-[2-(1H-INDOL-2-KARBOKSIAMIDO)ETIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILNE KISLINE

Reakcija:



Dejanski produkt:

N-[2-(1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL)ETIL]-1H-INDOL-2-KARBOKSIAMID

Postopek:

0,05 g (0,15 mmol) spojine **4b** raztopimo v 20 mL etanola, dodamo 150 μ L 2 M raztopine NaOH ter pustimo mešati 2 dni pri sobni temperaturi. Po končani reakciji odparimo topilo, ostanek raztopimo v 15 mL vode in speremo z 15 mL etilacetata. Vodno fazo nakisamo s 5 M raztopino HCl do pH 4 ter ekstrahiramo z etilacetatom. Organsko fazo nato speremo z 2-krat 15 mL vode in nasičene raztopine NaCl, sušimo z Na_2SO_4 ter uparimo topilo.

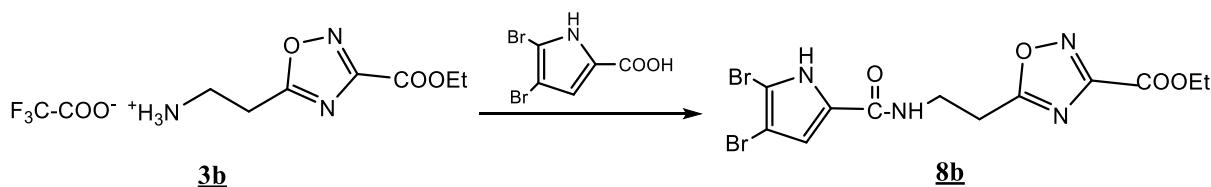
Preglednica XII: Rezultati za spojino 7b'

Izkoristek:	0,035 g (78 %)
Tališče:	115-119 °C
Rf:	0,71 (MF-3), detekcija: ninhidrin
IR (KBr, cm ⁻¹):	3263, 2920, 2851, 1634, 1549, 1488, 1414, 1373, 1338, 1308, 1293, 1258, 1126, 1078, 1050, 1018, 989, 906, 826, 813, 768, 746, 699, 663, 635, 574, 534, 508
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆):	δ [ppm]= 3,27 (m, 2H, CH ₂ -NH), 3,52 (m, 2H, NH-CH ₂ -CH ₂), 7,05 (m, 2H, 2HAr), 7,17 (m, 1H, 1HAr), 7,41 (m, 1H, 1HAr), 7,60 (m, 1H, 1HAr), 8,60 (m, 1H, 1H-oksadiazol), 8,72 (m, 1H, NH-CO), 11,59 (m, 1H, NH-indol)
Elementna sestava:	C ₁₃ H ₁₂ N ₄ O ₂
MS (ESI):	255 [M-H] ⁻

HR-MS:	255,0878 [M-H] ⁻ , (izračunana: 255,0882)
Mr (izračunana):	256

4.2.13. SINTEZA 5-[2-(4,5-DIBROMO-1H-PIROL-2-KARBOKSIAMIDO)ETIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA

Reakcija:



Postopek:

V 30 mL diklorometana raztopimo 0,02 g (0,1 mmol) TCT, zmes ohladimo na ledeni kopeli na 0 °C ter dodamo 32 µL (0,3 mmol) NMM in 0,08 g (0,3 mmol) 4,5-dibromopirol-2-karboksilne kisline. Reakcijo mešamo 1 uro pri 0 °C, nato dodamo 0,10 g (0,3 mmol) spojine **3b** in še 32 µL (0,3 mmol) NMM. Reakcijo pustimo mešati 3 dni pri sobni temperaturi. Po končani reakciji odparimo topilo, ostanek raztopimo v 15 mL diklorometana in spiramo z 2-krat 15 mL nasičene raztopine NaHCO₃, 1M HCl, vode in nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄ ter uparimo topilo.

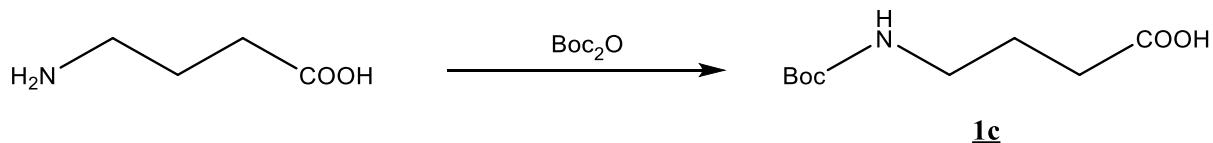
Preglednica XIII: Rezultati za spojino **8b**

Izkoristek:	0,072 g (55 %)
Tališče:	117-121 °C
Rf:	0,52 (MF-4), detekcija: ninhidrin
IR (KBr, cm ⁻¹):	2977, 1689, 1522, 1452, 1393, 1367, 1250, 1162, 1087, 1001, 851, 779, 560
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆):	δ [ppm] = 1,31 (t, 3H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 3,23-3,29 (m, 2H, CH ₂ -oksadiazol), 3,64 (q, 2H, <i>J</i> =6,0 Hz, CH ₂ -CH ₂ -oksadiazol), 4,39 (q, 2H, <i>J</i> =7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 6,87 (s, 1H, 1HAr), 8,38 (s, 1H, NH-CO), 12,73 (s, 1H, NH-pirol)
Elementna sestava:	C ₁₂ H ₁₂ N ₄ O ₄ Br ₂

MS (ESI):	435 [M-H] ⁻
HR-MS:	434,9149 [M-H] ⁻ , (izračunana: 434,9147)
Mr (izračunana):	436

4.2.14. SINTEZA 4-[(t-BUTILOKSIKARBONIL)AMINO]BUTANOJSKE KISLINE

Reakcija:



Postopek:

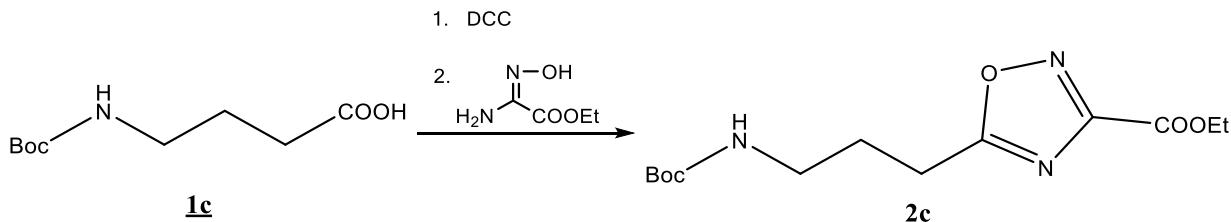
V 50 mL 1 M NaOH, 50 mL vode in 50 mL dioksana raztopimo 5,07 g (49,2 mmol) 4-aminobutanojske kisline ter zmes ohladimo na ledeni kopeli. Ko dosežemo temperaturo 10 °C, po kapljicah dodajamo 12,83 g (58,8 mmol) di-t-butil dikarbonata raztopljenega v 50 mL dioksana. Pri sobni temperaturi mešano 30 minut, nato zmesi pri znižanem tlaku odparimo dioksan. Preostanku dodamo 20 mL vode, ter ekstrahiramo z 2-krat 25 mL dietilnega etra. Vodno fazo nakisamo z 2 M HCl do pH=2-3, nato ponovno ekstrahiramo s 3-krat 25 mL etilacetata. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, prefiltriramo ter uparimo topilo. Nastane brezbarvna viskozna tekočina, ki v hladilniku počasi kristalizira.

