

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ALEŠ SVETE

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA POTENCIALNIH  
ZAVIRALCEV GIRAZE Z 1,3,4-OKSADIAZOLNIM  
OGRODJEM**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF POTENTIAL 1,3,4-  
OXADIAZOLE-SCAFFOLD BASED DNA GYRASE  
INHIBITORS**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2013

Diplomsko naložbo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod vodstvom mentorja doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo ter na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

### **ZAHVALA**

Iskreno se zahvaljujem svojemu mentorju, doc. dr. Žigi Jakopinu, mag. farm., za ves trud, potrpežljivost in pomoč. Najlepša hvala tudi ostalim članom katedre za Farmacevtsko kemijo za izkazano pomoč med eksperimentalnim delom.

Hvala tudi staršem in prijateljem, ki so mi stali ob strani skozi študentska leta.

### **IZJAVA**

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja doc. dr. Žige Jakopina, mag. farm.

Ljubljana, 2013

Aleš Svetec

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Janko Kos

Članica diplomske komisije: doc. dr. Barbara Ostanek

## KAZALO VSEBINE

KAZALO VSEBINE .....	I
POVZETEK .....	IV
KLJUČNE BESEDE .....	VI
SEZNAM OKRAJŠAV .....	VI
1. UVOD .....	1
1.1. BAKTERIJSKA REZISTENCA .....	1
1.2. RAZDELITEV KEMOTERAPEVTIKOV .....	2
1.2.1. ZAVIRALCI CELIČNEGA METABOLIZMA .....	3
1.2.2. ZAVIRALCI IZGRADNJE BAKTERIJSKE CELIČNE STENE .....	3
1.2.3. UČINKOVINE, KI VPLIVAJO NA STRUKTURU PLAZEMSKE MEMBRANE .....	5
1.2.4. ZAVIRALCI SINTEZE BAKTERIJSKIH BELJAKOVIN .....	5
1.2.5. ZAVIRALCI PREVAJANJA IN PODVAJANJA BAKTERIJSKIH NUKLEINSKIH KISLIN .....	6
1.3. DNA GIRAZA .....	7
1.4. ZAVIRALCI BAKTERIJSKE GIRAZE .....	8
1.4.1. SPOJINE, KI SE VEŽEJO NA PODENOTO A DNA GIRAZE .....	8
1.4.2. SPOJINE, KI SE VEŽEJO NA PODENOTO B DNA GIRAZE .....	9
1.4.3. OSTALE SPOJINE .....	14
2. NAČRT ZA DELO .....	16
3. MATERIALI IN METODE .....	17
3.1. MATERIALI .....	17
3.2. METODE .....	17
3.2.1. Kromatografske metode .....	17
3.2.2. Spektroskopske metode .....	18
3.2.3. Določanje tališča .....	19
3.2.4. Biološko testiranje spojin .....	19
4. EKSPERIMENTALNI DEL .....	20
4.1. Reakcijski shemi .....	20
4.2. SINTEZA 3-(ETOJSIKARBONIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2- IL)BENZENAMINIJEVEGA KLORIDA (6) .....	23

4.2.1. SINTEZA 3-((TERC-BUTOXIKARBONIL)AMINO)BENZOJSKE KISLINE (1) .....	23
4.2.2. SINTEZA ETIL 3-((TERC-BUTOXIKARBONIL)AMINO)BENZOATA (2) .....	25
4.2.3. SINTEZA TERC-BUTIL (3-(HIDRAZINKARBONIL)FENIL)KARBAMATA (3) .....	27
4.2.4. SINTEZA ETIL 2-(2-(3-((TERC-BUTOXIKARBONIL)AMINO)BENZOIL)HIDRAZINIL)-2-OKSOACETATA (4) .....	28
4.2.5. SINTEZA ETIL 5-(3-((TERC-BUTOXIKARBONIL)AMINO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILATA (5) .....	29
4.2.6. SINTEZA 3-(5-(ETOXIKARBONIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-IL)BENZENAMINIJEVEGA KLORIDA (6) .....	31
4.3. SINTEZA 4-(5-(ETOXIKARBONIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-IL)BENZENAMINIJEVEGA TRIFLUOROACETATA (11) .....	33
4.3.1. SINTEZA ETIL 4-((TERC-BUTOXIKARBONIL)AMINO)BENZOATA (7) .....	33
4.3.2. SINTEZA TERC-BUTIL (4-(HIDRAZINKARBONIL)FENIL)KARBAMATA (8) .....	35
4.3.3. SINTEZA ETIL 2-(2-(4-((TERC-BUTOXIKARBONIL)AMINO)BENZOIL)HIDRAZINIL)-2-OKSOACETATA (9) .....	36
4.3.4. SINTEZA ETIL 5-(4-((TERC-BUTOXIKARBONIL)AMINO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILATA (10) .....	37
4.3.5. SINTEZA 4-(5-(ETOXIKARBONIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-IL)BENZENAMINIJEVEGA TRIFLUOROACETATA (11) .....	39
4.4. SINTEZA 5-(3-(1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (13) .....	40
4.4.1. SINTEZA ETIL 5-(3-(1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILATA (12) .....	40
4.4.2. SINTEZA 5-(3-(1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (13) .....	42

4.5. SINTEZA ETIL 5-(3-(1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILATA (14) .....	44
4.6. SINTEZA 5-(3-(5-FLUORO-1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (16) .....	45
4.6.1. SINTEZA ETIL 5-(3-(5-FLUORO-1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILATA (15).....	45
4.6.2. SINTEZA 5-(3-(5-FLUORO-1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (16) .....	47
4.7. SINTEZA 5-(3-(4,5-DIBROMO-1H-PIROL -2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (18) .....	49
4.7.1. SINTEZA ETIL 5-(3-(4,5-DIBROMO-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILATA (17).....	49
4.7.2. SINTEZA 5-(3-(4,5-DIBROMO-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (18) .....	51
4.8. SINTEZA 5-(3-(1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSAMIDA (19) .....	53
4.9. SINTEZA ETIL 5-(4-(1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILATA (20) .....	55
4.10. SINTEZA ETIL 5-(4-(4,5-DIBROMO-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILATA (21).....	56
5. REZULTATI IN RAZPRAVA .....	57
5.1. SINTEZNI POSTOPKI .....	57
5.1.1. SINTEZA 1,3,4-OKSADIAZOLNEGA OBROČA.....	57
5.1.2. SINTEZA AMIDOV .....	59
5.1.3. ALKALNA HIDROLIZA ESTROV.....	63
5.2. TESTIRANJE SPOJIN NA DNA GIRAZI .....	64
6. SKLEPI.....	66
7. LITERATURA .....	67

## POVZETEK

Protimikrobní kemoterapeutiki so zelo pomembna skupina učinkovin, saj nam zagotavlja obrambo pred mikroorganizmi. V zadnjem času se pospešeno išče nove učinkovine ter nova prijemališča. Med njih sodi tudi bakterijski encim DNA giraza, ki je postala ena izmed najprivlačnejših tarč kemoterapevtikov. Omenjen encim je ključen za uspešno razmnoževanje mikroorganizmov, z njegovo blokado pa se ustavi proces prepisovanja in prevajanja DNA molekul, kar vodi v celično smrt.

Pri načrtovanju novih učinkovin v diplomskem delu smo izhajali iz že znane spojine z dokazanim zaviralnim delovanjem na DNA girazo. Nekatere strukturne fragmente smo zamenjali s podobnimi in sintetizirali nove potencialne zaviralce DNA giraze. Odločili smo se za uporabo pirolamidnega in 1,3,4-oksadiazolnega ogrodja, ki je dokaj pogosta privilegirana struktura in se pojavlja v mnogih učinkovinah. Ugotovili smo, da so spojine s karboksilno skupino na mestu 2 1,3,4-oksadiazolnega obroča nestabilne.

Spojine smo tudi biološko ovrednotili s testiranjem rezidualne aktivnosti DNA giraze po inkubaciji z zavircem. Spojina **18** s 4,5-dibromopirolnim obročem kljub pomanjkanju karboksilnega fragmenta premore šibko zaviralno aktivnost ( $IC_{50} \sim 100 \mu\text{M}$ ). Poleg omenjenega obroča bi za nadaljnje sinteze zaviralcev DNA giraze priporočili tudi uporabo 3,4-dikloro-5-metilpirolnega obroča, ki je eden ključnih delov naše spojine vodnice.

Sklepali smo, da je za protimikrobní aktivnost spojin potreben karboksilni fragment, ki lahko z aktivnim mestom encima tvori ionske interakcije.

## ABSTRACT

Antibiotics are a very important group of drugs because they provide us with defense against microorganisms. The search for new drugs and binding sites has greatly expanded recently and one of the most attractive targets is the bacterial enzyme DNA gyrase. The enzyme is crucial for the reproduction of microorganisms as DNA transcription and replication cease with enzyme blockage, thus leading to cell death.

The design of new compounds in our thesis was based on a known compound with proven inhibitory activity against DNA gyrase. We have replaced some of the structural fragments with similar ones and synthesized new potential DNA gyrase inhibitors. We decided to use the pyrrolamide and 1,3,4-oxadiazole moieties, the latter being a privileged structure in many active substances. Compounds with carboxylic acids at position 2 of the 1,3,4-oxadiazole ring were found to be unstable.

New compounds were also biologically characterized by measuring DNA gyrase residual activity following the incubation of enzyme with the inhibitor. Compound **18** with a 4,5-dibromopyrrole ring has shown weak activity ( $IC_{50} \sim 100 \mu M$ ) in spite of lacking the carboxylic fragment. For future synthesis of DNA gyrase inhibitors we would recommend the use of this ring as well as the 3,4-dichloro-5-methylpyrrole ring, which is one of key structural fragments of our lead compound.

Our conclusion was that the carboxylic fragment, which binds to the enzyme via ionic interactions, is necessary for antimicrobial action.

## KLJUČNE BESEDE

Kemoterapevtiki, giraza, 1,3,4-oksadiazol, zaviralci, rezistanca.

## SEZNAM OKRAJŠAV

**ATP:** angl. Adenosine triphosphate; adenozin-trifosfat

**BOC:** angl. N-*tert*-ButoxyCarbonyl; *terc*-butiloksikarbonil

**CDI:** angl. 1,1'-Carbonyldiimidazole; karbonildiimidazol

**d:** dublet

**DMF:** Dimethylformamide; dimetilformamid

**DMAP:** angl. 4-Dimethylaminopyridine; 4-dimetilaminopiridin

**DMSO-d<sub>6</sub>:** devteriran dimetilsulfoksid

**DNA:** angl. Deoxyribonucleic acid; deoksiribonukleinska kislina

**EDC:** angl. 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide; 1-etyl-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid

**g:** angl. gas; plin

**HR-MS:** angl. High resolution mass spectrometry; masna spektrometrija visoke ločljivosti

**IR:** angl. Infrared spectroscopy; infrardeča spektroskopija

**k:** kvartet

**m:** multiplet

**MF:** mobilna faza

**MNEC:** angl. maximal non-effective concentration; maksimalna neučinkovita koncentracija

**Mr:** molekulska masa

**MRRSA:** methicillin resistant and quinolone resistant *S. aureus*; na meticilin in kinolone odporen *S. aureus*

**MS:** masna spektroskopija

**NMM:** angl. N-Methylmorpholine; *N*-metilmorfolin

**NMR:** angl. Nuclear magnetic resonance; jedrska magnetna resonanca

**RA:** rezidualna aktivnost

**Rf:** retencijski faktor

**RNA:** angl. Ribonucleic acid; ribonukleinska kislina

**rs:** razširjen singlet

**s:** singlet

**T:** temperatura

**t:** triplet

**TBAF:** angl. Tetra-n-butylammonium fluoride; tetra-*N*-butilamonijev fluorid

**TBTU:** angl. O-(Benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetramethyluronium tetrafluoroborate; 2-(1*H*-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametilaminijev tetrafluoroborat

**THF:** tetrahidrofuran

**TLC:** angl. Thin layer chromatography; tankoplastna kromatografija

**TMS:** angl. Tetramethylsilane; tetrametilsilan

## 1. UVOD

Bakterijske okužbe že od nekdaj predstavljajo problem za človeštvo. Skozi zgodovino smo odkrili različne naravne protibakterijske učinkovine, imenovane antibiotiki, v nedavni preteklosti pa se vedno bolj poslužujemo sinteznih spojin, tako imenovanih kemoterapeutikov. Nekateri mikroorganizmi so sposobni razviti obrambne mehanizme proti kemoterapeutikom, kar vodi do pojava, ki mu rečemo bakterijska rezistenca. S preudarno in ne pretirano uporabo protimikrobnih zdravil lahko ta pojav vsaj malo omejimo. Pojav rezistence je manj verjeten pri uporabi različnih zdravil ter zdravil, ki delujejo na več različnih tarč hkrati. Razvoj novih kemoterapeutikov je zelo pomemben, saj tako dobimo učinkovitejše in tudi varnejše spojine za boj proti mikroorganizmom. Prav tako je zelo pomembno odkrivanje novih tarč za protimikrobine učinkovine, ki nam bodo pomagale v neskončnem boju z mikroorganizmi.

### 1.1. BAKTERIJSKA REZISTENCA

V zadnjih letih je pojavnost na več različnih zdravil odpornih mikroorganizmov vedno pogosteješa. S tem se tudi veča potreba po novih, učinkovitih kemoterapeutikih, po možnosti z mehanizmom delovanja, na katerega mikroorganizmi še niso rezistentni (1, 2). Bolj kot je določeno zdravilo uporabljano, večja je verjetnost za pojav rezistence. Največje tveganje je prisotno v bolnišnicah, kjer je uporaba kemoterapeutikov največja. Povečana raba kemoterapeutikov vodi v večjo pojavnost rezistence, medtem ko znižana raba lahko pomeni upad rezistence pri nekaterih mikroorganizmih, kar je še posebej vidno pri *Enterobacteriae spp.* Najpogosteji vzroki za pojav rezistence so napačna uporaba kemoterapeutikov, tako s strani zdravnikov kot bolnikov, ter nižja kvaliteta zdravil v državah v razvoju. Največkrat zdravniki zdravila zmotno predpišejo pri virusnih obolenjih dihal, kjer bi se tudi najlaže zmanjšalo nepotrebno rabo kemoterapeutikov. Za omejevanje rezistence so potrebni ukrepi kot so učinkovito in premišljeno predpisovanje kemoterapeutikov, izobraževanje zdravnikov, temeljitejše sodelovanje zdravnikov s farmacevti ter drugimi strokovnjaki, uporaba naprednih računalniških sistemov ter izvajanje hitrih diagnostičnih testov v kombinaciji s trenutnimi kliničnimi smernicami. Dodatne možnosti so v uporabi kombiniranih terapij, odločanju o trajanju zdravljenja s kemoterapeutiki ter o odmerjanju, na koncu pa tudi v samem sodelovanju bolnikov (3).

Mikroorganizmi lahko razvijejo rezistenco na več različnih načinov, pogoj za to pa je ustrezena genetska sprememba v bakterijski DNA. Do spremembe lahko pride s spontano mutacijo, rekombinacijo ali pa s prenosom genetskega materiala med dvema mikroorganizmoma. Mutacije so naključne spremembe v genskem zapisu. Zelo pomembno je, da bolniki do konca zaužijejo predpisane učinkovine, ker se potem telo lažje ubrani od preostanka patogenov, s tem pa se zmanjša možnost nastanka rezistence (4). Veliko mikroorganizmov ima sposobnost prenašanja genetskega materiala, glavna načina sta transdukcija in konjugacija. Pri prvem načinu se plazmidi prenesejo na drug organizem preko bakterijskih virusov, imenovanih bakteriofagi. V kolikor pridobljeni plazmid vsebuje gen za rezistenco, tudi ta celica postane odporna. Pri konjugaciji si mikroorganizmi neposredno izmenjajo genetski material. Dve celici se povežeta s posebnim mostičkom, preko katerega si lahko delita gene. Tovrstni način prenosa je značilen predvsem za Gram-negativne paličaste bakterije (4, 5, 6).

V novejših študijah so pokazali, da lahko tudi ne-letalne koncentracije kemoterapevtikov v naravnem okolju ali pa v telesu med zdravljenjem povzročajo bakterijsko rezistenco. Prenizka koncentracija kemoterapevtika v bakterijski celici lahko vodi v povišano vsebnost radikalov v celicah, do pojava spremenjenih DNA polimeraz, do neuravnotežene presnove nukleotidov, lahko pa vpliva tudi direktno na DNA. Vsi ti pojavi pa lahko posredno vplivajo na morfologijo, virulenco in mutagenost bakterij ter pojav rezistence (7, 8). Največkrat se mutacija DNA pri mikroorganizmih izraža kot spremenjena tarča kemoterapevtika, spremembe v prepustnosti celične stene, proizvajanje beta-laktamaz ali pa pojav "črpalk", ki aktivno odstranjujejo molekule kemoterapevtika iz bakterijske celice (8).

## 1.2. RAZDELITEV KEMOTERAPEVTIKOV

Kemoterapevtiki se v osnovi delijo na učinkovine, ki delujejo proti mikroorganizmom ter na proti tumorske učinkovine. V diplomskem delu se bomo posvetili protibakterijskim kemoterapevtikom, ki se delijo na bakteriostatike ter baktericide. Prvi omejijo oziroma prekinejo razrast mikroorganizmov, drugi pa jih uničijo. Trenutno poznamo 5 večjih skupin protimikrobnih učinkovin:

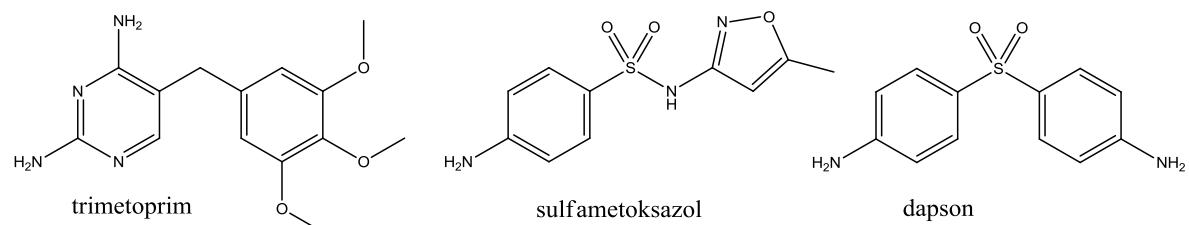
- zaviralci celičnega metabolizma
- zaviralci izgradnje bakterijske celične stene
- učinkovine, ki vplivajo na strukturo plazemske membrane

- zaviralci sinteze bakterijskih beljakovin
  - zaviralci prevajanja in podvajanja bakterijskih nukleinskih kislin (4)

#### 1.2.1. ZAVIRALCI CELIČNEGA METABOLIZMA

Zaviralci celičnega metabolizma oziroma antimetaboliti so skupina protimikrobnih učinkovin, ki zavirajo metabolizem mikroorganizma, a ne posegajo v metabolizem gostitelja. Delujejo kot kompetitivni zaviralci bakterijskih encimov, posledica pa je blokirana sinteza nujno potrebne spojine za delitev in preživetje mikroorganizma. Glavni predstavniki zaviralcev celičnega metabolizma so sulfonamidi, ki zavirajo encim dihidropteroat sintetazo in s tem onemogočajo biosintezo dihidropteroata, posledično pa tudi nujno potrebnega tetrahidrofolata. Podoben mehanizem delovanja imajo tudi sulfoni, njihov glavni predstavnik je dapson (Slika 1).

Pomemben predstavnik zaviralcev metabolizma je tudi trimetoprim, ki selektivno zavira encim dihidrofolat reduktazo, s tem pa prepreči pretvorbo dihidrofolata v tetrahidrofolat. Največkrat se uporablja v kombinaciji s sulfonamidom sulfametoksazolom, saj delujejo sinergistično. Vsi zaviralci celičnega metabolizma so bakteriostatične učinkovine (4, 9).



**Slika 1:** tipični predstavniki zaviralcev celičnega metabolizma: trimetoprim, sulfametoksazol in dapson

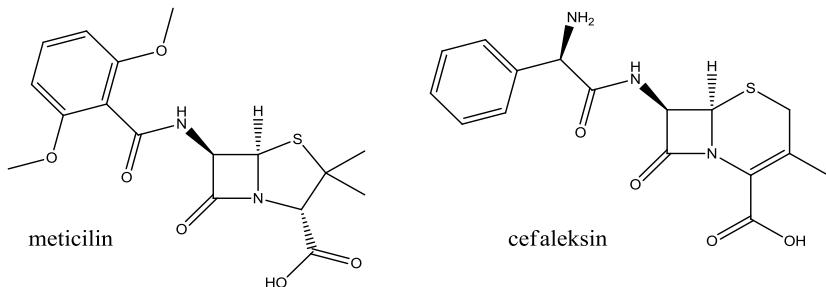
#### **1.2.2. ZAVIRALCI IZGRADNJE BAKTERIJSKE CELIČNE STENE**

Drugo skupino protimikrobnih učinkovin imenujemo tudi beta-laktamski antibiotiki. So baktericidi, delujejo pa tako, da mikroorganizmu preprečijo izgradnjo celične stene. Celična stena daje bakteriji trdno ogrodje in preprečuje nabrekanje zaradi vdora vode. Sesalske celice celične stene nimajo, zato je to idealna tarča za kemoterapevtike.

Penicilini so bili prva odkrita skupina zaviralcev izgradnje bakterijske celične stene. Delujejo tako, da se kovalentno vežejo na encim transpeptidazo, ki je odgovoren za končno prečno povezovanje peptidnih verig celične stene. Celična stena tako ostane krhka, bakterijska celica pa nabrekne zaradi vdora vode. Primer penicilinskega antibiotika je meticilin (Slika 2) (10).

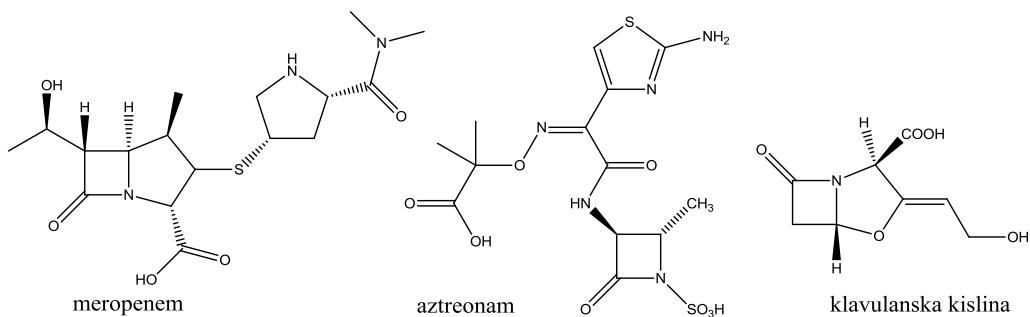
Cefalosporini so druga velika družina beta-laktamskih antibiotikov z enakim mehanizmom delovanja kot penicilini. Glavna prednost pred njimi je večja odpornost proti beta-

laktamazam, imajo pa tudi bolj širok spekter delovanja. Penicilini so v glavnem učinkoviti proti Gram-pozitivnim, cefalosporini pa kažejo večjo učinkovitost tudi proti Gram-negativnim mikroorganizmom. Za zdaj obstajajo 4 generacije cefalosporinov, v grobem pa so razdeljeni po datumu odkritja ter širini spektra delovanja. Primer cefalosporinskega antibiotika je cefaleksin (Slika 2) (11).



Slika 2: tipična predstavnika penicilinov in cefalosporinov: meticillin in cefaleksin

Karbapenemi in monobaktami so prav tako beta-laktamski antibiotiki s spremenjeno strukturo v primerjavi s penicilini in cefalosporini. Prvi imajo najširši spekter delovanja med beta-laktamskimi antibiotiki ter so redko podvrženi rezistenci, so pa kemično in metabolično manj obstojni ter se slabše absorbirajo iz prebavnega trakta. Poleg klasičnega mehanizma delovanja beta-laktamskih antibiotikov, delujejo tudi kot inhibitorji beta-laktamaz. Primer karbapenema je meropenem (Slika 3). Za monobaktame je presenetljivo, da imajo protimikrobnno učinkovitost zaradi drugačne strukture. Zaradi drugačnega spektra delovanja od ostalih beta-laktamskih antibiotikov so sklepali, da imajo monobaktami drugačen mehanizem delovanja. Možno je, da preprečujejo izgradnjo bakterijske celične stene preko zaviranja drugega encima, ki sodeluje v izgradnji. Primer monobaktama je aztreonam (Slika 3) (4, 12).



Slika 3: predstavniki ostalih zaviralcev izgradnje bakterijske celične stene: meropenem, aztreonam in klavulanska kislina

Nekateri glikopeptidi, najbolj znana sta vankomicin in bacitracin prav tako zavirajo izgradnjo bakterijske celične stene. Vankomicin je dolga leta veljal za glavno rezervno

učinkovino za proti meticilinu odpornem *Staphylococcus aureus* (MRSA). V zadnjem času so opazili rezistenco tudi na ta kemoterapeutik, zato ga počasi zamenjujejo ostale novejše učinkovine (4, 13).

V kombinaciji z beta-laktamskimi antibiotiki se velikokrat uporablja tudi inhibitorje beta-laktamaz. Ti delujejo kot ireverzibilni inhibitorji omenjenega encima in s tem zavirajo deaktivacijo antibiotika. Primera sta tazobaktam in klavulanska kislina (Slika 3) (12).

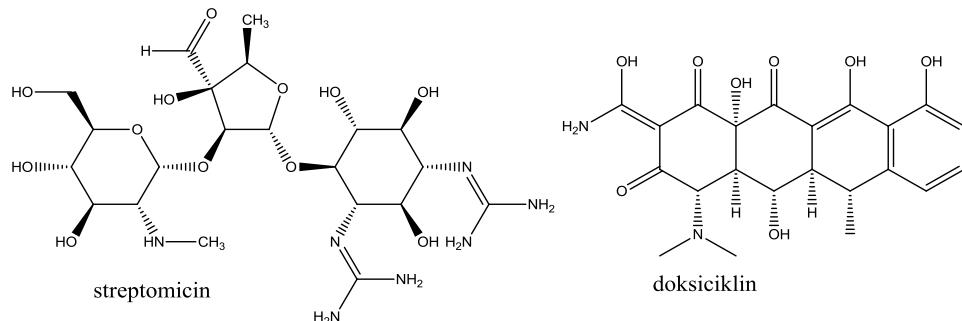
### 1.2.3. UČINKOVINE, KI VPLIVAJO NA STRUKTURU PLAZEMSKE MEMBRANE

Kemoterapeutiki lahko delujejo protimikrobnno tudi tako, da spremenijo strukturo bakterijske plazemske membrane, kar vodi v celično smrt. Polimiksin B deluje kot površinsko aktivna snov, saj povzroča nenadzorovano gibanje manjših molekul skozi membrano. Ciklični lipopeptidi so novejše spojine, ki vplivajo na več različnih funkcij plazemske membrane (4, 14).

### 1.2.4. ZAVIRALCI SINTEZE BAKTERIJSKIH BELJAKOVIN

Predstavniki te skupine kemoterapeutikov se selektivno vežejo na bakterijske ribosome in jih s tem preprečijo sintezo beljakovin, ki so nujno potrebne za preživetje mikroorganizma. Selektivna toksičnost teh spojin temelji na različni stopnji difuzije skozi celične bariere pri prokariontih in evkariontih ter na različni strukturi bakterijskih in sesalskih ribosomov. Slednji so večji (80S), sestavljeni iz večje 60S ter manjše 40S podenote, medtem ko bakterijske ribosome (70S) sestavljata večja 50S ter manjša 30S podenota (4).

Streptomycin (Slika 4) je primer aminoglikozidnega antibiotika, ki se veže na 30S podenoto ribosoma in mu prepreči nadaljnje branje mRNA in posledično sintezo beljakovin kar vodi v celično smrt. Aminoglikozidi so učinkoviti predvsem proti Gram-negativnim bacilom ter Gram-pozitivnim kokom (15).

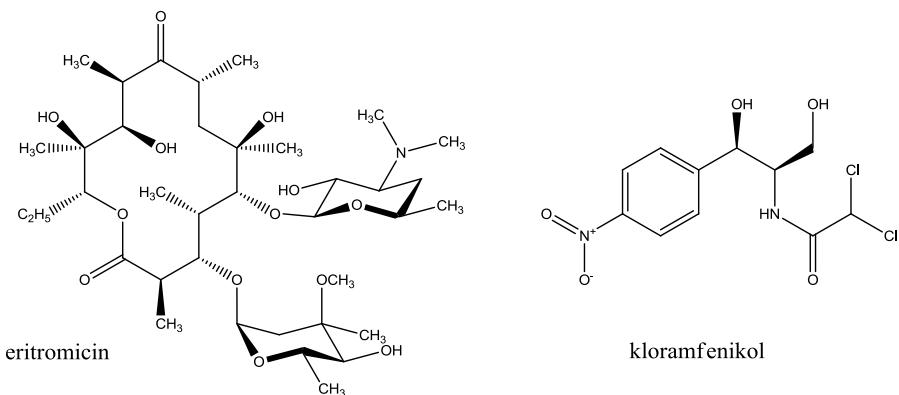


Slika 4: tipična predstavnika zaviralcev sinteze bakterijskih beljakovin: streptomycin in doksiciklin

## Aleš Svete: *Načrtovanje in sinteza potencialnih zaviralcev giraze z 1,3,4-oksadiazolnim ogrodjem*

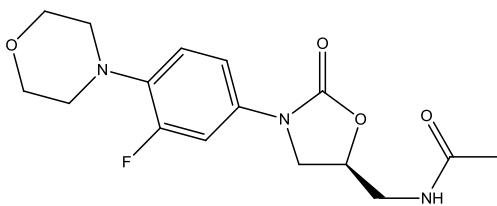
Tetraciklini so širokospektralni bakteriostatiki, ki se prav tako kot aminoglikozidi vežejo na 30S podenoto ribosoma. S tem preprečijo vezavo aminoacil-tRNA na ribosom, kar vodi v prekinitev daljšanja beljakovinske verige. Primer je doksiciklin (Slika 4) (16).