Preglednica XIV: Rezultati za spojino 1c

Izkoristek:	8,59 g (86 %)
Tališče:	55-56 °C
	Lit. podatki: 55-57 °C (22)
Rf:	0,39 (MF-1), detekcija: ninhidrin
IR (KBr, cm ⁻¹):	3367, 2989, 2967, 1704, 1676, 1516, 1482, 1462, 1446, 1431, 1412, 1389, 1366, 1314, 1289, 1249, 1215, 1157, 1098, 1081, 1044, 1023, 997, 939, 872, 858, 783, 753, 677, 604, 549, 518
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆):	δ [ppm]= 1,37 (s, 9H, BOC), 1,59 (m, 2H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂), 2,19 (t, 2H, J =7,5 Hz, CH ₂ -CO), 2,92 (m, 2H, NH-CH ₂), 6,82 (t, 1H, J =5,5 Hz, NH-CO), 12,05 (rs, 1H, COOH)

4.2.15. SINTEZA ETIL 5-{[(T-BUTILOKSIKARBONIL)AMINO]ETIL}-1,2,4-OKSADIAZOL-3- KARBOKSILATA

Reakcija:



Postopek:

V 60 mL kloroformu raztopimo 8,60 g (42,3 mmol) spojine **1c** in zmes damo na ledeno kopel. Ko zmes doseže temperaturo med 0 in -5 °C, dodamo 4,37 g (21,2 mmol) DCC ter reakcijo pustimo teči pri isti temperaturi. Po 2 urah zmesi odfiltriramo nastalo dicikloheksil sečnino, filtratu pa uparimo topilo. Pri odparevanju ne smemo preseči temperature 40 °C. Nastalo viskozno raztopino raztopimo v 15 mL piridina, dodamo 1,86 g (14,1 mmol) etil 2-oksiiminooksamata ter zmes segrevamo 3 ure na oljni kopeli ob vrenju (124 °C). Po končani reakciji odparimo piridin ter zaostanek raztopimo v 60 mL etra in speremo z 2-krat 15 mL vode, nasičene raztopine NaHCO₃, 1 M HCl in nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, prefiltriramo ter uparimo topilo. Zmes raztopimo v MF-2 ter produkt (**2c**) ločimo na koloni.

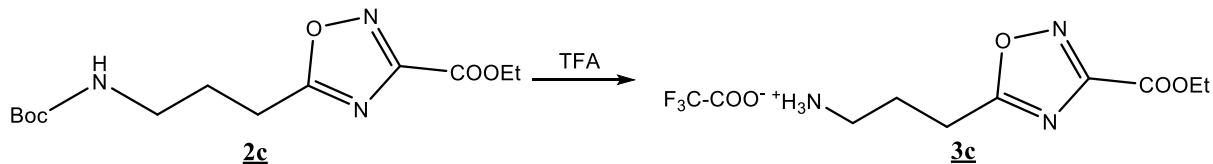
Preglednica XV: Rezultati za spojino **2c**

Izkoristek:	2,75 g (65 %)
Tališče:	31-33 °C
Rf:	0,29 (MF-2), detekcija: ninhidrin
IR (KBr, cm ⁻¹):	3362, 2978, 2934, 1743, 1682, 1577, 1522, 1495, 1478, 1446, 1414, 1388, 1364, 1310, 1283, 1247, 1217, 1160, 1095, 1073, 1051, 1031, 1011, 990, 908, 872, 856, 839, 799, 786, 755, 668, 636, 539

¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆):	δ [ppm]= 1,33 (t, 3H, $J=7,1$ Hz, CH ₂ -CH ₃), 1,37 (s, 9H, BOC), 1,87 (m, 2H, CH ₂ -CH ₂ -COOH), 3,01 (m, 4H, NH-CH ₂ , CH ₂ -COOH), 4,40 (q, 2H, CH ₂ -CH ₃), 6,93 (t, 1H, $J=5,6$ Hz, NH-CO)		
Elementna analiza za C ₁₃ H ₂₁ N ₃ O ₅ :	Izračunana	Ugotovljena	
	%C	52,16	52,60
	%H	7,07	7,26
%N	14,04	14,09	
MS (ESI):	322 [M+Na] ⁺		
HR-MS:	322,1372 [M+Na] ⁺ , (izračunana: 322,1379)		
Mr (izračunana):	299		

4.2.16. SINTEZA SOLI 3-[3-(ETOJSIKARBONIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-5-IL]PROPAN-1-AMINA IN TRIFLUOROOACETNE KISLINE

Reakcija:



Postopek:

V 20 mL diklorometana raztopimo 0,50 g (1,7 mmol) spojine **2c** ter zmes ohladimo na ledeni kopeli do 0 °C. Dodamo 1 mL trifluoroacetne kisline ter reakcijo pustimo čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji odparimo topilo, viskozni zaostanek pa prelijemo z etrom (v katerem spojina izpade) in ponovno odparimo topilo. To ponovimo 3-krat. Spojina je rumeno-prozorna viskozna tekočina.

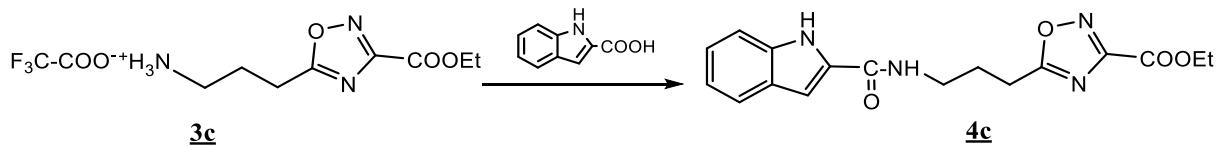
Preglednica XVI: Rezultati za spojino **3c**

Izkoristek:	0,48 g (91 %)
Rf:	0,53 (MF-3), detekcija: ninhidrin

IR (KBr, cm ⁻¹):	2990, 1740, 1671, 1577, 1507, 1473, 1386, 1354, 1139, 1035, 845, 797, 723, 704, 642, 598, 518	
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)*:	δ [ppm]= 1,33 (t, 3H, J=7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 2,07 (m, 2H, CH ₂ -CH ₂), 2,95 (m, 2H, NH-CH ₂), 3,15 (t, 2H, J=7,5 Hz, CH ₂ -oksadiazol), 4,41 (q, 2H, J=7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 7,95 (s, 3H, NH ₃ ⁺ -CH ₂) *V spektru je viden signal za diklorometan.	
Elementna analiza za C ₁₀ H ₁₄ N ₃ O ₅ F ₃ :	Izračunana	
%C	%C	38,35
	%H	4,51
	%N	13,42
Elementna analiza za C ₁₀ H ₁₄ N ₃ O ₅ F ₃ x 1CH ₂ Cl ₂ :	Izračunana	Ugotovljena
%C	33,18	33,32
	%H	4,05
	%N	10,55
MS (ESI):	200 [M+H] ⁺	
HR-MS:	200,1039 [M+H] ⁺ , (izračunana: 200,1035)	
Mr (izračunana):	200 [M-F ₃ CCOO] ⁺	

4.2.17. SINTEZA ETIL 5-[3-(1H-INDOL-2-KARBOKSIAMIDO)PROPIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA

Reakcija:



Postopek:

V 20 mL dimetilformamida raztopimo 0,30 g (1,0 mmol) spojine **3c** in 0,16 g (1,0 mmol) 2-indol karboksilne kisline ter zmes ohladimo na -10 °C na ledeni kopeli. Dodamo 0,16 g (1,2 mmol) HOBt, 363 µL (3,3 mmol) NMM in 0,25 g (1,3 mmol) EDC. Pazimo, da se temperatura med dodajanjem reagentov ne dvigne. Reakcijo pustimo mešati čez noč pri sobni temperaturi.

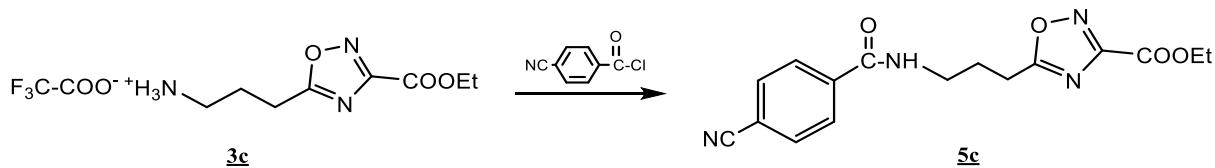
Po končani reakciji odparimo topilo ter zmes raztopimo v 15 mL etilacetata. Organsko fazo spiramo z 2-krat 15 mL nasičene raztopine NaHCO₃, 1M HCl, vode in nasičene raztopine NaCl ter sušimo z Na₂SO₄. Po odparitvi topila dobimo bele kristale.

Preglednica XVII: Rezultati za spojino 4c

Izkoristek:	0,08 g (24 %)		
Tališče:	130-132 °C		
Rf:	0,72 (MF-4), detekcija: ninhidrin		
IR (KBr, cm ⁻¹):	3382, 3259, 2938, 1740, 1648, 1582, 1553, 1501, 1468, 1442, 1421, 1388, 1344, 1308, 1268, 1254, 1209, 1177, 1154, 1141, 1088, 1062, 1030, 1003, 986, 923, 911, 885, 847, 819, 798, 778, 745, 723, 640, 612, 569, 546		
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆):	δ [ppm]= 1,30 (t, 3H, J=7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 2,08 (m, 2H, CH ₂ -CH ₂), 3,11 (t, 2H, J=7,5 Hz, CH ₂ -oksadiazol), 3,40 (m, 2H, NH-CH ₂), 4,37 (q, 2H, J=7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 7,09 (m, 1H, 1HAr), 7,08 (m, 1H, 1HAr), 7,17 (m, 1H, 1HAr), 7,42 (m, 1H, 1HAr), 7,56 (m, 1H, 1HAr), 8,56 (t, 1H, J=5,6 Hz, NH-CO), 11,56 (s, 1H, NH-indol)		
Elementna analiza za C ₁₇ H ₁₈ N ₄ O ₄ :		Izračunana	Ugotovljena
	%C	59,64	60,06
	%H	5,30	4,96
	%N	16,37	16,24
MS (ESI):	343 [M+H] ⁺		
HR-MS:	343,1403 [M+H] ⁺ , (izračunana: 343,1393)		
Mr (izračunana):	342		

4.2.18. SINTEZA ETIL 5-[3-(4-CIANOBENZAMIDO)PROPIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA

Reakcija:



Postopek:

0,30 g (1,0 mmol) spojine **3c** raztopimo v 10 mL diklorometana, dodamo 279 µL (2,0 mmol) trietylamina ter mešamo 10 minut. Nato reakcijsko zmes ohladimo na 0 °C ter po kapljicah dodajamo 0,17 g (1,0 mmol) 4-ciano benzoil klorida, raztopljenega v 10 mL diklorometana. Reakcijo pustimo čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji uparimo diklorometan. Dobljeno zmes prelijemo z 20 mL vode ter izpadel produkt (**5c**) ločimo s filtracijo. Po potrebi produkt raztopimo v 15 mL etilacetata in speremo z 2-krat 15 mL nasičene raztopine NaHCO₃, 1M HCl, vode in nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄ ter uparimo topilo.

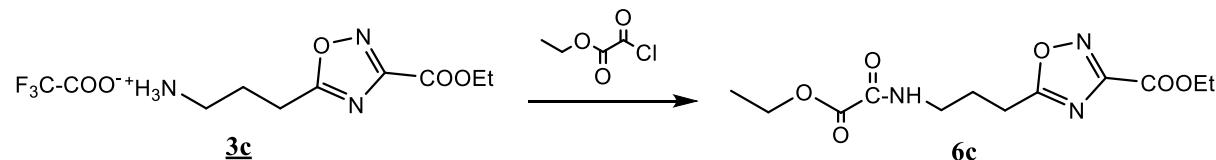
Preglednica XVIII: Rezultati za spojino **5c**

Izkoristek:	0,15 g (45 %)
Tališče:	119-122 °C
Rf:	0,66 (MF-4), detekcija: ninhidrin
IR (KBr, cm ⁻¹):	3308, 2228, 1745, 1702, 1643, 1556, 1496, 1478, 1459, 1416, 1388, 1319, 1305, 1285, 1240, 1205, 1173, 1157, 1113, 1099, 1048, 1027, 979, 930, 910, 891, 877, 859, 843, 800, 765, 726, 683, 665, 639, 565, 548, 519
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)*:	δ [ppm]= 1,31 (t, 3H, J=7,1 Hz, CH ₂ -CH ₃), 2,06 (m, 2H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂), 3,09 (m, 2H, CH ₂ -oksadiazol), 3,40 (m, 2H, NH-CH ₂), 4,39 (m, 2H, CH ₂ -CH ₃), 7,97 (m, 4H, 4HAr), 8,08 (m, 1H, NH-CO) *V spektru je viden signal za diklorometan.

Elementna analiza za C ₁₆ H ₁₆ N ₄ O ₄ :		Izračunana	
	%C	58,53	
	%H	4,91	
	%N	17,06	
Elementna analiza za C ₁₆ H ₁₆ N ₄ O ₄ x 0,05CH ₂ Cl ₂ :		Izračunana	Ugotovljena
	%C	57,96	57,80
	%H	4,88	4,88
	%N	16,85	16,72
MS (ESI):	329 [M+H] ⁺		
HR-MS:	329,1256 [M+H] ⁺ , (izračunana: 329,1250)		
Mr (izračunana):	328		

4.2.19. SINTEZA ETIL 5-[3-(2-ETOKSI-2-OKSOACETAMIDO)PROPIL]-1,2,4-OKSADIAZOL-3-KARBOKSILATA

Reakcija:



Postopek:

0,30 g (1,0 mmol) spojine **3c** raztopimo v 10 mL diklorometana, dodamo 279 μL (2,0 mmol) trietilamina ter mešamo 10 minut. Nato reakcijsko zmes ohladimo na 0 °C ter po kapljicah dodajamo 111 μL (1,0 mmol) etil oksalil klorida, raztopljenega v 10 mL diklorometana. Reakcijo pustimo čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji uparimo diklorometan. Zmes raztopimo v 15 mL etilacetata in speremo z 2-krat 15 mL nasičene raztopine NaHCO_3 , 1M HCl , vode in nasičene raztopine NaCl . Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 ter uparimo topilo.

Preglednica XIX: Rezultati za spojino **6c**

Izkoristek:	0,11 g (37 %)
Tališče:	88-91 °C

Špela Zotter: Sinteza 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov s potencialnim protimikrobnim delovanjem.

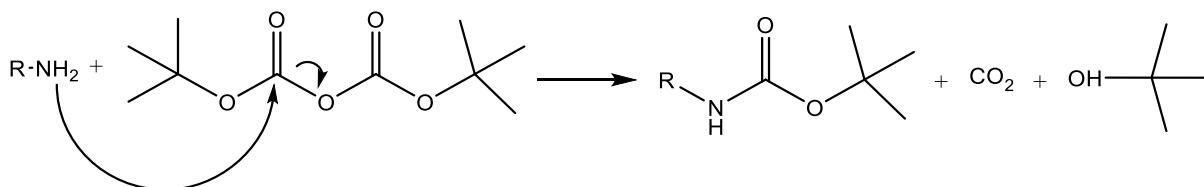
Rf:	0,48 (MF-4), detekcija: ninhidrin		
IR (KBr, cm^{-1}):	2967, 1698, 1509, 1456, 1439, 1407, 1392, 1378, 1365, 1353, 1291, 1236, 1216, 1159, 995, 978, 937, 891, 862, 837, 780, 761, 646, 552, 520		
$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d ₆)*:	δ [ppm]= 1,27 (t, 3H, $J=7,2$ Hz, CH ₂ -CH ₃), 1,33 (t, 3H, $J=7,1$ Hz, CH ₂ -CH ₃ ester oksadiazola), 1,99 (m, 2H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂), 3,03 (m, 2H, CH ₂ -oksadiazol), 3,25 (m, 2H, NH-CH ₂), 4,22 (q, 2H, $J=7,2$ Hz, CH ₂ -CH ₃), 4,41 (q, 2H, $J=7,1$ Hz, CH ₂ -CH ₃ ester oksadiazola), 9,01 (m, 1H, NH-CO) *V spektru je viden signal za diklorometan.		
Elementna analiza za C ₁₂ H ₁₇ N ₃ O ₆ :		Izračunana	
	%C	48,16	
	%H	5,73	
	%N	14,04	
Elementna analiza za C ₁₂ H ₁₇ N ₃ O ₆ x 0,07CH ₂ Cl ₂ :		Izračunana	Ugotovljena
	%C	47,50	47,01
	%H	5,66	5,50
	%N	13,77	13,62
MS (ESI):	300 [M+H] ⁺		
HR-MS:	300,1192 [M+H] ⁺ , (izračunana: 300,1196)		
Mr (izračunana):	299		

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. ZAŠČITA AMINSKIH SKUPIN AMINOKISLIN Z BOC SKUPINO

V prvi stopnji sinteze smo aminske skupine izhodnih aminokislin zaščitili z di-*t*-butil dikarbonatom (BOC skupino). To je ena izmed pogosto uporabljenih zaščitnih skupin, ki se uporablja za zaščito aminov. Ker so amini dobri nukleofili, jih je potrebno zaščititi, kadar so v reakcijski zmesi prisotni tudi elektrofili oz. kadar reakcije potekajo v kislih pogojih. Tako je preprečen nastanek stranskih produktov v naslednjih fazah sinteze. Zaščitne skupine morajo biti topne v večini topil, stabilne, v trdnem agregatnem stanju za lažje rokovanje z njimi in morajo omogočati učinkovit ter enostaven način njihovega odstranjevanja (23, 24).