Makrolidi, linkozamidi ter streptogramini so strukturno različni kemoterapeutiki z zelo podobnim mehanizmom delovanja. Vsi se vežejo na 50S ribosomsko podenoto, s tem pa sintetiziranim beljakovinam preprečujejo izhod iz ribosoma. Primer makrolidnega kemoterapeutika je eritromicin (Slika 5). Kloramfenikol (Slika 5) je še en primer učinkovine, ki se prav tako veže na 50S podenoto. Vezava na ribosom le-temu prepreči premikanje po mRNA in s tem ustavi beljakovinsko sintezo (4, 17).



Slika 5: tipična predstavnika zaviralcev sinteze bakterijskih beljakovin: eritromicin in kloramfenikol

Oksazolidinoni so novejši sintezni kemoterapeutiki, za katere je značilno, da ustavijo beljakovinsko sintezo na bolj zgodnji stopnji. Vežejo se na mesto P 50S ribosomske podenote in ji preprečijo spajanje s 30S podenoto, tako da 70S ribosom sploh ne nastane, s tem pa je tudi blokirana beljakovinska sinteza. Glavni predstavnik je linezolid (prikazan na Sliki 6), širokospektralen kemoterapeutik, učinkovit proti večini Gram-pozitivnih mikroorganizmov (18).

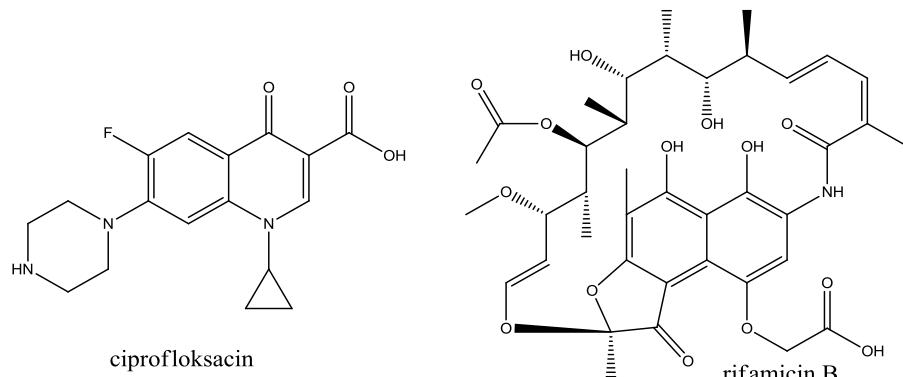


Slika 6: linezolid

### 1.2.5. ZAVRALCI PREVAJANJA IN PODVAJANJA BAKTERIJSKIH NUKLEINSKIH KISLIN

Najpomembnejša skupina učinkovin, ki vplivajo na sintezo nukleinskih kislin so kinoloni. Z uvedbo fluorovega atoma na kinolonski skelet so razvili učinkovitejšo podskupino,

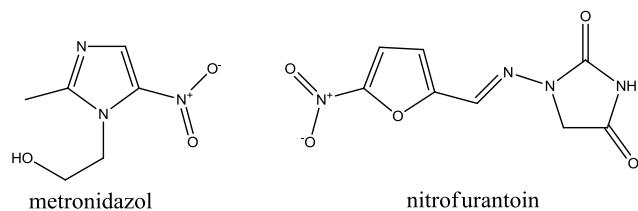
imenovano fluorokinoloni. Vežejo se na kompleks med encimom topoizomerazo tipa II in DNA in ga stabilizirajo, s tem pa preprečijo podvajanje in prevajanje bakterijske DNA. Primer fluorokinolonskega kemoterapevtika je ciprofloksacin (Slika 7) (19).



Slika 7: tipična predstavnika kinolonov in rifamicinov: ciprofloxacin in rifamicin B

Rifamicini so polsintezni kemoterapevtiki, uporabni predvsem za zdravljenje tuberkuloze. Vežejo se na od DNA odvisno RNA polimerazo in preprečijo začetek sinteze RNA. Selektivna toksičnost je osnovana na vezavi na aminokislinsko zaporedje, ki je prisotno le v bakterijskem encimu, v evkariontskih RNA polimerazah pa ne. Primer je rifamicin B, prikazan na Sliki 7 (20).

Metronidazol in nitrofurantoin (Slika 8) sta učinkovini z nitro skupino, ki se po vstopu v bakterijsko celico reducira, ob tem pa se tvorijo radikali, ki poškodujejo DNA (4).



Slika 8: primera ostalih učinkovin, ki vplivajo na bakterijske nukleinske kisline: metronidazol in nitrofurantoin

Tekom diplomskega dela se bomo posvetili zavircem DNA giraze.

### 1.3. DNA GIRAZA

Encim DNA giraza, ki je bil odkrit leta 1976, spada v družino topoizomeraz, po nadaljnji delitvi pa sodi med topoizomeraze tipa II. Glavna naloga teh encimov je izomerizacija molekul DNA med različnimi topološkimi oblikami. Giraza ima edinstveno sposobnost uvajanja negativnih zavojev v molekulo DNA, kar je nujen proces za uspešno podvajanje DNA verig (21). Strukturno gledano je molekula heterotetramer, sestavljen iz dveh podenot, A in B. Vsaka podenota pa je sestavljena še iz dveh podenot. Podenota A vsebuje

vezavno mesto za DNA, potem ko giraza prekine verigo. Podenota B je odgovorna za vezavo molekul ATP in njihovo hidrolizo, preko katere giraza dobi energijo, potrebno za uvajanje negativnih zavojev (22). Pri podvajanju DNA molekule, se le-ta razvija, pri tem pa se veča napetost v nerazvitem delu. Negativno superzvijanje DNA, ki ga izvaja giraza, znižuje napetost verige med podvajanjem (23). Giraza se veže na oba trakova krožne dvovijačne DNA ter prekine fosfodiesterske vezi ene dvovijačnice. Encim nato ob pomoči hidrolize ATP potegne neprekinjeno dvovijačnico skozi začasno prekinitev, le-to pa potem zakrpa s ponovno vzpostavljivo fosfodiesterskih vezi (24). Topoizomeraza IV, ki je DNA girazi homologen encim, prav tako sodi med topoizomeraze tipa II a z dvema glavnima razlikama: (i) ne more uvajati negativnih superzavojev v DNA (ii) njena zmožnost sproščanja zavojev DNA pa je veliko večja kot pri DNA girazi (25). Topoizomeraze tipa II pri evkariontih so dimeri in prav tako ne morejo uvajati negativnih superzavojev v DNA. Bakterijska DNA giraza je edinstven encim, zato predstavlja idealno tarčo za kemoterapevtike (21).

## 1.4. ZAVIRALCI BAKTERIJSKE GIRAZE

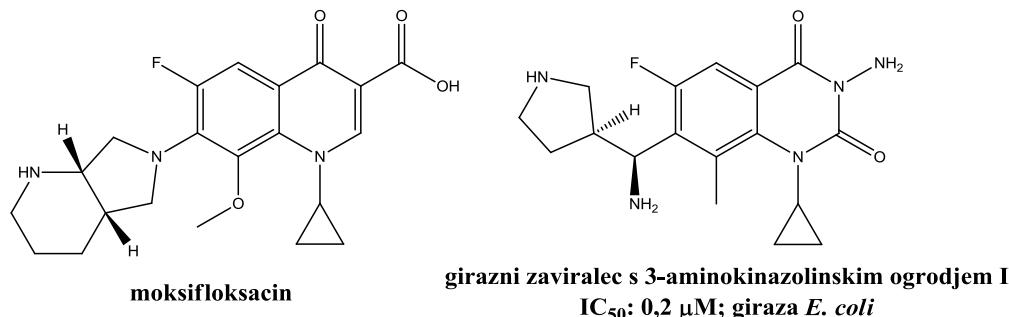
Ena od skupin protimikrobnih učinkovin so zaviralci bakterijske DNA giraze. DNA giraza je ključen encim v procesu razmnoževanja bakterij (26), saj je udeležen v procesu prevajanja kot tudi podvajanja DNA (19). Zaradi tega je DNA giraza postala ena najpomembnejših tarč novih kemoterapevtikov v zadnjih letih (11).

Trenutno poznamo dva glavna mehanizma zaviranja DNA giraze. Prvi je vezava na podenoto A in stabilizacija kompleksa DNA-giraza, drugi pa vezava na podenoto B, kjer kemoterapevtik tekmuje z molekulom ATP za vezavo na encim, s tem pa zavira ATP-azno aktivnost giraze. Nekatere spojine izkazujejo dvojno delovanje, tako proti girazi kot tudi topoizomerazi IV. V zadnjih letih pa odkrivajo tudi nove tarče na encimu, kar nam bo še olajšalo boj z mikroorganizmi (19, 26, 27, 28)

### 1.4.1. SPOJINE, KI SE VEŽEJO NA PODENOTO A DNA GIRAZE

Kinoloni predstavljajo najpogosteje uporabljane učinkovine med giraznimi zaviralci. Delujejo tako, da se po prekinitvi obeh verig DNA hitro kovalentno vežejo na kompleks giraza-DNA, natančneje na podenoto A DNA giraze (19), in tvorijo nov, reverzibilen kompleks kinolon-giraza-DNA. Zaviranje giraze je sicer le delni vzrok za baktericidno delovanje kinolonov. Po sami vezavi pride tudi do poškodb DNA verige zaradi posrednega

nastajanja reaktivnih kisikovih zvrsti. Vsi ti procesi vodijo v prekinitev prevajanja in podvajanja DNA molekul ter celično smrt mikroorganizma. Moksifloksacin je predstavnik 4. generacije flurokinolonskih kemoterapevtikov (Slika 9) (2, 26).

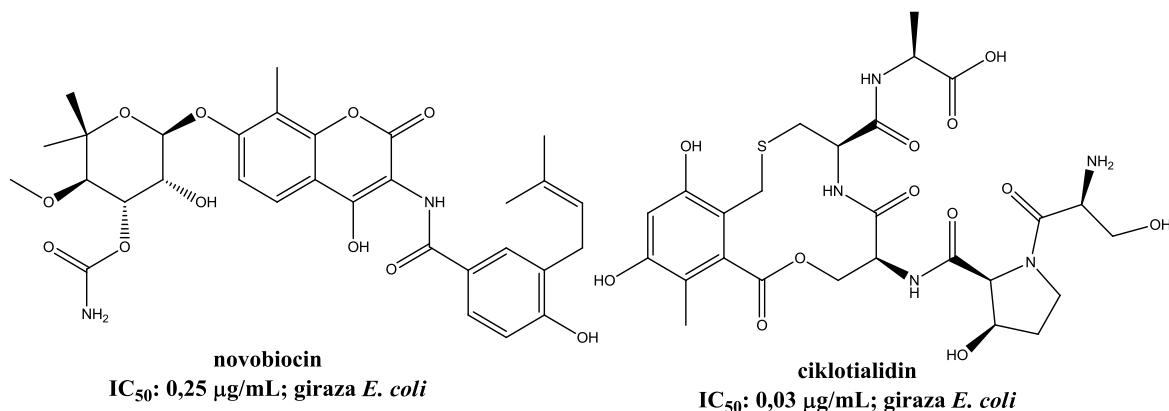


Slika 9: moksifloksacin in girazni zaviralec s 3-aminokinazolinskim ogrodjem I

Tran in sodelavci so na podlagi strukturne podobnosti s kinolonskimi kemoterapevtiki razvili spojine s 3-aminokinazolindionskim ogrodjem. Dobljene spojine preko podobnega mehanizma delovanja zavirajo isto tarčo kot kinoloni. Z optimizacijo in ustreznimi zamenjavami strukturnih delov kinolonskega ogroda so se na novo razviti kemoterapevtiki izkazali kot še boljši zaviralci DNA giraze, še posebej pri Gram-pozitivnih mikroorganizmih. Najobetavnejša odkrita spojina je girazni zaviralec s 3-aminokinazolinskim ogrodjem I (Slika 9) (29).

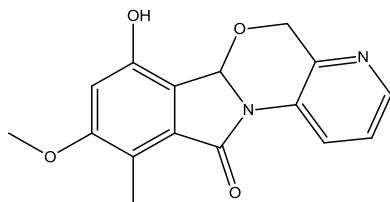
#### 1.4.2. SPOJINE, KI SE VEŽEJO NA PODENOTO B DNA GIRAZE

Druga klinično uporabna vrsta giraznih zaviralcev so aminokumarini, ki pa so manj razširjeni od kinolonov zaradi slabih farmakokinetičnih lastnosti ter težav z varnostjo (2, 30). Primer je naravni antibiotik novobiocin (Slika 10), ki z molekulami ATP tekmuje za vezavo na podenoto B DNA giraze. Po vezavi zavira ATP-azno aktivnost giraze, s tem pa ustavi od ATP odvisen energijski proces DNA podvajanja (31).



Slika 10:novobiocin in ciklotialidin

Lübbers in sodelavci so z rentgenskimi žarki preučili strukturo novobiocina in ciklotialidina (prikazanega na Sliki 10) ter dobili spojino vodnico s šibkim zaviralnim delovanjem na girazo. Z optimizacijo dobljene spojine, strukturno podobne ciklotialidinu, so dobili novo skupino giraznih inhibitorjev s tetracikličnim ogrodjem s fenolnim obročem, ki prav tako deluje na podenoto B DNA giraze (girazni zaviralec s tetracikličnim ogrodjem **II**, prikazan na Sliki 11) (19).

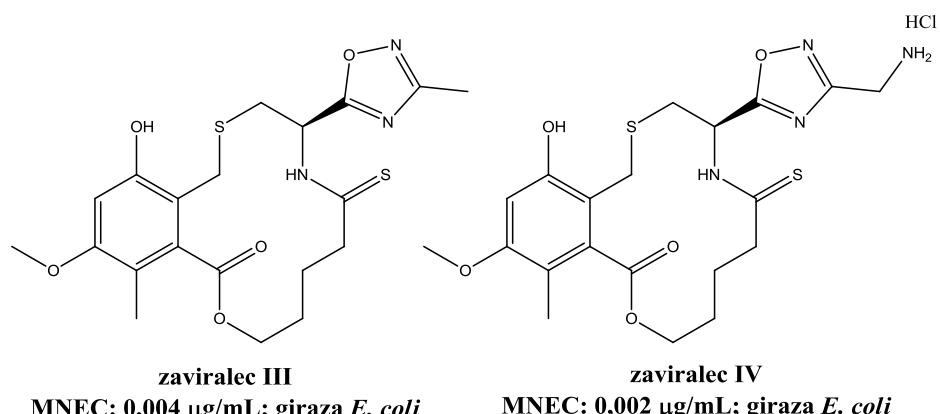


MNEC\*: 0,13 µg/mL; giraza *E. coli*  
MIC: 1 µg/mL (MRQRSA)

Slika 11: girazni zaviralec s tetracikličnim ogrodjem **II**

\*MNEC: maximal non-effective concentration

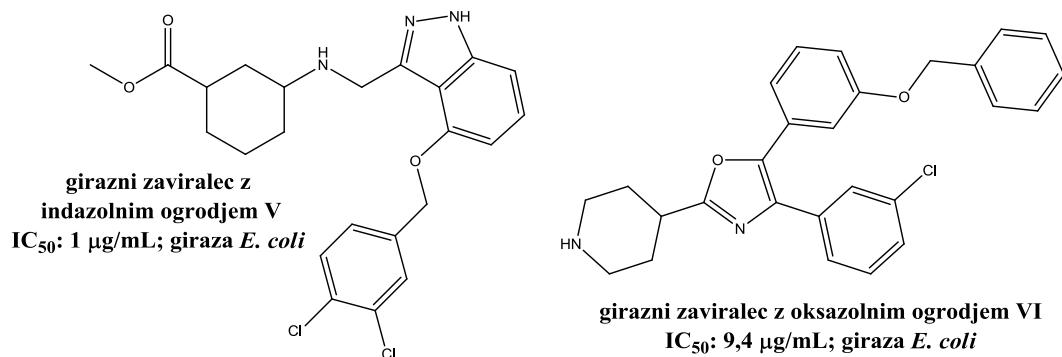
Angehrn in sodelavci so prav tako na podlagi ciklotialidina odkrili nove spojine. Ciklotialidin je sicer močan zaviralec DNA giraze, a je zaradi slabega prehajanja bakterijske citoplazemske membrane neučinkovit *in vivo*. Analizirali so strukturo DNA giraze in na podlagi rezultatov sintetizirali več analogov ciklotialidina. Dobljene spojine so optimizirali za dosego *in vitro* učinka, nato pa še *in vivo*. Najbolje se je izkazal girazni zaviralec z laktonskim ogrodjem **III** (Slika 12), a je slabo učinkovit *in vivo* zaradi prevelike lipofilnosti. Po nadaljnji optimizaciji so odkrili *in vivo* aktivnega zaviralca z laktonskim ogrodjem **IV** (Slika 12) (32).