Reakcija poteka z nukleofilno adicijo amina na karbonilno skupino di-*t*-butil dikarbonata izstopi pa *t*-butil karbonat, ki se veže s protonom iz amina ter razpade na stranska produkta CO₂ in *t*-butanol (Slika 16) (25).



Slika 16: Zaščita aminske skupine z BOC skupino

Z BOC skupino smo zaščitili aminske skupine β-alanina in 4-aminobutanojske kisline. Zaščiten BOC-glicin pa smo dobili že kot izhodni reagent na Fakulteti za farmacijo. Reakcije smo izvajali v zmesi vode, NaOH in dioksana pri sobni temperaturi. Zaščita obeh aminokislin je potekla v 30 minutah z enakim izkoristkom (86 %).

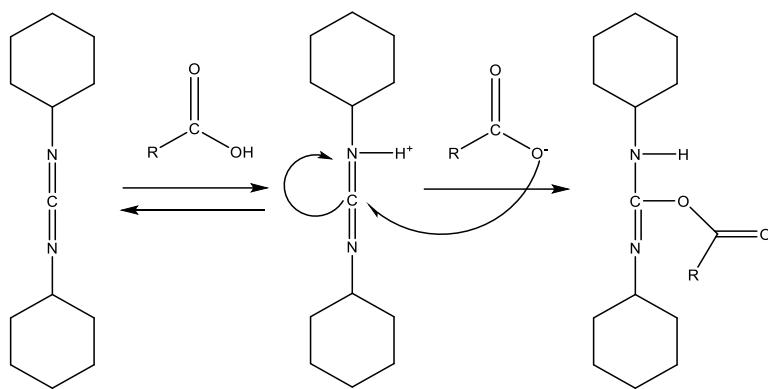
5.2. SINTEZA 3,5-DISUBSTITUIRANIH 1,2,4-OKSADIAZOLOV

Oksadiazoli so ciklične spojine. Njihov obroč sestavljata po dva atoma dušika, dva atoma ogljika in en atom kisika. Obstajajo štirje izomeri oksadiazolnih obročev. Mi smo se odločili za sintezo 1,2,4-oksadiazolov. Prvič so bili ti izomeri sintetizirani pred več kot 100 leti. Za sintezo 1,2,4-oksadiazolov obstaja več metod, najpogosteje pa se uporablja ciklokondenzacija amidoksimov s karboksilno kislino v prisotnosti sklopitvenih reagentov (26).

Reakcija sinteze 1,2,4-oksadiazolnih obročev poteka v dveh stopnjah. Najprej poteka aktivacija s sklopitvenimi reagenti, nato pa ciklizacija. Za aktivacijo v našem primeru karboksilnih skupin

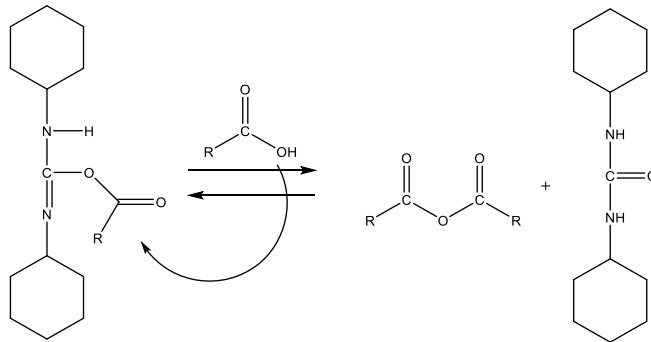
aminokislin lahko uporabimo različne sklopitvene reagente. Mi smo se odločili za uporabo DCC oz. *N,N*-dicikloheksil karbodiimida (26).

Pri reakciji med DCC in BOC-aminokislino pride do deprotonacije karboksilne skupine BOC-aminokisline. Sledi nukleofilna adicija karboksilatne skupine BOC-aminokisline na ogljikov atom molekule DCC. Tako se tvori aktiviran ester oz. O-acil sečnina (Slika 17) (27):



Slika 17: Aktivacija karboksilne kisline

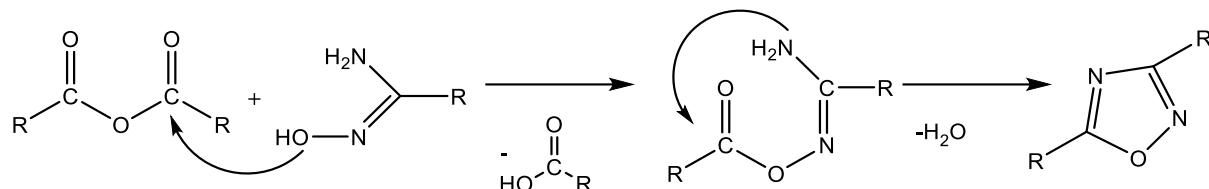
Zaradi prebitne količine BOC-aminokisline pride do nukleofilne adicije hidroksilne skupine na karbonilno skupino estra. Tako nastane anhidrid karboksilne kisline (Slika 18) (27):



Slika 18: Nastanek kislinskega anhidrida

Stranski produkt dicikloheksil sečnina je slabo topna v organskih topilih, zato jo lahko enostavno odstranimo s filtracijo. Reakcija aktivacije poteka pri nizki temperaturi, kar zagotovi nastanek O-acil sečnine. Pri višji temperaturi bi lahko, zaradi intramolekularne adicije amino skupine na karbonilno skupino, nastal stranski produkt N-acil sečnina (27).

Sledi reakcija ciklizacije med nastalim anhidridom in amidoksimom. Reakcija poteka preko O-aciliranega amidoksimskega intermediata, ki ciklizira pri povišani temperaturi v primerenem topilu (Slika 19) (28):



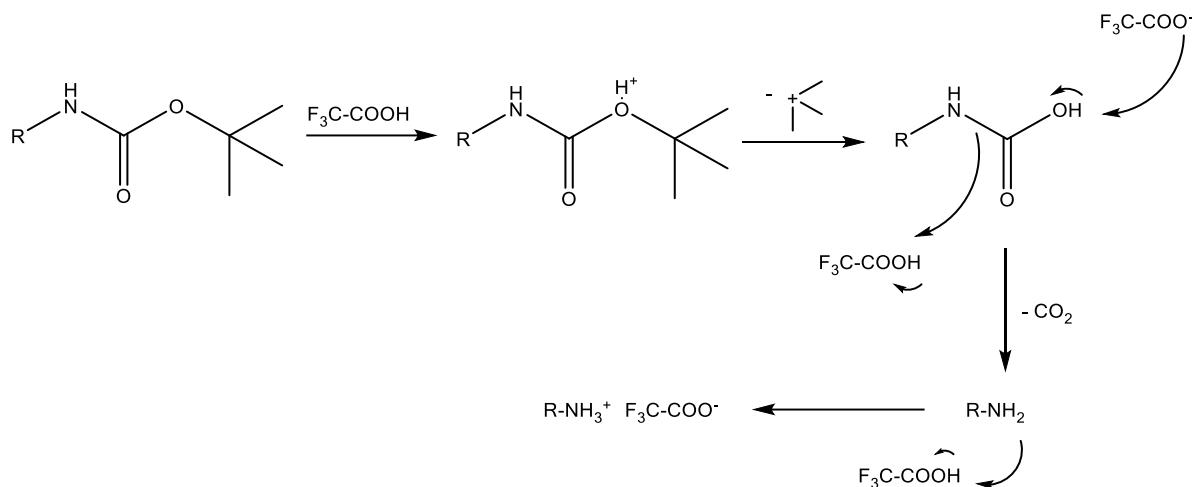
Slika 19: Nastanek 1,2,4-oksadiazolnega obroča

V magistrskem delu smo z etil 2-oksiiminooksamatom ciklizirali BOC-glicin, BOC- β -alanin in BOC-4-aminobutanojsko kislino. Aktivacijo smo izvajali v koroformu s pomočjo DCC. Po dveh urah, ko je reakcija potekla, smo stranski produkt dicikloheksil sečnino odfiltrirali z odsesavanjem ter odparili kloroform. Pri tem smo morali paziti, da nismo presegli temperature nad 40 °C. Po aktivaciji smo reakcijski zmesi dodali etil 2-oksiiminooksamat. Ciklizacija je potekala v piridinu, pri povišani temperaturi ob vrenju. Na začetku eksperimentalnega dela so bili izkoristki reakcij izjemno nizki (pod 5 %). Vzrok za to je bila uporaba preveč oksidiranega piridina, zato smo se odločili, da ga predestiliramo. Z nadaljnjiimi reakcijami ciklizacije nismo imeli težav.

Ker je tvorba 1,2,4-oksadiazolnega obroča večstopenjska reakcija, lahko v reakcijski zmesi opazimo tudi vmesne produkte ter izhodne spojine. Poleg tega so lahko prisotni tudi stranski produkti, kot sta N-acil sečnina in dicikloheksil sečnina. Zato je bilo, za izolacijo 1,2,4-oksadiazolov, potrebno uporabiti kolonsko kromatografijo. Izkoristki vseh treh reakcij so bili več kot 50 % (56 % za **2a**, 58 % za **2b** in 65% za **2c**), kar je zadovoljivo, če upoštevamo zgoraj omenjena dejstva.

5.3. ODSTRANITEV BOC SKUPINE S TRIFLUOROOCETNO KISLINO

Odstranitev zaščitnih skupin mora potekati pri milih pogojih, da ne vpliva na ostale skupine v spojini. Najpogosteje se za odstranitev BOC skupine uporablja trifluoroocetna kislina, reakcija pa poteka v diklorometanu (23). Zaradi trifluoroocetne kisline pride do protoniranja *t*-butil karbamata in odcepitve *t*-butilne skupine. Tako nastane karbaminska kislina, ki je nestabilna in dekarboksilira. Po dekarboksilaciji nastane prost amin, ki je v kislih pogojih v obliki soli trifluoroocetne kisline (29). Mehanizem je prikazan na Sliki 20.



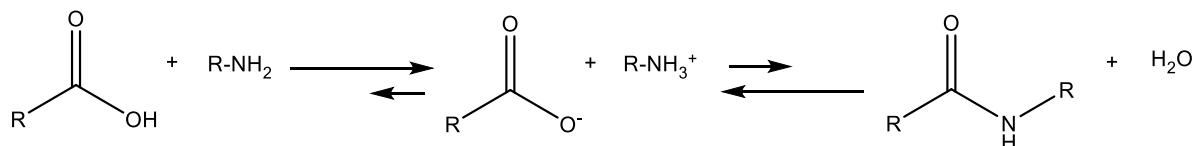
Slika 20: Odstranjevanje BOC zaščite

Spojinam smo po ciklizaciji odstranili BOC zaščito. Reakcijo smo izvajali v diklorometanu ob dodatku trifluoroocetne kisline, s katero smo izvedli kislo hidrolizo spojine. Predpisan reakcijski čas smo podaljšali, saj je bilo po treh urah v reakcijski zmesi še veliko izhodne spojine. Reakcije smo zato pustili čez noč. Po končani hidrolizi smo odparili topilo, prebitno kislino pa smo odstranili s spiranjem produktov z etrom. Nastale soli trifluoroocetne kisline so bile pri normalnih pogojih v tekoči obliki (**3b**, **3c**), le spojina **3a** je bila trdna. Izkoristki vseh treh reakcij so bili izjemno visoki (91-92 %).

5.4. TVORBA AMIDOV

Amidne funkcionalne skupine so prisotne tako v naravnih (encimi, protitelesa, proteini), kot tudi sintetiziranih spojinah. Več kot 25 % zdravilnih učinkovin vsebuje amidne skupine. To pa ne preseneča zaradi njihovih ugodnih lastnosti, kot so nevtralnost, stabilnost in zmožnost delovanja kot akceptor ali donor vodikove vezi (30).

Amidna vez nastane pri reakciji med karboksilno in amino skupino, pri čemer se odcepi molekula vode. Pri reakciji se najprej tvori stabilna sol, za tvorbo amidne vezi pa je potrebna energija, ker je ravnotežje reakcije pomaknjeno v prid nastanka soli (30). Reakcija je prikazana na Sliki 21.

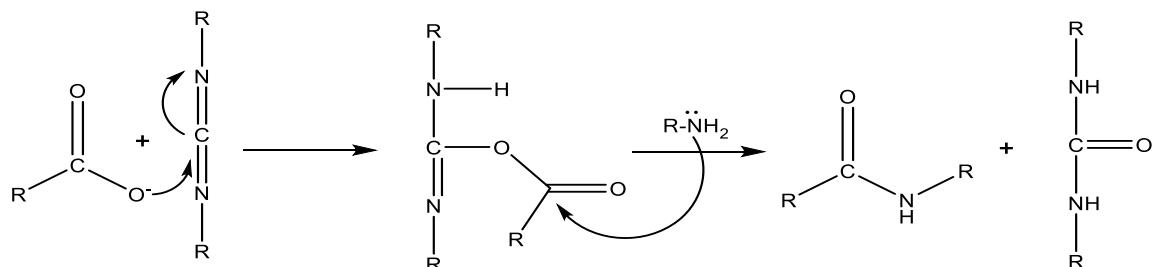


Slika 21: Nastanek amidne vezi

Reakcija bi lahko potekla pri visoki temperaturi ($160\text{-}180\text{ }^{\circ}\text{C}$), vendar to zaradi narave spojin ni mogoče. Zato je potrebna aktivacija kisline s sklopitvenimi reagenti, ki omogočajo tvorbo amidov v tako imenovanih »one pot« pogojih. To pomeni, da se kislina aktivira *in situ*, nato pa aktivna oblika (npr. ester) reagira z aminom. Možna pa je tudi uporaba bolj aktivnih kislinskih derivatov (kislinskih kloridov, anhidridov, acil azidov, aktiviranih estrov), kjer je v naslednji fazi reakcije omogočena adicija amino skupine na karbonilno skupino (30).

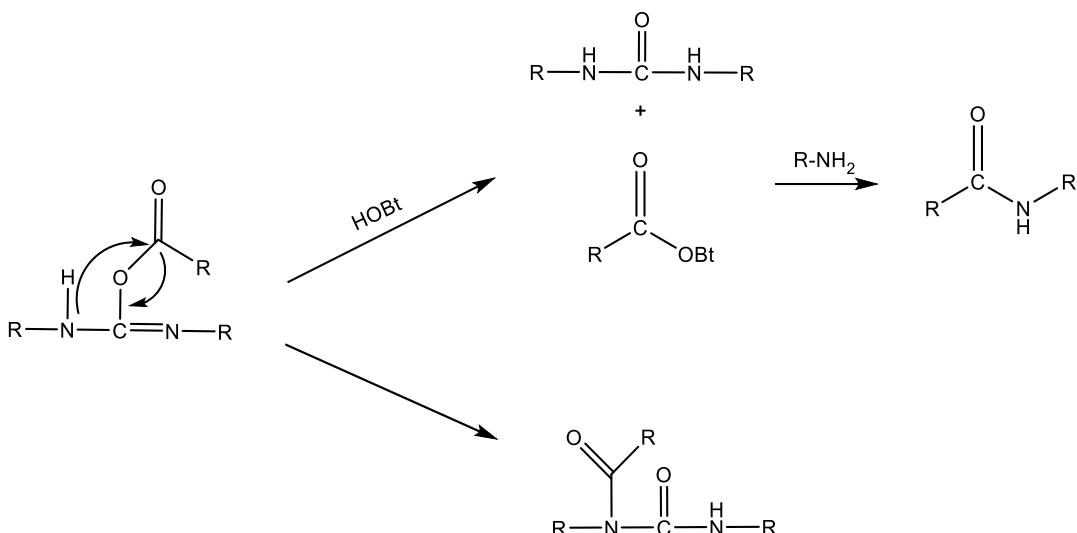
5.4.1. TVORBA AMIDOV S POMOČJO KARBODIIMIDNIH REAGENTOV

Mehanizem aktivacije kisline je enak kot zgoraj. Karbodiimid in kislina reagirata do O-acil sečnine. Nato pa sledi nukleofilena adicija amina na karbonilno skupino estra. Pri reakciji nastane amid in stranski produkt sečnina (Slika 22) (30):



Slika 22: Nastanek amida s pomočjo EDC

Problem te reakcije je nastanek stranskega produkta N-acil sečnine, ki nastane zaradi nukleofilne adicije aminske skupine na karbonilno skupino znotraj molekule. Možnost nastanka le-te, zmanjšamo s primernimi reakcijskimi pogoji (temperaturo pod $0\text{ }^{\circ}\text{C}$). Nastanku stranskega produkta se lahko izognemo tudi z dodatkom nukleofilnega reagenta hidroksibenzotriazola (HOBT). Le-ta omogoča hitrejši napad na karbonilno skupino estra, pri čemer se tvori intermediat, ki se v naslednji fazi reakcije z aminom poveže z amidno vezjo (30). Slika 23 prikazuje tvorbo amida od dodatku HOBT (zgoraj) in reakcijo brez reagenta, pri čemer lahko pride do nastanka stranskega produkta N-acil sečnine (spodaj).