Slika 12: girazna zaviralca z laktonskim ogrodjem **III** in **IV**

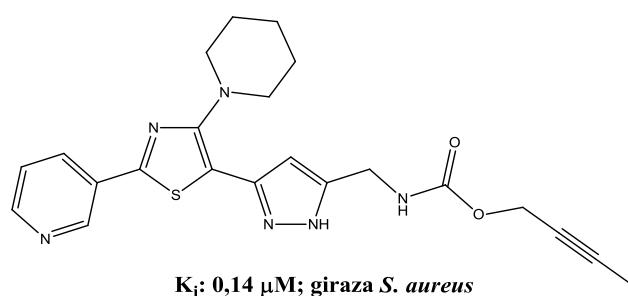
S pomočjo podrobne 3D strukture vezavnega mesta ATP na girazi so pri družbi Hoffmann-La Roche odkrili spojino vodnico iz katere so Tanitame in sodelavci potem dobili nove

girazne zaviralce z indazolnim ogrodjem (girazni zaviralec z indazolnim ogrodjem **V** je prikazan na sliki 13). Nove spojine so še posebej učinkovite proti stafilokokom in enterokokom ter tudi na več različnih zdravil odpornim sevom (1). V ločeni študiji so razvili še zaviralce s pirazolnim, oksazolnim ali imidazolnim ogrodjem (girazni zaviralec z oksazolnim ogrodjem **VI** je prikazan na sliki 13). Odkrite spojine so prav tako kot indazolni zaviralci, učinkovite proti na več različnih zdravil odpornim sevom, njihova prednost pa je tudi praktično enaka učinkovitost proti girazi kot tudi proti topoizomerazi **IV**. Omenjena lastnost je pomemben dejavnik za morebiten razvoj rezistence, do le-te namreč pride težje, če spojina deluje na več različnih tarč (33).



Slika 13: girazni zaviralec z indazolnim ogrodjem **V** in girazni zaviralec z oksazolnim ogrodjem **VI**

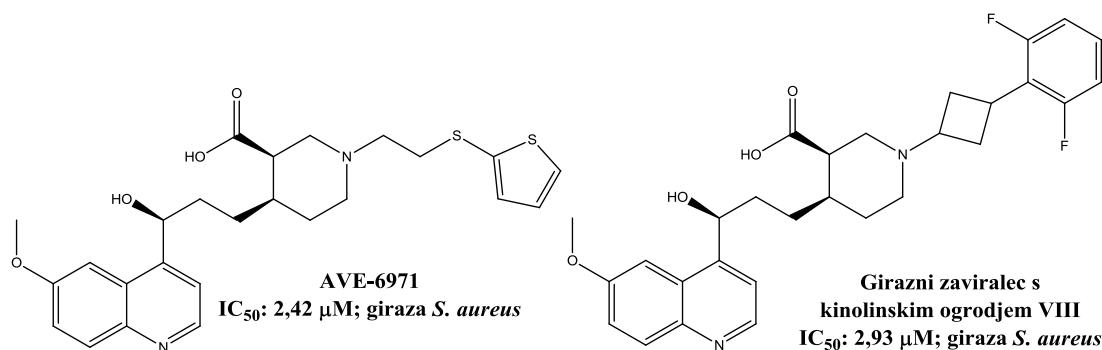
Ronkin in sodelavci so z metodo visokozmogljivega rešetanja spojin odkrili spojino vodnico z pirazoltiazolnim ogrodjem. Z rentgensko sliko kristalne strukture spojine, vezane na podenoto B DNA giraze, ter nadaljnjo optimizacijo so dobili novo skupino zaviralcev ATP-azne aktivnosti DNA giraze s pirazoltiazolnim ogrodjem (girazni zaviralec s pirazoltiazolnim ogrodjem **VII** je prikazan na sliki 14) (31).



Slika 14: girazni zaviralec s pirazoltiazolnim ogrodjem **VII**

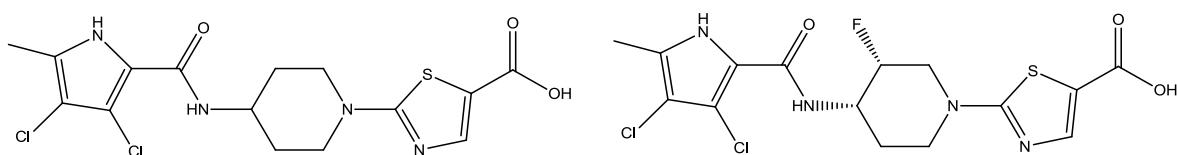
Mitton-Fry in sodelavci so se pri svoji raziskavi opirali na spojino AVE-6971 (Slika 15), obetajočega zaviralca topoizomeraz tipa II, ki ga je predstavila družba Aventis. Spojina je dober zaviralec tako DNA giraze kot tudi topoizomeraze **IV**, zato se je izkazala kot dobra izhodna točka za optimizacijo. Zamenjali so nekaj potencialnih toksikoforov ter še vedno

ohranili zadovoljivo protimikrobnno delovanje. Tekom raziskave so se ugotovili, da večina spojin zmerno blokira ionski kanal hERG, kar je vodilo v umaknitev ene izmed spojin iz nadaljnjih kliničnih študij. Girazni zaviralec s kinolinskim ogrodjem **VIII** (prikazan na Sliki 15) iz raziskave je edini, ki kaže zadovoljiv napredek pri zmanjšanju zaviralne aktivnosti. Novo postavljeni cilji so optimizacija delovanja na DNA girazo ter topoizomerazo IV ter znižanje oziroma odprava zaviralne aktivnosti na ionski kanal hERG. Ne glede na to, nove spojine kažejo napredek pri iskanju učinkovitih kemoterapevtikov z učinki na topoizomeraze tipa II (34).



Slika 15: spojina AVE-6971 ter girazni zaviralec s kinolinskim ogrodjem VIII

Iskanje novih tarč kemoterapevtikov je zelo pomemben del pri odkrivanju novih učinkovin, ni pa edini. Veliko novih potencialnih spojin z obetajočimi *in vitro* lastnostmi je praktično neuporabnih *in vivo* zaradi slabega prehajanja v bakterijske celice. Prav tako se farmacevtska podjetja preveč zanašajo na spojine vodnice iz starejših raziskav, ki redko vodijo v uporabna odkritja. Iskanje spojine vodnice na osnovi fragmentov (fragment-based lead generation; FBLG) je novejša alternativna tehnika iskanja učinkovin, ki se izogne že znanim oviram. Namesto visoko-zmogljivostnega rešetanja (HTS) spojin, FBLG išče fragmente z nizko molekulsko maso, ki so posebej prilagojeni tarčnemu mestu. Prav tako se že zgodaj gleda na fizikalno-kemijske lastnosti spojin, ki so potrebne za uspešno prehajanje v celice mikroorganizmov. Eakin in sodelavci so z uporabo tehnik FBLG in NMR razvili pirolamidne spojine, primarno učinkovite proti Gram-pozitivnim patogenom ter tudi že rezistentnim mikroorganizmom. Odkriti pirolamidi (girazni zaviralec s pirolamidnim ogrodjem **IX**, prikazan na Sliki 16) se vežejo na girazno podenoto B in zavirajo njeno ATP-azno aktivnost.



**zaviralec IX**

**IC<sub>50</sub>:** 0,025 μM; giraza *E. coli*

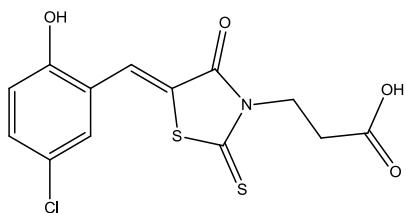
**zaviralec X**

**MIC<sub>50</sub>:** 1 μg/mL (kolonija MRSA)

Slika 16: girazna zaviralec s pirolamidnim ogrodjem IX in X

Z optimizacijo s pomočjo računalniških modelov in rentgenske kristalografije so dobili novo skupino učinkovin, primerno tudi za nadaljnje raziskovanje ter izpopolnjevanje (2). Uria-Nickelsen in sodelavci so nadaljevali delo prvotne skupine in z optimizacijo najuspešnejših spojin iz predhodne raziskave dobili še učinkovitejše pirolamidne analoge. Sprememba centralnega obroča v molekuli z uvedbo atoma fluora na giraznem zaviralcu s pirolamidnim ogrodjem X (Slika 16) je še povečala učinkovitost proti na meticilin odpornemu *S. aureus* (MRSA), na meticilin in kinolone odpornemu *S. aureus* (MRQRSA), na penicilin odpornim pnevmokokom (PRP), na vankomicin odpornim enterokokom (VRE) ter na beta-laktamazo proizvajajočim *H. influenzae* in *M. catarrhalis* (35).

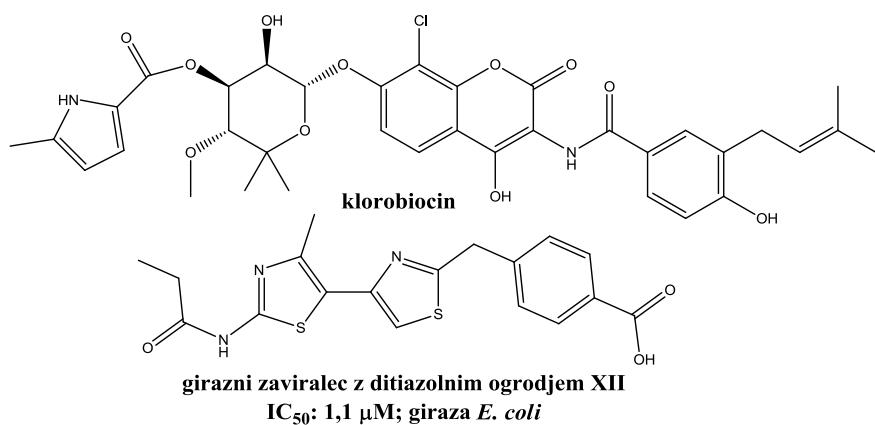
Brvar in sodelavci so z metodo virtualnega rešetanja odkrili nove girazne zaviralec, ki zavirajo ATP-azno aktivnost DNA giraze. Spojine spadajo v skupino rodaninov, pri katerih je osnovni skelet osnovan na 2-sulfaniliden-1,3-tiazolidin-4-onu. Odkrivanje novih spojin je temeljilo na strurni podobnosti z že znanimi giraznimi zaviralcji 2,4-dihidroksifeniltiazoli, pri optimizaciji pa so si pomagali z računalniškimi in biofizikalnimi tehnikami. Spojine posedujejo protimikrobnno delovanje in so primerne za nadaljnje izboljšave. Najobetavnejši zaviralec je prikazan na Sliki 17 (36).



**IC<sub>50</sub>:** 64 μM; giraza *E. coli*

Slika 17: girazni zaviralec s tiazolidinskim ogrodjem XI

Kasneje so Brvar in sodelavci za osnovo izbrali klorobiocin (prikazan na Sliki 18), novobiocinu podobno naravno učinkovino in z metodo virtualnega rešetanja odkrili novo skupino giraznih zaviralcev s 4,5'-ditiazolnim ogrodjem. Najučinkovitejši je je prikazan na Sliki 18 (37).

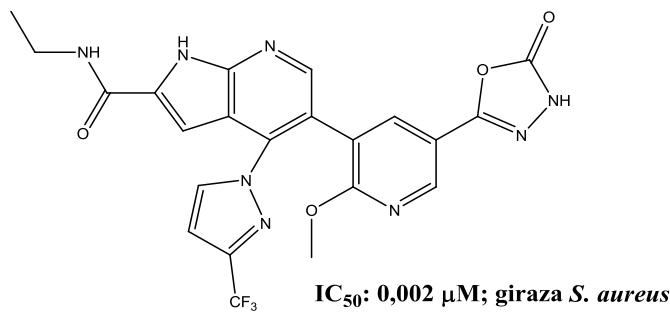


girazni zaviralec z ditiazolnim ogrodjem XII

$IC_{50}$ : 1,1  $\mu$ M; giraza *E. coli*

Slika 18: klorobiocin in girazni zaviralec z ditiazolnim ogrodjem XII

Manchester in sodelavci so uporabili manjšo knjižnico molekularnih fragmentov kinaznih zaviralcev in z metodo virtualnega rešetanja dobili spojine z azaindolnim ogrodjem, ki se dobro prilegajo v encimski žep. Z uporabo strukturnih podobnosti in SAR že znanih zaviralcev topoizomeraz tipa II so dobili nove spojine z dvojnim delovanjem na ATP-azno aktivnost encimov, tako na DNA girazo kot tudi na topoizomerazo IV. Najobetavnejši zaviralec je prikazan na Sliki 19 (38).

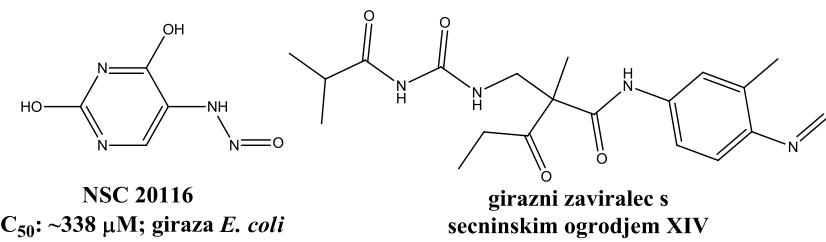


$IC_{50}$ : 0,002  $\mu$ M; giraza *S. aureus*

Slika 19: girazni zaviralec z azaindolnim ogrodjem XIII

#### 1.4.3. OSTALE SPOJINE

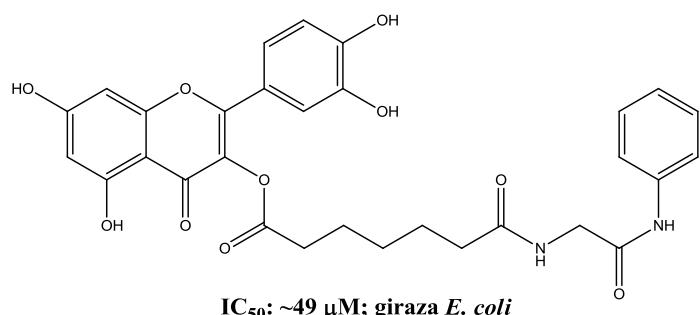
Pojav bakterijskih sevov s spremenjeno različico DNA giraze, ki so odporni na kinolonske kemoterapevtike, je vzrok za iskanje novih kemoterapevtikov z drugačnim mehanizmom delovanja. Nabor 140000 spojin z molsko maso manjšo od 500 g/mol so z metodo molekulskega rešetanja vstavili v dva različna strukturna žepa na girazi, izolirani iz bakterije *Escherichia coli*. S postopkom so dobili več novih spojin s popolnoma drugačno strukturo od znanih zaviralcev giraze, ki predstavljajo zelo dobro izhodišče za sintezo in optimizacijo novih kemoterapevtikov z delovanjem proti na fluorokinolone odporne bakterijske seve. Med zaviralci, ki se vežejo na podenoto B DNA giraze, ima največjo zaviralno aktivnost spojina NSC 20116 (prikazana na Sliki 20) (27).



Slika 20: spojina NSC 20116 in girazni zaviralec s sečninskim fragmentom XIV

Novi zaviralci bakterijske topoizomeraze IIA (NBTI) so nova skupina zaviralcev bakterijske giraze, ki pa se na kompleks giraza-DNA vežejo pred prekinitvijo DNA verig. So aktivnejši od kinolonov in imajo širši spekter delovanja proti Gram-pozitivnim kot tudi Gram-negativnim bakterijam. Spojine so pridobili s pomočjo različnih računalniških metod, najobetavnejši potencialen zaviralec giraze s sečninskim ogrodjem XIV pa je prikazan na Sliki 20 (26).

Verghese in sodelavci so iskali spojine z mehanizmom delovanja, ki bo drugačen od mehanizma kinolonov. Pri delu so izhajali iz naravne spojine simociklinon D8, ki deluje kot kompetitivni zaviralec vezave molekule DNA na girazo. Sintetizirali so več analogov flavonov, ki so sicer delovali kot zaviralci DNA giraze, vendar preko drugačnega mehanizma delovanja. Odkrili so, da se najverjetneje interkalirajo v molekulo DNA in s tem zavirajo DNA girazo. Najboljši zaviralec je prikazan na Sliki 21 (28).



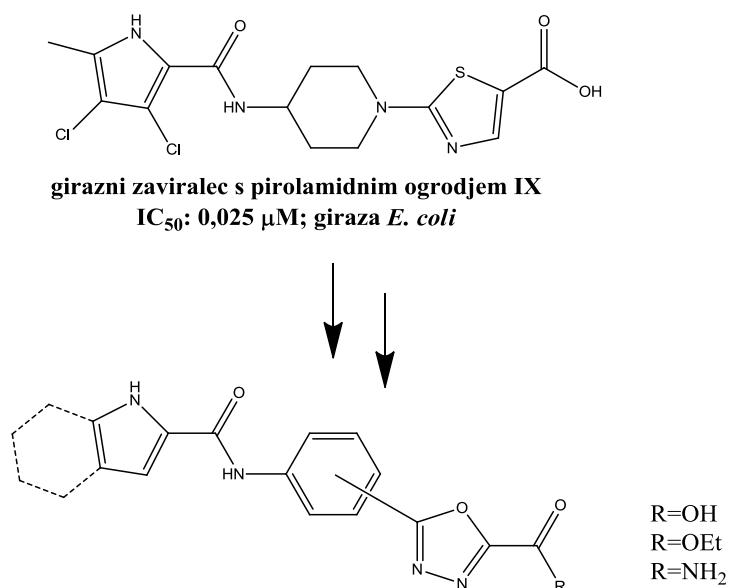
Slika 21: girazni zaviralec s flavonskim ogrodjem XV

## 2. NAČRT ZA DELO

V okviru diplomskega dela bomo sintetizirali več potencialnih zaviralcev giraze s pirolamidno osnovo in 1,3,4-oksadiazolnim ogrodjem ter jih ustrezzo fizikalno-kemijsko in spektroskopsko ovrednotili, določili pa jim bomo tudi njihovo zaviralno aktivnost.

Izhajali bomo iz spojine 2-(4-(3,4-dikloro-5-metil-1*H*-pirol-2-karboksamido)piperidin-1-il)tiazol-5-karboksilna kislina (girazni zaviralec s pirolamidnim ogrodjem **IX**), ki se je izkazala kot obetavna spojina vodnica za nadaljnjo optimizacijo (2).

Spojini vodnici bomo zamenjali piperidinski obroč s fenilnim obročem, z uvedbo aromata bomo dobili bolj rigidno planarno strukturo. Na fenilni obroč bomo substituente uvedli na mestih 3 in 4, tako bomo dobili več različnih spojin in s tem več potencialnih zaviralcev giraze. Tiazolni obroč bomo zamenjali z 1,3,4-oksadiazolnim obročem, znano privilegirano strukturo, le-ta se tudi vedno pogosteje pojavlja v najrazličnejših učinkovinah. 3,4-dikloro-5-metilpirolni obroč bomo zamenjali s pirolnim, 4,5-dibromopirolnim, indolnim ali 5-fluoroindolnim obročem, s tem bomo pridobili strukturne fragmente različnih velikosti za vezavo v encimski žep na DNA girazi. Na koncu bomo zamenjali še karboksilno kislino z amidom, ki je dokaj podobna a stabilnejša struktura. Vse spremembe so vidne na Sliki 22.



Slika 22: spremembe spojine vodnice (girazni zaviralec s pirolamidnim ogrodjem **IX**)

Spojine bomo tudi biološko ovrednotili s testiranjem rezidualne aktivnosti DNA giraze po inkubaciji z zaviralcem.

### 3. MATERIALI IN METODE

#### 3.1. MATERIALI

- **Reagenti in topila**

Pri eksperimentalnem delu v laboratoriju smo uporabljali kemikalije in topila naslednjih proizvajalcev: Acros Organics (Belgia), Carlo Erba (Italija), Gram-mol (Hrvaška), Fluka (Švica), Janssen (ZDA), Merck (Nemčija), Panreac (Španija) ter Sigma-Aldrich (ZDA).

- **Laboratorijska oprema**

- magnetno mešalo z grelnikom : IKA Labortechnik RCT basic
- rotavapor : Büchi Rotavapor R-114 ter Büchi Waterbath B-480, Švica
- tehntica : Mettler Toledo PG 803
- analitska tehntica : Mettler Toledo AG245
- UV svetilka : Lamag UV-CABINET II, Nemčija
- žarilna pištola : SKILL 1800 Watt
- sušilnik : Instrumentaria sterimatic ST-11

- **Nomenklatura in risanje spojin**

Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 12.0, proizvajalca CambridgeSoft.

#### 3.2. METODE

##### 3.2.1. Kromatografske metode

- **Tankoplastna kromatografija**

Tankoplastno kromatografijo (TLC) smo izvajali na ploščicah Silica gel 60 F<sub>245</sub>, z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu velikosti 20 x 20 cm, proizvajalca Merck (Nemčija). Kot mobilno fazo smo uporabili različna topila. S pomočjo tankoplastne kromatografije smo pri eksperimentalnem delu spremljali poteka reakcij, izolacij le-teh ter jih neposredno uporabljali pri kolonski kromatografiji. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabili UV svetilko, z valovnima dolžinama  $\lambda=254$  nm in  $\lambda=366$  nm, in orositvena reagenta ninhidrin ter bromkrezolno zeleno. S pomočjo ninhidrina smo detektirali amine in karbamate, s pomočjo bromkrezolno zelenega pa kisline.

- **Kolonska kromatografija**

Kolonsko kromatografijo smo izvajali s pomočjo steklenih kolon različne velikosti. Kot stacionarno fazo smo uporabili Silikagel 60 (Kieselgel 60), s premerom delcev 0,04-0,063 mm (flash silikagel), proizvajalca Merck (Nemčija), kot mobilno fazo pa smo uporabili različna topila. Pri delu smo potrebovali še vato Cik-cak podjetja Tosama (Slovenija), pesek ter sušilno sredstvo  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , proizvajalca Merck (Nemčija).

- **Mobilne faze**

Pri kolonski in tankoplastni kromatografiji smo uporabili naslednje mobilne faze:

MF 1 : Diklorometan/metanol : 9/1 + 1% ocetne kisline

MF 2 : Heksan/etilacetat : 1/1

MF 3 : Etilacetat

MF 4 : Heksan/etilacetat : 3/2

### **3.2.2. Spektroskopske metode**

- **Jedrska magnetna resonanca (NMR)**

$^1\text{H}$  in  $^{13}\text{C}$  NMR spektri so bili posneti na spektrometu Bruker AVANCE III na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.  $^1\text{H}$  Spektri so bili posneti pri 400 MHz pri temperaturi 295 K,  $^{13}\text{C}$  spektri pa pri 100 MHz prav tako pri 295 K. Kot topilo smo uporabili devterirano topilo DMSO-d<sub>6</sub> ter TMS ( $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$ ) kot interni standard. Dobljene spektre smo računalniško obdelali s programom MestRec 8.4.6. proizvajalca Mestrelab Research.

- **Infrardeča spektroskopija (IR)**

IR spektri so bili posneti na spektrometu Nexus FT-IR na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Dobljene spektre smo računalniško obdelali s programom Omnic E.S.P. 5.2.

- **Masna spektrometrija (MS)**

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

- **Elementna analiza (CHN)**

Elementna analiza oziroma vsebnosti elementov C, H in N so bile izmerjene z analizatorjem Perkin Elmer 2400 CHN na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

### **3.2.3. Določanje tališča**

Tališča spojin smo določali s talilnim mikroskopom z ogrevalno mizico Wagner & Munz Polytherm A ter termometrom 52 II Thermometer proizvajalca Fluke (ZDA) na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Tališča niso korigirana.

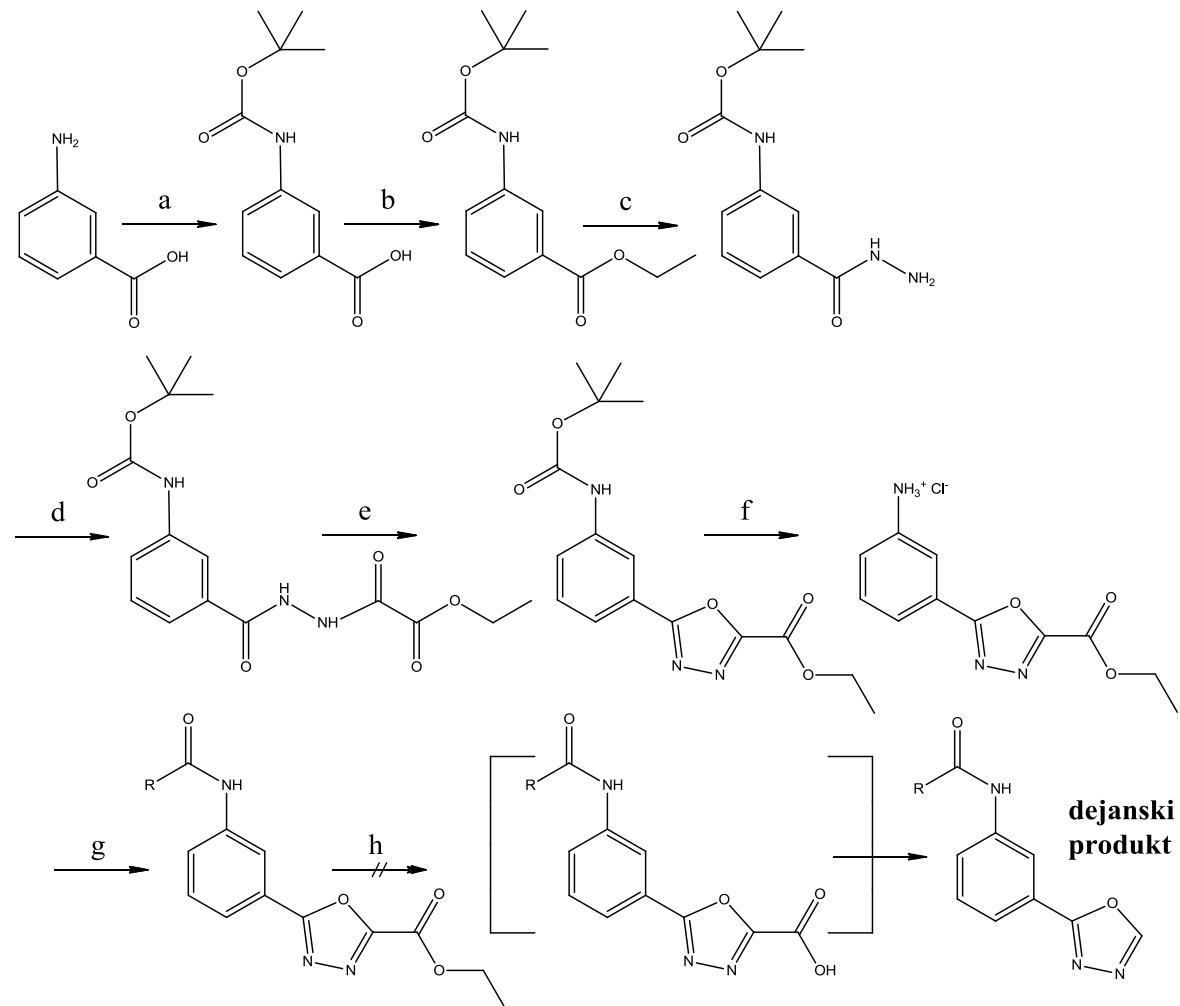
### **3.2.4. Biološko testiranje spojin**

Pripravili smo 10 mM raztopine učinkovin v dimetilsulfoksidu, ki smo jih nato ustrezno redčili, tako da koncentracija DMSO ni presegla 1%, v testni sistem pa smo dodali tudi površinsko aktivno snov Tween za preprečevanje lažno pozitivnih rezultatov. Spojine smo biološko ovrednotili z merjenjem rezidualne aktivnosti DNA giraze po inkubaciji z zavircem. Encim je bil pridobljen z izolacijo iz *E. coli*. Vrednosti IC<sub>50</sub> smo ocenili s testiranjem pri 10 µM in 100 µM koncentracijah učinkovin (36).