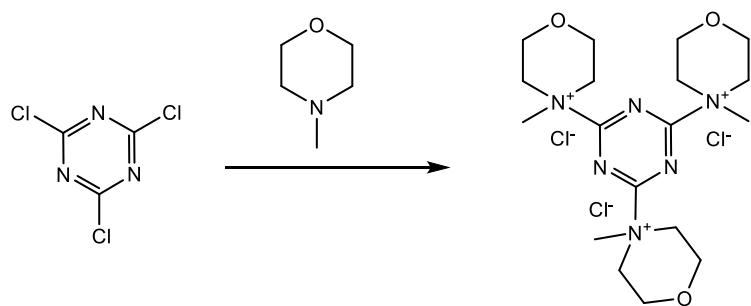
Slika 23: Nastanke amida ob dodatku HOBt (zgoraj), nastanek N-acil sečnine (spodaj)

Za aktivacijo karboksilne kislino smo uporabili reagent EDC (1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil) karbodiimid). Reakcijo smo izvajali med amini iz prejšnje stopnje sinteze (**3a**, **3b**, **3c**) in 2-indol karboksilno kislino. Nastanek stranskega produkta smo preprečili z nizko temperaturo in dodatkom hidroksibenzotriazola (HOBt), reakcijski zmesi pa smo dodali tudi šibko bazo N-metil morfolin (NMM), ki uravnava pH zmesi. Reakcije so potekale v dimetilformamidu. Produkt (spojine **4a**, **4b**, **4c**) smo izolirali s pomočjo ekstrakcije. Najboljši izkoristek smo dosegli pri sintezi spojine **4b** (55 %), najslabšega pa pri sintezi spojine **4c** (24 %).

5.4.2. TVORBA AMIDOV S POMOČJO TCT

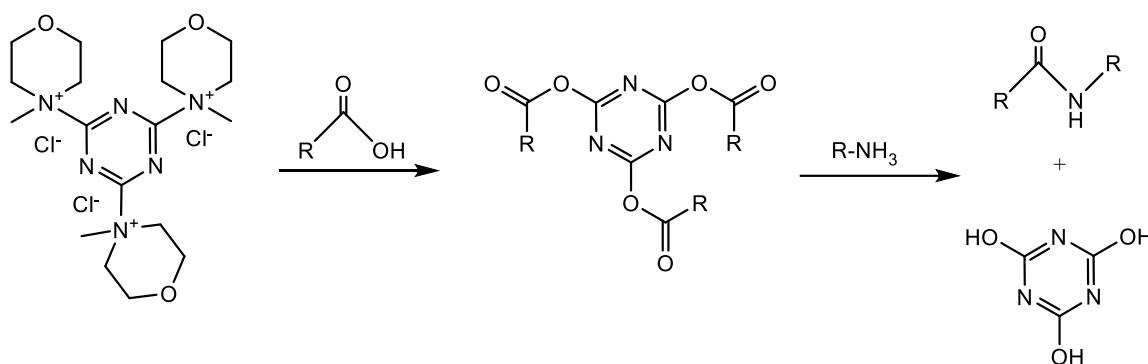
Za nastanek amidov lahko uporabimo tudi sklopitveni reagent 2,4,6-trikloro-1,3,5-triazin (TCT). To je komercialno dostopen in cenovno ugoden reagent, ki se zaradi reaktivnih kloridnih atomov, ki reagirajo z nukleofilnimi molekulami, uporablja za sintezo mnogih farmakološko aktivnih snovi (31). Prednost te metode je uporaba majhne količine reagenta, ki je potrebna za potek reakcije (za 1 mol kislino je potrebno le 0,33 mol TCT), kar pa zmanjša tudi možnost nastanka stranskih produktov (32).

Reakcija med karboksilno kislino in aminom s pomočjo reagenta TCT običajno poteka skupaj z N-metilmorfolinom (NMM), ki omogoči aktivacijo TCT, pri kateri se tvori kvartarna amonijeva sol (Slika 24) (33):



Slika 24: Aktivacija TCT

Aktiviran TCT aktivira kislino do estra, ki se nato z amidno vezjo poveže z aminom (Slika 25) (33):



Slika 25: Tvorba amida s pomočjo TCT

V magistrskem delu smo za sintezo spojine **8b** uporabili reagent TCT. Reakcijo smo izvajali v diklorometanu, v katerem smo raztopili TCT ter dodali NMM. Iz reakcijske zmesi se je začela obarjati nastala kvartarna sol. Po dodatku 4,5-dibromopirol-2-karboksilne kisline smo pustili reakcijo na ledeni kopeli za 1 uro, da je nastal aktiviran ester, zaradi česar se je reakcijska zmes ponovno zbistrlila. Sledil je dodatek amina (spojine **3b**), reakcijo pa smo nato pustili pri sobni temperaturi 72 ur. Na TLC plošči je bila še vedno vidna izhodna spojina, neaktivna 4,5-dibromopirol-2-karboksilna kislina, vendar je bila lisa zelo šibka, zato smo se po 72 urah odločili za izolacijo. Nastali amidni produkt smo izolirali s pomočjo ekstrakcije. Izkoristek reakcije je bil 55 %, kar je podobno kot pri reakcijah z uporabo EDC reagenta. Izkoristek reakcije bi lahko nekoliko povišali, če bi reakcijo podaljšali in dodali več reagenta TCT, ki bi aktiviral še preostalo kislino. Točen čas reakcije bi določili s pomočjo tankoplastne kromatografije.

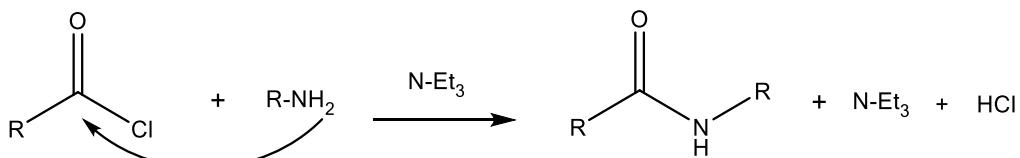
Poleg EDC in TCT reagenta smo za tvorbo amidov uporabili tudi TBTU (2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminijev tetrafluoroborat), ki prav tako omogoča aktivacijo karboksilne

kisline. Ta metoda pa žal ni bila uspešna, saj produkta nismo uspeli izolirati niti s kolonsko kromatografijo. S to metodo zato nismo nadaljevali in smo se raje posluževali zgornjih dveh.

5.4.3. TVORBA AMIDOV S KISLINSKIMI KLORIDI

Kadar se tvori amidna vez med kislinskimi kloridi in amini, reakcija poteka lažje, saj so le-ti bolj reaktivni od samih kislin. Kislinski kloridi nastanejo z zamenjavo hidroksilne skupine kisline s kloridnim atomom. Za tvorbo kislinskih kloridov se običajno uporablja: tionil klorid (SOCl_2), oksalil klorid ($(\text{COCl})_2$) ter fosforjev triklorid (PCl_3), pentaklorid (PCl_5) ali oksiklorid (POCl_3). V našem eksperimentalnem delu smo uporabili že komercialno dostopne kislinske kloride (30).

Reakcija med kislinskim kloridom in aminom poteka z nukleofilno adicijo amina na karbonilno skupino kislinskega klorida, kar povzroči odcepitev kloridnega iona. Temu sledi še odcepitev vodikovega iona iz dušika (Slika 26). Iona skupaj tvorita HCl (34). Da se izognemo pretvorbi amina v nereaktivno sol klorovodikove kisline, je za reakcijo potreben dodatek baze, ki »ujame« nastalo HCl . Reakcija običajno poteka v prisotnosti nenukleofilnih terciarnih aminov, kot sta trietil amin in N-metilmorfolin (30).