## 4. EKSPERIMENTALNI DEL

### 4.1. Reakcijski shemi

Celotna reakcijska shema 1:



a: BOC anhidrid, trietylamin, DMAP, voda, dioksan,

b:  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , etil bromid, TBAF, acetonitril, THF

c: hidrazin hidrat, absolutni etanol, THF

d:  $\text{NaHCO}_3$ , etil oksalil klorid, DMF, THF

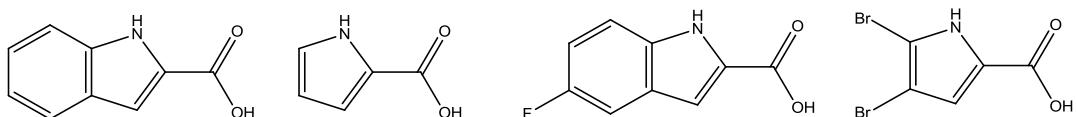
e: trifenielfosfin, trietylamin,  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , THF

f:  $\text{HCl}_{(\text{g})}$ , dietil eter, THF

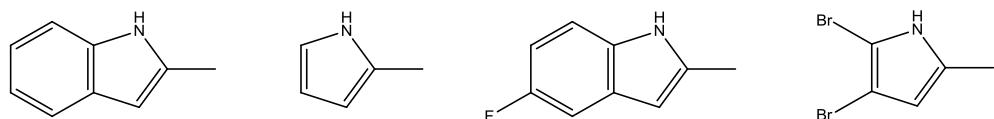
g: **kislina\***, TBTU, DMAP, NMM,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

h: 2M  $\text{LiOH}_{(\text{aq})}$ , absolutni etanol, THF

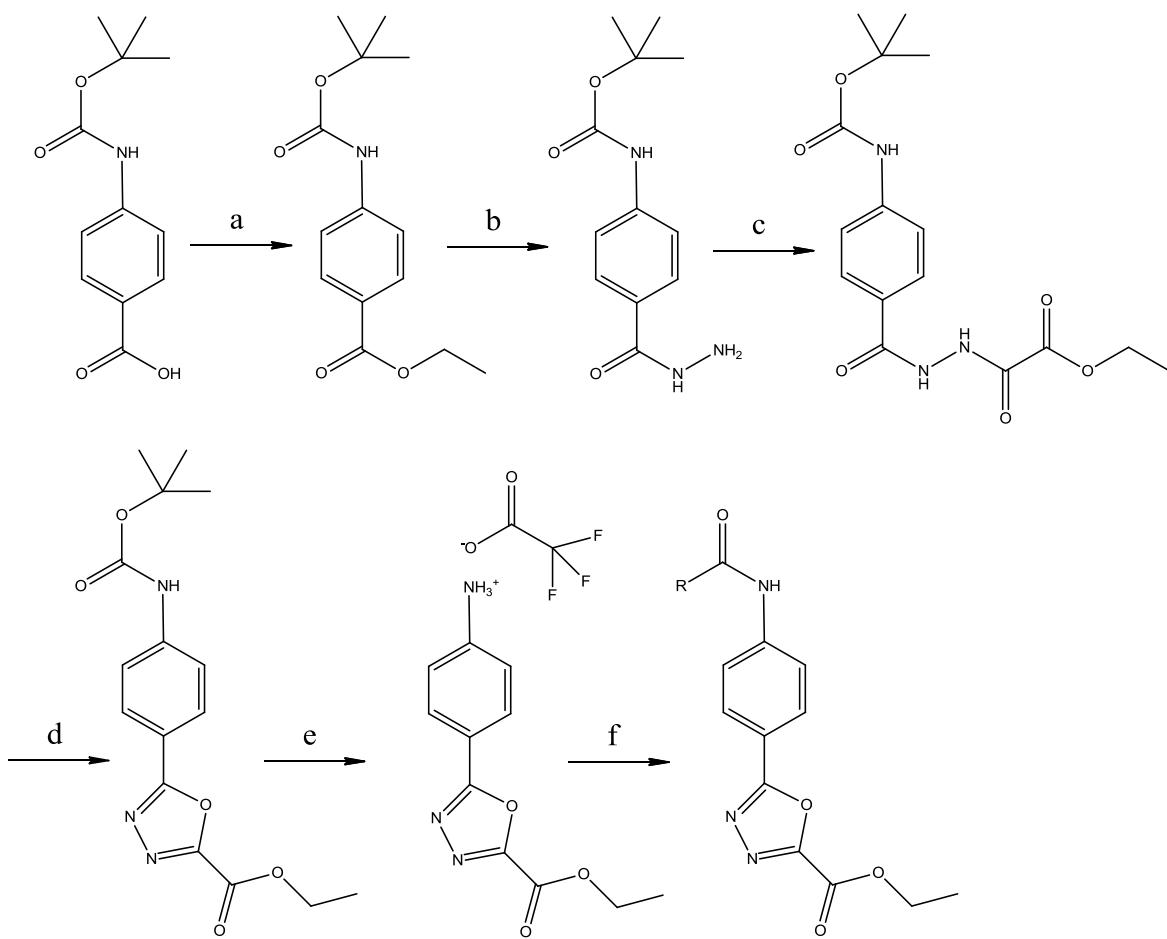
**\*Kislina:**



R:



Celotna reakcijska shema 2:



**a:**  $\text{K}_2\text{CO}_3$ , etil bromid, TBAF, acetonitril, DMF, THF

**b:** hidrazin hidrat, absolutni etanol, THF

**c:**  $\text{NaHCO}_3$ , etil oksalil klorid, THF

**d:** trifenilfosfin, trietilamin,  $\text{CCl}_4$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , THF

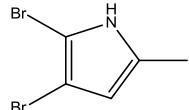
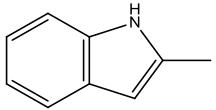
**e:** trifluoroocetna kislina,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$

f: i) indol-2-karboksilna kislina, TBTU, DMAP, NMM, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

ali

ii) 4,5-dibromopirol-2-karboksilna kislina, TBTU, DMAP, NMM, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>

R:



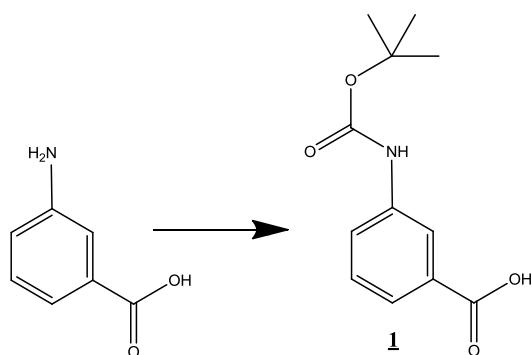
## 4.2. SINTEZA 3-(5-(ETOKSIKARBONIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-IL)BENZENAMINIJEVEGA KLORIDA (6)

### 4.2.1. SINTEZA

3-((TERC-

#### BUTOOKSIKARBONIL)AMINO)BENZOJSKE KISLINE (1)

Reakcija:



Postopek:

V 250 ml bučko smo natehtali 2,748 g (20,0 mmol) 3-aminobenzojske kisline ter jo raztopili v 30 ml dioksana in 20 ml destilirane vode. Dodali smo 4,2 ml (30 mmol) trietilamina in reakcijsko zmes mešali 10 minut na ledeni kopeli pri 0 °C. V 50 ml bučku smo natehtali 6,55 g (30,0 mmol) di-*terc*-butil dikarbonata (BOC anhidrid) ter ga raztopili v 15 ml dioksana. Dobljeno raztopino smo 15 minut dokapavali v reakcijsko zmes na ledeni kopeli. Reakcijski zmesi smo dodali katalitično količino DMAP ter jo mešali pri sobni temperaturi. Po 24 urah smo s TLC zaznali, da je reakcija popolnoma potekla, zato smo pod znižanim tlakom odparili dioksan. Zmes smo z 0,5 M HCl nakisali do pH=2. Nato smo vodno fazo ekstrahirali s 3 x 50 ml etil acetata, združene organske faze pa smo sprali z 20 ml nasičene raztopine natrijevega klorida in še dodatno posušili z natrijevim sulfatom. Dobljeno zmes smo prefiltrirali ter filtratu odparili topilo in dobili 4,436 g 3-((*terc*-butoksikarbonil)amino)benzojske kisline (**1**).

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 93,4 % (4,436 g)

Rf: 0,54 (MF: diklorometan/metanol : 9/1 + 1% ocetne kisline)

T<sub>talšča</sub>: lit. 189-190 °C (39)

Aleš Svete: *Načrtovanje in sinteza potencialnih zaviralcev giraze z 1,3,4-oksadiazolnim ogrodjem*

---

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm]= 1,46 (s, 9H, BOC), 7,34 (t, 1H, J=8,1 Hz, Ar-H), 7,52 (d, 1H, J=6,3 Hz, Ar-H), 7,60 (d, 1H, J=7,8 Hz, Ar-H), 8,13 (s, 1H, Ar-H), 9,54 (s, 1H, -NH), 12,88 (s, 1H, -COOH); podatek iz literature (39)

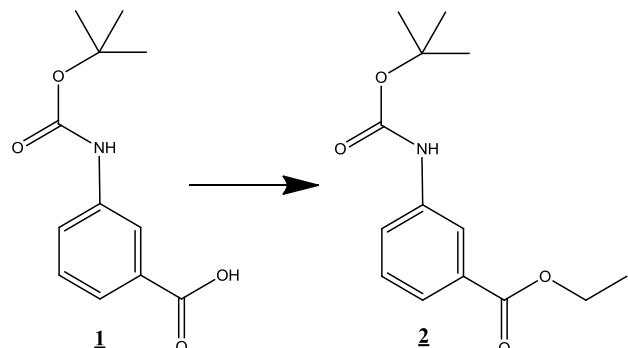
#### 4.2.2. SINTEZA

ETIL

3-((TERC-

#### BUTOJSIKARBONIL)AMINO)BENZOATA (2)

##### Reakcija:



##### Postopek:

V 250 ml bučko smo natehtali 4,436 g (18,71 mmol) 3-((tert-butoxikarbonil)amino)benzojske kisline (**1**) ter jo raztopili v 50 ml THF in 55 ml acetonitrila. Reakcijski zmesi smo dodali 3,60 g (28,1 mmol) kalijevega karbonata ter jo 15 minut mešali pri sobni temperaturi. Dodali smo 1,536 ml (20,6 mmol) etil bromida ter ščepec TBAF. Reakcijsko zmes smo prenesli na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluksa (60 °C). Po 24 urah smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla, zato smo z rotavaporjem odparili topilo. Ostanek reakcijske zmesi smo raztopili v 100 ml diklorometana ter sprali z 2 x 20 ml destilirane vode. Organsko fazo smo sprali z 20 ml nasičene raztopine natrijevega klorida in dodatno posušili z natrijevim sulfatom, prefiltrirali ter filtratu odparili topilo in dobili 4,207 g etil 3-((tert-butoxikarbonil)amino)benzoata (**2**).

##### Rezultati:

**Izgled:** beli kristali

**Izkoristek:** 84,8 % (4,207 g)

**Rf:** 0,68 (MF: heksan/etil acetat : 1/1)

**T<sub>tališča</sub>:** 90-94 °C

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3330, 2971, 1717, 1698, 1633, 1613, 1592, 1541, 1489, 1474, 1449, 1423, 1394, 1366, 1308, 1293, 1230, 1159, 1129, 1059, 1023, 995, 928, 908, 891, 868, 821, 770, 749, 682, 606, 582, 578, 563

Aleš Svete: *Načrtovanje in sinteza potencialnih zaviralcev giraze z 1,3,4-oksadiazolnim ogrodjem*

---

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm]= 1,32 (t, 3H, J=7,2 Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,49 (s, 9H, Boc), 4,31 (k, 2H, J=7,2 Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 7,40 (t, 1H, J=8,0 Hz, Ar-H), 7,55 - 7,57 (m, 1H, Ar-H), 7,64 – 7,66 (m, 1H, Ar-H), 8,18 (t, 1H, Ar-H), 9,60 (s, 1H, -NH)

**MS (ESI):** 288,1 [M+Na]<sup>+</sup>

**Mr (izračunana):** 265,30

**HR-MS:** 288,1219 (izračunana: 288,1212)    **Elementna sestava:** C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>

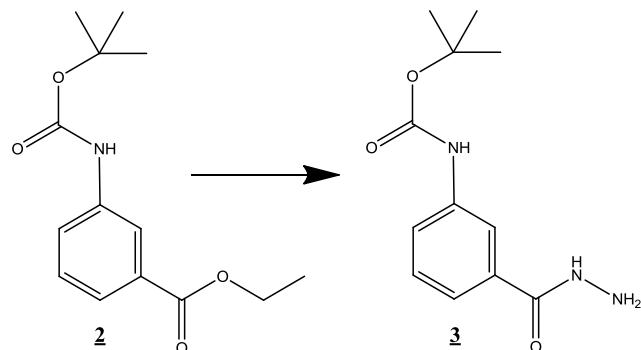
#### 4.2.3. SINTEZA

#### TERC-BUTIL

(3-

#### (HIDRAZINKARBONIL)FENIL)KARBAMATA (3)

##### Reakcija:



##### Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 1,500 g (5,66 mmol) etil 3-((tert-butoxikarbonil)amino)benzoata (**2**) ter ga raztopili v 4 ml absolutnega etanola in 5 ml THF. Dodali smo 5 ml hidrazin hidrata, reakcijsko zmes prenesli na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluksa (80 °C). Po 24 urah smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla, zato smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Produkt smo očistili s prekristalizacijo iz absolutnega etanola (10 ml). Po 1 uri v hladilniku so izpadli beli kristali, ki smo jih odfiltrirali z odsesavanjem. Produkt smo zbrali na petrijevki in ga posušili v sušilniku do konstantne mase pri temperaturi 50 °C.

##### Rezultati:

**Izgled:** beli kristali

**Izkoristek:** 87,4 % (1,242 g)

**Rf:** 0,22 (MF: etil acetat)

**T<sub>tališča</sub>:** 208-212 °C

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3311, 3289, 3062, 2973, 2358, 1714, 1654, 1606, 1588, 1548, 1488, 1417, 1393, 1366, 1340, 1309, 1238, 1155, 1090, 1061, 1032, 993, 978, 916, 905, 888, 828, 811, 774, 753, 695, 607, 582, 561

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm] = 1,48 (s, 9H, Boc), 4,45 (rs, 2H, -NH<sub>2</sub>), 7,29 (t, 1H, J=8,0 Hz, Ar-H), 7,35 – 7,37 (m, 1H, Ar-H), 7,51 – 7,53 (m, 1H, Ar-H), 7,93 (s, 1H, Ar-H), 9,48 (s, 1H, -NH-NH<sub>2</sub>), 9,66 (s, 1H, -NH-BOC).

**MS (ESI):** 252,1 [M+H]<sup>+</sup>

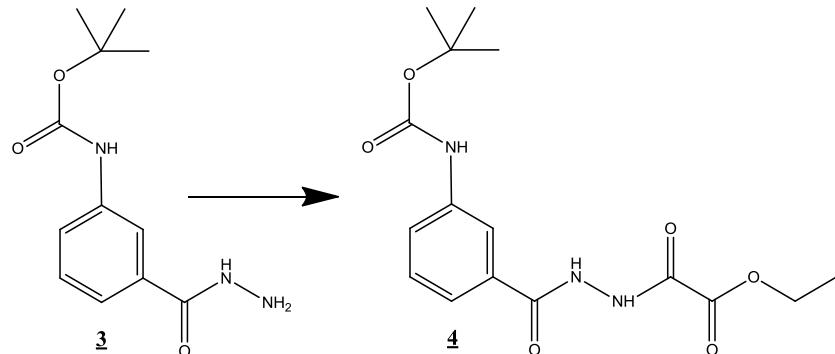
**Mr (izračunana):** 251,28

**HR-MS:** 252,1343 (izračunana: 252,1348)

**Elementna sestava:** C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

**4.2.4. SINTEZA ETIL 2-(2-(3-((TERC-BUTOXIKARBONIL)AMINO)BENZOIL)HIDRAZINIL)-2-OKSOACETATA (4)**

**Reakcija:**



**Postopek:**

V 250 ml bučko smo natehtali 1,443 g (5,75 mmol) *terc*-butil (3-(hidrazinkarbonil)fenil) karbamata (**3**) ter ga raztopili v 120 ml THF in 4 ml DMF. Dodali smo 540 mg (6,43 mmol) natrijevega hidrogenkarbonata in reakcijsko zmes mešali 15 minut na ledeni kopeli pri 0 °C. V penicilinki smo razredčili 640 µl (5,75 mmol) etil oksalil klorida v 2 ml THF. Dobljeno raztopino smo 5 minut dokapavali v reakcijsko zmes na ledeni kopeli. Reakcijsko zmes smo čez noč mešali na sobni temperaturi. Po 24 urah smo s TLC zaznali, da je reakcija popolnoma potekla, zato smo reakcijsko zmes prefiltrirali, filter papir pa še dodatno sprali z dietil etrom. Filtratu smo pod znižanim tlakom odparili topilo, v naslednji reakciji pa smo uporabili ves dobljeni produkt.

**Rezultati:**

**Izgled:** beli kristali

**Teoretični izkoristek:** 100% (2,019 g)

**Rf:** 0,78 (MF: etil acetat)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm]= 1,31 (t, 3H, J=7,2 Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,49 (s, 9H, BOC), 4,31 (k, 2H, J=7,2 Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 7,36 – 7,40 (m, 1H, Ar-H), 7,43 – 7,46 (m, 1H, Ar-H), 7,59 – 7,61 (m, 1H, Ar-H), 8,01 (s, 1H, Ar-H), 9,57 (s, 1H, -NH-BOC), 10,51 (s, 1H, -NH-NH), 10,91 (s, 1H, -NH-NH).

**MS (ESI):** 350,1 [M-H]<sup>-</sup>

**Mr (izračunana):** 351,35

**HR-MS:** 350,1355 (izračunana: 350,1352) **Elementna sestava:** C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>

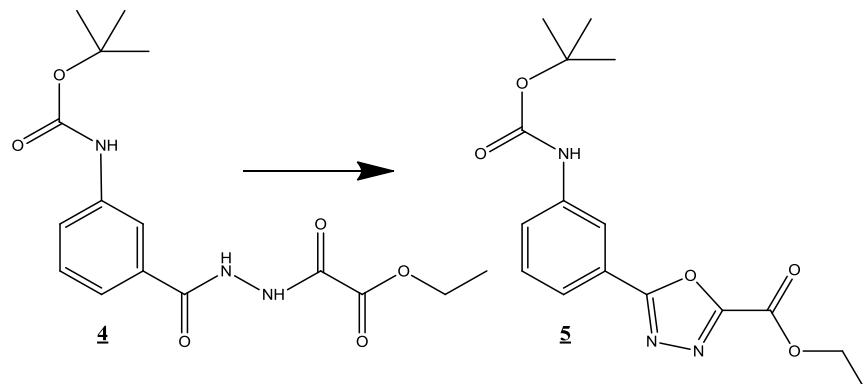
#### 4.2.5. SINTEZA

ETIL

5-(3-((TERC-

#### BUTOJSIKARBONIL)AMINO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILATA (5)

##### Reakcija:



##### Postopek:

Za to reakcijo smo uporabili ves produkt predhodne reakcije s predpostavko, da je bil izkoristek 100%. 2,019 g (5,75 mmol) etil 2-(2-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)benzoil)hidrazinil)-2-oksoacetata (**4**) smo v 50 ml bučki raztopili v 10 ml THF. Dodali smo 2 ml tetraklorometana in 2,28 ml (16,4 mmol) trietilamina. V drugo, 100 ml bučko, smo natehtali 1,81 g (6,9 mmol) trifenilfosfina ter ga raztopili v 30 ml diklorometana. Zmes iz prvotne bučke smo v 5 delih prenesli v drugo bučko. Dobljeno reakcijsko zmes smo 30 minut mešali na sobni temperaturi, nato pa prenesli na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluksa (80 °C). Po 24 urah smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla, zato smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Ostanek smo raztopili v mobilni fazi (heksan/etyl acetat : 3/2) in v nekaj kapljicah acetona. Rjave kristale, ki se niso raztopili smo odfiltrirali z odsesavanjem, matičnico pa smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: heksan/etyl acetat : 3/2) in dobili 1,301 g etil 5-(3-((tert-butoxycarbonyl)amino)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-karboksilata (**5**).

##### Rezultati:

**Izgled:** beli kristali

**Izkoristek:** 67,9 % (1,301 g)

**Rf:** 0,58 (MF: heksan/etyl acetat : 3/2)

**T<sub>tališča</sub>:** 94-98 °C

**IR ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3310, 2983, 2932, 1740, 1713, 1602, 1593, 1557, 1525, 1468, 1450, 1420, 1408, 1394, 1382, 1367, 1322, 1308, 1284, 1237, 1181, 1157, 1104, 1092, 1083, 1056, 1036, 1024, 1008, 997, 892, 855, 846, 799, 773, 766, 729, 684, 655, 608, 600, 570, 558

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm]= 1,37 (t, 3H,  $J=7,2$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,50 (s, 9H, Boc), 4,46 (k, 2H,  $J=7,2$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 7,51 (t, 1H,  $J=8,0$  Hz, Ar-H), 7,65 - 7,68 (m, 2H, Ar-H), 8,33 (s, 1H, Ar-H), 9,75 (s, 1H, -NH)

**MS (ESI):** 334,1 [M+H]<sup>+</sup>

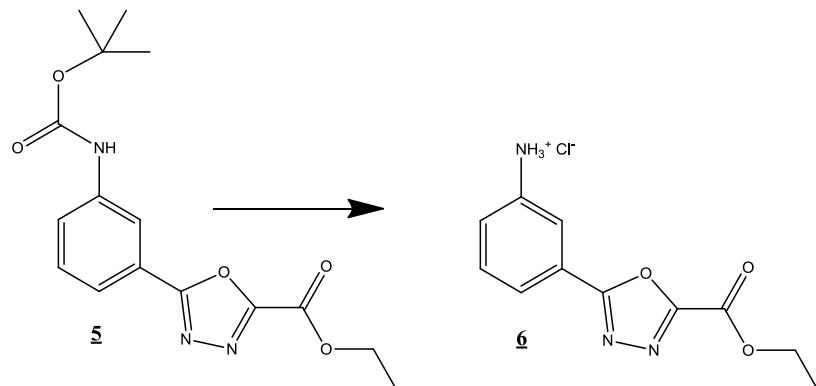
**Mr (izračunana):** 333,34

**HR-MS:** 334,1403 (izračunana: 334,1403)

**Elementna sestava:** C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

#### 4.2.6. SINTEZA 3-(5-(ETOKSIKARBONIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-IL)BENZENAMINIJEVEGA KLORIDA (6)

**Reakcija:**



**Postopek:**

V 100 ml bučko smo natehtali 1,056 g (3,17 mmol) etil 5-((*tert*-butoksikarbonil)amino)fenil-1,3,4-oksadiazol-2-karboksilata (**5**) ter ga raztopili v 10 ml dietil etra in 2 ml THF. Reakcijsko zmes smo mešali na ledeni kopeli pri 0 °C. Vzporedno smo pripravili trogrlo bučko z dietil etrom, ki smo ga prepihal s plinastim vodikovim kloridom. V reakcijsko zmes smo dodali 7 kapalk raztopine vodikovega klorida v dietil etru. Po 3 urah smo dodali še 5 kapalk iste raztopine. Reakcijsko zmes smo čez noč mešali na sobni temperaturi, nakar je po 24 urah izpadla bela oborina. Le-to smo odfiltrirali z odsesavanjem ter jo shranili. Matičnico smo 15 minut nadalje prepihovali s plinastim vodikovim kloridom, nato pa mešali čez noč na sobni temperaturi. Po 48 urah smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla, izpadla je tudi bela oborina. Reakcijsko zmes smo prelili v bučko, jo neprodušno zaprli ter ohladili v hladilniku. Po 20 minutah smo izpadlo oborino odfiltrirali z odsesavanjem, jo posušili ter združili s prvotno oborino in dobili 622 mg 3-(etoksikarbonil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)benzenaminijevega klorida (**6**).

**Rezultati:**

**Izgled:** beli kristali

**Izkoristek:** 72,7 % (622 mg)

**Rf:** 0,35 (MF: heksan/etyl acetat : 1/1)

**T<sub>tališča</sub>:** 156 - 158 °C

**IR ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 2835, 2566, 2364, 1946, 1747, 1624, 1574, 1540, 1489, 1433, 1406, 1387, 1311, 1283, 1209, 1182, 1155, 1102, 1084, 1023, 1010, 986, 973, 887, 857, 842, 820, 780, 730, 686, 644, 614, 589, 570

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm] = 1,37 (t, 3H,  $J=7,2$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4,30 (s, 3H, NH<sub>3</sub>) – širok, raztegnjen peak, 4,45 (k, 2H,  $J=7,2$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 7,17 - 7,20 (m, 1H, Ar-H), 7,45 - 7,49 (m, 1H, Ar-H), 7,56 - 7,61 (m, 2H, Ar-H)

**MS (ESI):** 234,1 [M-Cl]<sup>-</sup>

**Mr (izračunana):** 269,68

**HR-MS:** 234,0874 (izračunana: 234,0879)    **Elementna sestava:** C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

### 4.3. SINTEZA 4-(5-(ETOKSIKARBONIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-IL)BENZENAMINIJEVEGA TRIFLUOROACETATA (11)

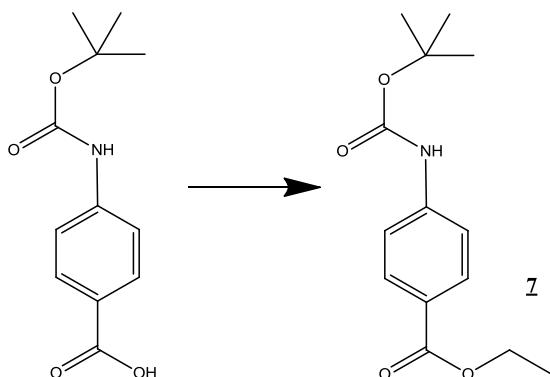
#### 4.3.1. SINTEZA

ETIL

4-((TERC-

#### BUTOOKSIKARBONIL)AMINO)BENZOATA (7)

##### Reakcija:



##### Postopek:

V 100 ml bučko smo natehtali 1,008 g (4,25 mmol) 4-((tert-butoxycarbonyl)amino)benzojske kisline ter jo raztopili v 20 ml acetonitrila, 10 ml THF in 2 ml DMF. Reakcijski zmesi smo dodali 881 mg (6,38 mmol) kalijevega karbonata ter jo mešali 15 minut pri sobni temperaturi. Nato smo dodali 349 µl (4,68 mmol) etil bromida ter ščepec TBAF. Reakcijsko zmes smo prenesli na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluksa (60 °C). Po 24 urah smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla, zato smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Ostanek reakcijske zmesi smo raztopili v 80 ml diklorometana in 10 ml vode. Organsko fazo smo spirali s 40 ml nasičene raztopine amonijevega klorida, 2 x 40 ml destilirane vode in nato še z 20 ml nasičene raztopine natrijevega klorida. Dodatno smo jo posušili z natrijevim sulfatom. Dobljeno zmes smo prefiltrirali ter filtratu odparili topilo in dobili 918 mg etil 4-((tert-butoxycarbonyl)amino)benzoata (7).

##### Rezultati:

**Izgled:** rumeni kristali

**Izkoristek:** 81,5 % (918 mg)

**Rf:** 0,64 (MF: heksan/etil acetat : 1/1)

**T<sub>tališča</sub>:** 137-145 °C

**IR ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3323, 2968, 2937, 2359, 1716, 1698, 1609, 1597, 1530, 1512, 1479, 1457, 1414, 1390, 1363, 1338, 1315, 1284, 1234, 1181, 1157, 1128, 1107, 1051, 1018, 904, 879, 857, 828, 772, 763, 754, 692, 647, 634, 568, 552

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm]= 1,30 (t, 3H,  $J=7,2$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,48 (s, 9H, Boc), 4,26 (k, 2H,  $J=7,2$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 7,57 (d, 2H,  $J=8,8$  Hz, Ar-H), 7,85 (d, 2H,  $J=8,8$  Hz, Ar-H), 9,79 (s, 1H, -NH)

**MS (ESI):** 266,1 [M+H]<sup>+</sup>

**Mr (izračunana):** 265,30

**HR-MS:** 266,1398 (izračunana: 266,1392)

**Elementna sestava:** C<sub>14</sub>H<sub>19</sub>NO<sub>4</sub>

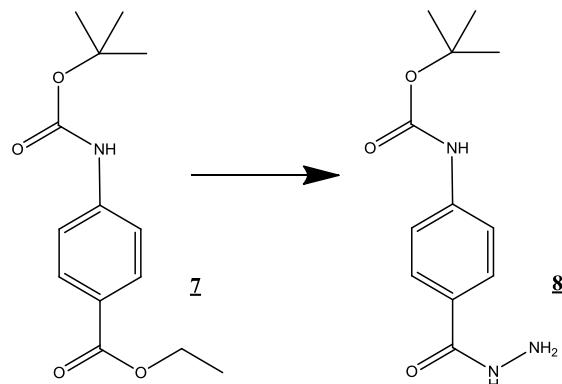
#### 4.3.2. SINTEZA

#### TERC-BUTIL

(4-

#### (HIDRAZINKARBONIL)FENIL)KARBAMATA (8)

##### Reakcija:



##### Postopek:

V 50 ml bučko smo natehtali 653 mg (2,46 mmol) etil 4-((*terc*-butoksikarbonil)amino)benzoata (**7**) in ga raztopili v 3 ml absolutnega etanola in 3 ml THF. Dodali smo še 3 ml hidrazin hidrata in reakcijsko zmes prenesli na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluksa (80 °C). Po 24 urah smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla, zato smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Produkt smo očistili s prekristalizacijo iz absolutnega etanola (6 ml). Po 1 uri v hladilniku so izpadli beli kristali, ki smo jih odfiltrirali z odsesavanjem. Produkt smo zbrali na petrijevki in ga posušili v sušilniku do konstantne mase pri temperaturi 50 °C ter dobili 494 mg *terc*-butil (4-(hidrazinkarbonil)fenil)karbamata (**8**).

##### Rezultati:

**Izgled:** beli kristali

**Izkoristek:** 79,9 % (494 mg)

**Rf:** 0,17 (MF: etil acetat)

**T<sub>tališča</sub>:** 178–182 °C

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3322, 2978, 2363, 1732, 1637, 1619, 1607, 1585, 1512, 1454, 1409, 1391, 1367, 1339, 1312, 1271, 1228, 1198, 1150, 1048, 1026, 1014, 953, 935, 902, 876, 857, 829, 773, 750, 730, 670, 642, 575, 560

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm]= 1,48 (s, 9H, Boc), 4,41 (s, 2H, -NH<sub>2</sub>), 7,48 – 7,50 (m, 2H, Ar-H), 7,72 – 7,74 (m, 2H, Ar-H), 9,59 – 9,60 (m, 2H, -NH-BOC; -NH-NH<sub>2</sub>).