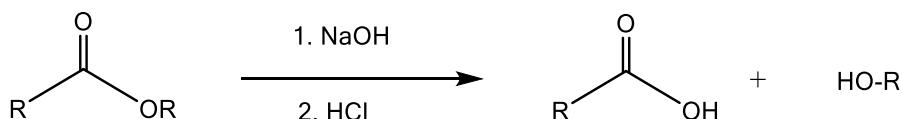
Slika 26: Tvorba amida s kislinskim kloridom

Reakcije med amini in 4-ciano benzoil kloridom oz. etil oksalil kloridom smo izvajali v diklorometanu. Pred dodatkom kislinskega klorida smo reakcijsko zmes ohladili na $0\text{ }^\circ\text{C}$ in kislinski klorid dodajali po kapljicah. Reakcijski zmesi smo dodali tudi trietil amin. Reakcijo smo pustili čez noč na sobni temperaturi ter po končani reakciji odparili topilo. Spojine **5a**, **5b** in **5c** smo očistili z dodatkom destilirane vode, iz katere so se spojine oborile, jih nato prefiltrirali in posušili. Spojine **6a**, **6b** in **6c** pa ob dodatku vode niso izpadle, zato je bila potrebna ekstrakcija z etilacetatom. Izkoristki rekcij so bili precej različni, od 37 % (**6c**) do 76 % (**6b**), v povprečju pa okrog 50 %.

5.5. HIDROLIZA ESTRA

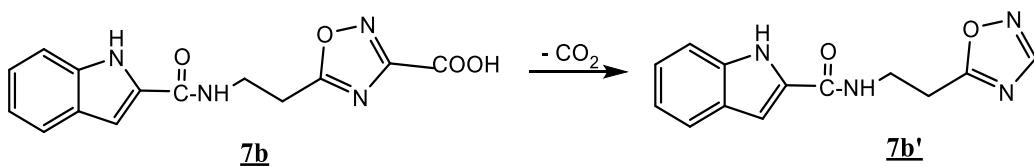
Estrski derivati so prisotni v mnogih zdravilnih učinkovinah. Pri sintezi učinkovin se estre večinoma uporablja za zaščito karboksilnih kislin in alkoholov, ki se jih v nadalnjih stopnjah sinteze hidrolizira. Hidroliza estrov lahko poteka v kislih ali bazičnih pogojih. V magistrskem delu smo se odločili za alkalno hidrolizo, ki ji pravimo tudi saponifikacija. Proses običajno poteka v raztopini vode in ustreznega organskega topila ob prisotnosti baze (KOH, NaOH, LiOH), kot produkt pa nastane sol karboksilne kisline. Topilo in razmerje med topilom in vodo morata zagotavljati topnost tako estru, kot tudi bazi. Možna pa je tudi hidroliza v brezvodnih pogojih (35).

Pri reakciji gre za nukleofilno adicijo hidroksilne skupine baze na karbonilno skupino estra (Slika 27). Pri reakciji nastaneta sol karboksilne kisline in ustrezen alkohol. Z nakisanjem reakcijske zmesi nastane karboksilna kislina (35):



Slika 27: Hidroliza estra

Hidroliza estrov je bila zadnja stopnja sinteze v okviru magistrskega dela. Zaradi majhnih količin spojin iz prejšnjih stopenj sinteze smo se odločili, da hidroliziramo le spojino **4b**. Hidrolizo smo izvajali v 96 % etanolu z 2 M raztopino NaOH pri sobni temperaturi. Reakcija je potekla v 48 urah. Reakcijsko zmes smo nakisali s 5 M HCl, nastalo kislino (**7b**) smo nato ekstrahirali z etilacetatom in ga odparili. Glede na rezultate masne analize smo ugotovili, da je po nastanku kisline najverjetneje prišlo do spontane dekarboksilacije spojine (Slika 28). Dekarboksilacija 1,2,4-oksadiazol-3-karboksilnih kislin je omenjena tudi v literaturi, kjer so stabilnost spojin ohranili z uvedbo verige z enim, dvema ali tremi ogljikovimi atomi med oksadiazolnim obročem in karboksilno skupino (36).



Slika 28: Dekarboksilacija spojine **7b**

5.6. BIOLOŠKO TESTIRANJE

Spodnjim spojinam smo preverili njihovo biološko delovanje na podenoto B DNA-giraze. Rezultati so podani v Preglednici I v obliki rezidualne aktivnosti spojin (RA), ki je definirana kot razmerje med aktivnostjo encima ob prisotnosti spojine, ki se testira pri koncentraciji 10 oz. 100 µM in aktivnostjo samega encima.

Preglednica XX: Rezultati pridobljeni z biološkim testiranjem

Oznaka spojine	Struktura	Rezidualna aktivnost (RA)	Aktivnost
2a		RA (100 µM) = 107% RA (10 µM) = 97%	Neaktivna
2b		RA (100 µM) = 111% RA (10 µM) = 113%	Neaktivna
2c		RA (100 µM) = 117% RA (10 µM) = 106%	Neaktivna
4a		RA (100 µM) = 115% RA (10 µM) = 116%	Neaktivna
4b		RA (100 µM) = 119% RA (10 µM) = 105%	Neaktivna
4c		RA (100 µM) = 111% RA (10 µM) = 120%	Neaktivna
7b'		RA (100 µM) = 119% RA (10 µM) = 117%	Neaktivna
8b		RA (100 µM) = 98% RA (10 µM) = 109%	Neaktivna

Končnih spojin, ki imajo na 1,2,4-oksadiazolni obroč vezano karboksilno skupino, ni bilo mogoče sintetizirati zaradi spontane dekarboksilacije. Zato smo zaviralno aktivnost na DNA-girazo ovrednotili dekarboksilirani spojini (**7b'**), spojinam z 1,2,4-oksadiazolnim obročem (**2a**, **2b**, **2c**) ter spojinam iz predzadnje stopnje načrtovane sinteze (pred hidrolizo estra), ki imajo poleg oksadiazolnega obroča vezano tudi 2-indol karboksilno kislino (**4a**, **4b**, **4c**) oz. 4,5-dibromopirol-2-karboksilno kislino (**8b**). Nobena izmed testiranih spojin ni izkazovala aktivnosti na testiran encim v testiranih koncentracijah. Iz rezultatov lahko sklepamo, da substituenti, ki smo ju vezali na osnovno strukturo, ne prispevata k zaviralni aktivnosti spojin. Predvidevamo lahko, da bi bili rezultati boljši, če bi uspeli ohraniti stabilnost hidroliziranim spojinam, kar bi bilo mogoče z uvedbo distančnika med oksadiazolom in karboksilno skupino.

6. SKLEPI

V okviru magistrske naloge smo se odločili za sintezo 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolnih spojin kot potencialnih zaviralcev podenote B encima DNA-giraze. Glicin, β -alanin in 4-aminobutanojska kislina so bile izhodne spojine našega eksperimentalnega dela.

Ugotovili smo, da je BOC zaščitna skupina primerna za izvedbo sinteznega načrta priprave želenih končnih spojin. Zaščita aminske skupine z BOC skupino je dobro poznana in uveljavljena reakcija, ki nam ni delala težav. Zaščita obeh aminokislin je potekla hitro (30 min) ter z enako visokim izkoristkom (86 %).

Za sintezo 1,2,4-oksadiazolnih obročev smo uporabili najpogosteje uporabljeno reakcijo, ciklokondenzacijo amidoksimov s karboksilno kislino. Aktivacija kisline s pomočjo DCC je potekla v dveh urah, ciklizacija do 1,2,4-oksadiazolnega obroča pa v treh. Izkoristki reakcije so bili zadovoljivi (nad 50 %), saj je potrebno upoštevati, da za tvorbo heterocikla celokupno potekajo štiri reakcije, poleg tega je bilo za izolacijo produkta potrebno uporabiti kolonsko kromatografijo. Pri sintezi spojin **2a** in **2b** smo dobili primerljiv izkoristek (56 % in 58 %), nekoliko je izstopala spojina **2c** s 65 % izkoristkom. Tekom eksperimentalnega dela smo ugotovili, da je za ciklizacijo potrebno uporabiti predestiliran piridin, saj so v nasprotnem primeru izkoristki reakcije zelo nizki.

Za odstranjevanje BOC skupine smo uporabili trifluoroocetno kislino, pri čemer pa je bilo potrebno podaljšati čas reakcije iz 3 ur, kot je bilo predpisano, tako da smo reakcije pustili čez noč. Izkoristki vseh reakcij so bili primerljivi in zelo visoki (nad 90 %).

Za tvorbo amidov smo uporabili različne postopke. Njenostavnejše so bile reakcije z bolj reaktivnimi kislinskimi kloridi. Izkoristki reakcij so bili sicer različni, v povprečju okrog 50 %, najvišji pa je bil 76 % (spojava **6b**), najnižji pa 37 % (spojava **6c**).

Pri tvorbi amidov s kislinami smo imeli več težav. Uporabili smo tri različne sklopitvene reagente. Z uporabo TBTU je nastala reakcijska zmes, ki je ni bilo mogoče ločiti niti na koloni, zato smo to metodo opustili. Več sadov sta obrodili metodi, kjer smo za aktivacijo uporabili EDC oz. TCT. Izkoristki reakcij so bili okrog 50 %. Najbolj sta izstopali spojini, katerih osnova je bil β -alanin (**4b** in **8b**), obe s 55 % izkoristkom. Najslabši izkoristek pa je imela spojina **4c**.

(24 %). Pri uporabi reagenta TCT bi najverjetneje lahko izkoristek še nekoliko povišali, saj je bila na TLC plošči še vedno vidna izhodna spojina (4,5-dibromopirol-2-karboksilna kislina), vendar smo se zaradi njene majhne količine po treh dneh vseeno odločili za izolacijo.

Končnih načrtovanih spojin s prosto karboksilno skupino nam žal ni uspelo sintetizirati zaradi slabe stabilnosti spojin v alkalnih pogojih. Po hidrolizi estra je namreč prišlo do spontane dekarboksilacije, kar smo potrdili tudi s spektroskopsko analizo spojine **7b'**. Spojine bi lahko stabilizirali, da bi med obroč in karboksilno skupino uvedli dodatne metilenske skupine ali pa izvedli hidrolizo pod drugačnimi pogoji.

Predvidevamo, da je neaktivnost testiranih spojin na inhibicijo DNA-giraze povezana s prisotno estrsko skupino. Za tvorbo interakcij z vezavnim mestom encima na podenoti B bi bila namreč potrebna prosta karboksilna skupina.

7. LITERATURA

1. Gasparič A: Antibiotiki v farmaciji in medicini, Protimikrobne snovi. 2009: 11–32.
2. Guillemot D: Antibiotic use in humans and bacterial resistance. Current Opinion in Microbiology, 1999; 2: 494–498.
3. Gobec S: Boj proti bakterijski rezistenci s strukturno podprtih načrtovanjem encimskih inhibitorjev. Protimikrobne snovi, 2009: 3–10.
4. Patrick G. L: An introduction to Medicinal Chemistry, 5th edition, Oxford university press, New York, 2013; 413–467.
5. Humar M, Šmid-Korbar J, Obreza A: Farmacevtski terminološki slovar, Založba ZRC, Ljubljana, 2011: 31 in 121.
6. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005; 244–284.
7. Tavzes M: Veliki slovar tujk, Cankarjeva založba, Ljubljana, 2002: 1170.
8. Velez-Cruz R, Osheroff N: DNA Topoisomerases: Type II. Encyclopedia of Biological Chemistry, 2004; 806–811.
9. Lodish H, Berk A, Zipursky S. L, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell J: Molecular Cell Biology, 4th edition, W. H. Freeman, New York, 2000, Section 12.3, The Role of Topoisomerases in DNA Replication.
(e-knjiga, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21703/>, dostopano 04.08.2016)
10. Aung H. L, Samaranayaka C. U. K, Enright R, Beggs K. T, Monk B. C: Characterisation of the DNA gyrase from the thermophilic eubacterium *Thermus thermophilus*. Protein Expression and Purification, 2015; 107: 62–67.
11. Champoux J. J: DNA Topoisomerases: Type I, Encyclopedia of Biological Chemistry, 2004; 798–805.
12. Chang C. C, Wang Y. R, Chen S. F, Wu C. C, Chan N. L: New insights into DNA-binding by type IIA topoisomerases. Current Opinion in Structural Biology, 2013; 23: 125–133.
13. Dutta R, Inouye M: GHKL, an emergent ATPase/kinase superfamily. Trends in Biochemical Sciences, 2000; 25:24-28.
14. Oblak M, Kotnik M, Solmajer T: Discovery and Development of ATPase Inhibitors of DNA Gyrase as antibacterial agents. Current Medicinal Chemistry, 2007; 14: 2033–2047.

15. Collin F, Karkare S, Maxwell A: Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011; 92:479–497.
16. Bradbury B. J, Pucci M. J: Recent advances in bacterial topoisomerase inhibitors. *Current Opinion in Pharmacology*, 2008, 8:574–581.
17. Tomašič T, Mašič L. M: Prospects for Developing New Antibacterials Targeting Bacterial Type IIA Topoisomerases. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2014; 14: 130-151.
18. Lemke T. L, Williams D. A: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6th edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008; 1577–1583.
19. Heide L: New aminocoumarin antibiotics as gyrase inhibitors, *International Journal of Medical Microbiology*, 2014; 304: 31– 36.
20. Mayer C, Janin Y. L: Non-quinolone Inhibitors of Bacterial Type IIA Topoisomerases: A Feat of Bioisosterism. *Chemical reviews*, 2014; 114: 2313–2342.
21. http://www.inspiralis.com/files/e_coli_gyrase_plate_kit.pdf (dostopano 03.05.2016)
22. <http://www.chemspider.com/> (dostopano 04.08.2016)
23. Isidro-Llobet A, Alvarez M, Albericio F: Amino Acid-Protecting Groups. *Chemical reviews*, 2009; 109: 2455–2504.
24. http://studentski.net/gradiva/uljffa/fa1/farmacevtska-kemija.html?r=ulj_ffa_fa1_fk3_vaj_zascitne_skupine_01.pdf (dostopano 27.02.2016)
25. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_Mech.htm (dostopano 27.02.2016)
26. Kivrak A: Development of new methods for the synthesis of pyrazoles, 4-iodopyrazoles, isoxazoles and 1,2,4-oxadiazoles. Doktorska disertacija. Middle East Technical University, Ankara, 2011; 35–43.
27. Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: Farmacevtska kemija III, Vaje in seminarji. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2010; 7–9.
28. <https://books.google.si/books?id=HeIAwAAQBAJ&pg=PA32-IA14&lpg=PA32-IA14&dq=mechanism+cyclization+of+anhydride+and+amidoxime&source=bl&ots=Bd39eTNJVW&sig=A2I8Zf8hhM21hhkafJLdpYwSXwk&hl=sl&sa=X&ved=0ahUKEwjzgKKDgJnLAhWHxnIKHUBKD-0Q6AEIGjAA#v=onepage&q=mechanism%20cyclization%20of%20anhydride%20and%20amidoxime&f=false> (dostopano 24.04.2016)

29. http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_TFA_Mech.htm (dostopano 21.04.2016)
30. Montalbetti C. A. G. N, Falque V: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 2005; 61: 10827–10852.
31. Blotny G: Recent applications of 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine and its derivatives in organic synthesis. *Tetrahedron*, 62; 2006: 9507–9522.
32. Rayle H. L, Fellmeth L: Development of a Process for Triazine-Promoted Amidation of Carboxylic Acids. *Organic Process Research & Development*, 1999; 3: 172–176.
33. Masala S, Taddei M: Solid-Supported Chloro[1,3,5]triazine. A Versatile New Synthetic Auxiliary for the Synthesis of Amide Libraries. *Organic letters*, 9; 1999: 1355-1357.
34. <http://www.chemguide.co.uk/mechanisms/addelim/amines.html> (dostopano 12.03.2016)
35. Theodorou V, Skobridis K, Tzakos A. G, Ragoussis V: A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Letters*, 2007; 48: 8230–8233.
36. Jakopin Ž, Roškar R, Sollner Dolenc M: Synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles as peptidomimetic building blocks. *Tetrahedron Letters*, 48; 2007: 1465–1468.