**MS (ESI):** 252,1 [M+H]<sup>+</sup>

**Mr (izračunana):** 251,28

**HR-MS:** 252,1343 (izračunana: 252,1348)

**Elementna sestava:** C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>

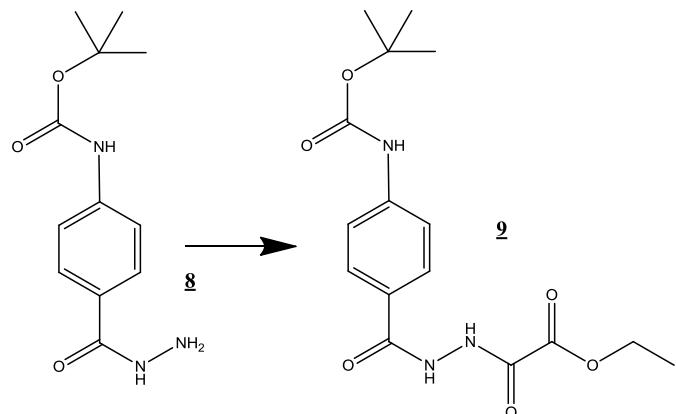
### 4.3.3. SINTEZA

ETIL

2-(2-(4-((TERC-

### BUTOXIKARBONIL)AMINO)BENZOIL)HIDRAZINIL)-2-OKSOACETATA (9)

#### Reakcija:



#### Postopek:

V 100 ml bučko smo natehtali 328 mg (1,31 mmol) *terc*-butil (4-(hidrazinkarbonil)fenil)karbamata (**8**) ter ga raztopili v 30 ml THF. Dodali smo 125 mg (1,49 mmol) natrijevega hidrogenkarbonata in reakcijsko zmes mešali 15 minut na ledeni kopeli pri 0 °C. V penicilinki smo razredčili 145 µl (1,31 mmol) etil oksalil klorida v 2 ml THF. Dobljeno raztopino smo 5 minut dokapavali v reakcijsko zmes na ledeni kopeli in nato reakcijsko zmes čez noč mešali na sobni temperaturi. Po 24 urah smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla, zato smo reakcijsko zmes prefiltrirali, filter papir pa še dodatno sprali z dietil etrom. Filtratu smo pod znižanim tlakom odparili topilo, v naslednji reakciji pa smo uporabili ves dobljeni produkt.

#### Rezultati:

**Izgled:** beli kristali

**Teoretični izkoristek:** 100% (459 mg)

**Rf:** 0,56 (MF: etil acetat)

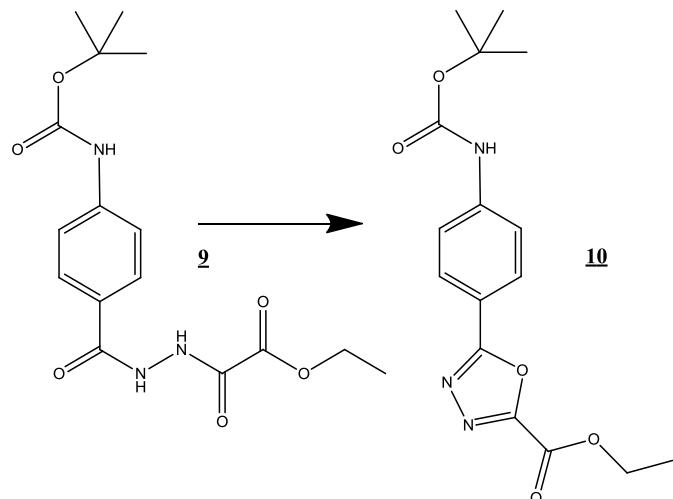
#### 4.3.4. SINTEZA

ETIL

5-(4-((TERC-

#### BUTOJSIKARBONIL)AMINO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILATA (10)

##### Reakcija:



##### Postopek:

Za to reakcijo smo uporabili ves produkt predhodne reakcije s predpostavko, da je bil izkoristek 100%. 459 mg (1,31 mmol) etil 2-(2-((tert-butoxikarbonil)amino)benzoil)hidrazinil)-2-oksoacetata (**9**) smo v 25 ml bučki raztopili v 3 ml THF. Dodali smo 1 ml tetraklorometana in 527 µl (3,78 mmol) trietilamina. V drugo, 50 ml bučko smo natehtali 418 mg (1,59 mmol) trifenilfosfina ter ga raztopili v 6 ml diklorometana. Zmes iz prvotne bučke smo v 5 delih prenesli v drugo bučko. Dobljeno reakcijsko zmes smo 30 minut mešali na sobni temperaturi, nato pa prenesli na oljno kopel ter segrevali pri temperaturi refluksa (80 °C). Po 24 urah smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla, zato smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Ostanek smo raztopili v etil acetatu, malo heksana in v nekaj kapljicah acetona. Rjave kristale, ki se niso raztopili smo odsesavali z odsesavanjem, matičnico pa smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: heksan/etil acetat : 3/2)

##### Rezultati:

**Izgled:** beli kristali

**Izkoristek:** 50,7 % (221 mg)

**Rf:** 0,41 (MF: heksan/etil acetat : 3/2)

**T<sub>tališča</sub>:** 161-166 °C

**IR ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3369, 2979, 1725, 1613, 1595, 1525, 1490, 1416, 1386, 1370, 1314, 1268, 1230, 1195, 1182, 1149, 1095, 1054, 1018, 976, 898, 845, 832, 770, 756, 739, 705, 655, 641, 588, 576, 561

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm]= 1,36 (t, 3H,  $J=7,2$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 1,50 (s, 9H, Boc), 4,44 (k, 2H,  $J=7,2$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 7,69 - 7,72 (m, 2H, Ar-H), 7,95 - 7,98 (m, 2H, Ar-H), 9,90 (s, 1H, -NH)

**MS (ESI):** 334,1 [M+H]<sup>+</sup>

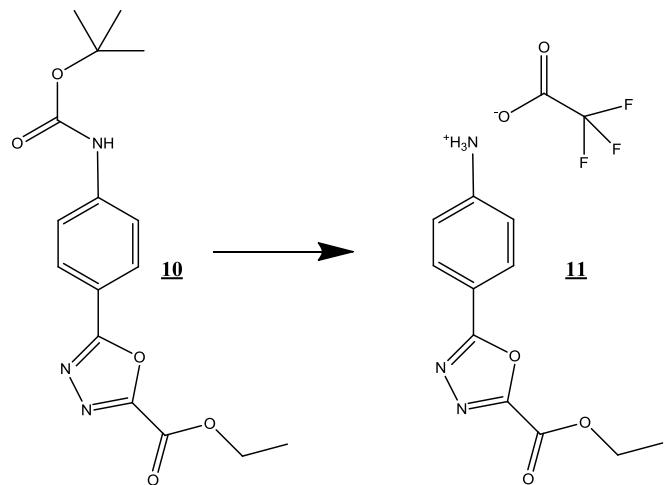
**Mr (izračunana):** 333,34

**HR-MS:** 334,1404 (izračunana: 334,1403)

**Elementna sestava:** C<sub>16</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

#### 4.3.5. SINTEZA 4-(5-(ETOKSIKARBONIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-IL)BENZENAMINIJEVEGA TRIFLUOROACETATA (11)

**Reakcija:**



**Postopek:**

V 25 ml bučko smo natehtali 51 mg (0,153 mmol) etil 5-((tert-butoksikarbonil)amino)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-karboksilata (**10**) ter ga raztopili v 3 ml diklorometana. Reakcijsko zmes smo mešali na ledeni kopeli pri 0 °C in dodali 0,5 ml trifluoroocetne kisline. Po dodatku smo ledeno kopel odstranili in reakcijo nadaljevali na sobni temperaturi. Po 90 minutah smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla, zato smo pod znižanim tlakom odparili topilo. V bučko smo dodali 2 kapalki (približno 4 ml) dietil etra, temeljito premešali ter popraskali oborino s sten bučke ter nazadnje topilo odparili. Postopek smo ponovili še trikrat. Dobljen produkt smo nato takoj uporabili za naslednjo reakcijo.

**Rezultati:**

**Izgled:** rumeni kristali

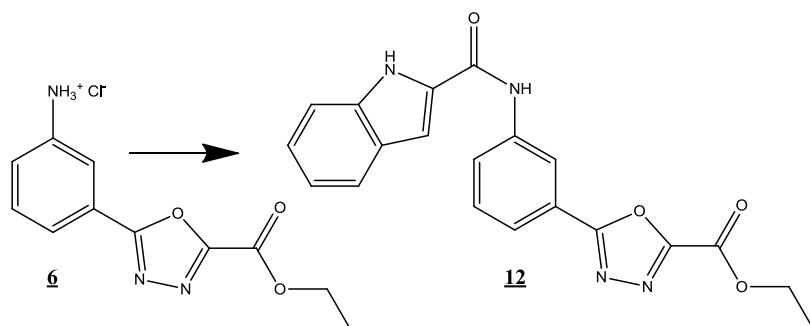
**Teoretični Izkoristek:** 100 % (53 mg)

**Rf:** 0,21 (MF: heksan/etyl acetat : 1/1)

#### 4.4. SINTEZA 5-(3-(1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (13)

##### 4.4.1. SINTEZA ETIL 5-(3-(1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILATA (12)

**Reakcija:**



**Postopek:**

V 10 ml bučko smo natehtali 60 mg (0,371 mmol) indol-2-karboksilne kisline ter jo raztopili v 3 ml diklorometana. Dodali smo 204 µl (1,855 mmol) NMM ter 131 mg (0,408 mmol) TBTU. Reakcijsko zmes smo 45 minut mešali na sobni temperaturi, nato pa dodali še 100 mg (0,371 mmol) 3-(5-(etoksikarbonil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)benzenaminijevega klorida (**6**) ter nekaj kristalov DMAP. Reakcijo smo 24 ur pustili na sobni temperaturi, nato pa še 24 ur na oljni kopeli pri temperaturi refluksa (40 °C). Po 48 urah smo reakcijo prekinili ter reakcijski zmesi odparili topilo. Ostanek smo raztopili v 30 ml diklorometana ter izvedli ekstrakcijo z naslednjimi raztopinami: 2 x 10 ml 1M HCl, 10 ml destilirane vode, 2 x 10 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in 10 ml nasičene raztopine natrijevega klorida. Organsko fazo smo dodatno posušili z natrijevim sulfatom. Dobljeno zmes smo prefiltrirali ter filtratu odparili topilo. V bučko smo dodali 3 ml acetona, premešali, zamašili ter ohladili v hladilniku. Izpadlo oborino smo nato odfiltrirali z odsesavanjem in dobljene kristale posušili v sušilniku pri 60 °C.

**Rezultati:**

**Izgled:** rumeni kristali

**Izkoristek:** 39,4 % (55 mg)

**Rf:** 0,40 (MF: heksan/etyl acetat : 1/1)

**T<sub>tališča</sub>:** 225 - 230 °C

**IR ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3348, 3311, 3123, 3060, 2985, 1749, 1698, 1677, 1650, 1603, 1557, 1530, 1492, 1475, 1455, 1404, 1383, 1365, 1352, 1316, 1289, 1229, 1203, 1167, 1103, 1082, 1028, 968, 899, 872, 861, 838, 824, 800, 767, 746, 729, 684, 641, 613, 571, 555

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm]= 1,39 (t, 3H,  $J=7,2$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4,48 (k, 2H,  $J=7,2$  Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 7,07 – 7,11 (m, 1H, Ar-H), 7,23 – 7,27 (m, 1H, Ar-H), 7,48 – 7,50 (m, 2H, Ar-H), 7,63 - 7,67 (m, 1H, Ar-H), 7,70 - 7,72 (m, 1H, Ar-H), 7,81 - 7,83 (m, 1H, Ar-H), 8,19 – 8,22 (m, 1H, Ar-H), 8,60 – 8,61 (m, 1H, Ar-H), 10,55 (s, 1H, -CO-NH-), 11,81 (s, 1H, indol-NH-)

**$^{13}\text{C-NMR}$ :**  $\delta$  [ppm]= 13,90, 62,91, 104,34, 112,42, 117,94, 120,00, 121,87, 121,90, 122,96, 123,72, 124,02, 126,96, 130,20, 130,98, 136,95, 140,10, 154,05, 156,51, 160,01, 165,29

**MS (ESI):** 377,1 [M+H]<sup>+</sup>

**Mr (izračunana):** 376,37

**HR-MS:** 377,1260 (izračunana: 377,1250)

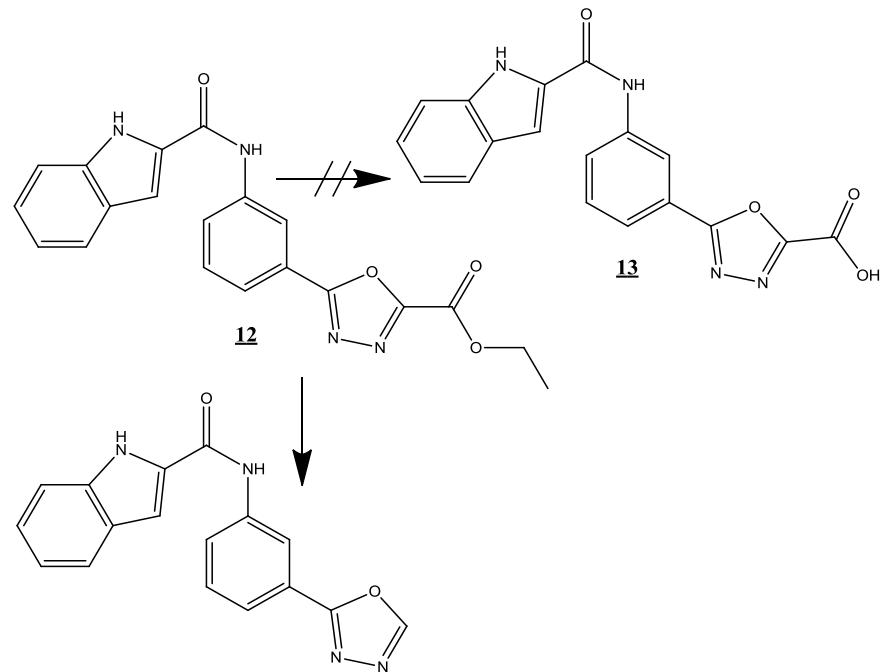
**Elementna sestava:** C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

**Elementna analiza za C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>:**

Izračunane vrednosti za C <sub>20</sub> H <sub>16</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> × 0,15 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Ugotovljene vrednosti
% C 62,20	% C 62,59
% H 4,22	% H 4,17
% N 14,40	% N 14,09

#### **4.4.2. SINTEZA 5-(3-(1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (13)**

## Reakcija:



**dejanski produkt:**  
***N*-(3-(1,3,4-oksadiazol-2-il)fenil)-1*H*-indol-2-karboksamid**

Postopek:

V 10 ml bučko smo natehtali 38 mg (0,101 mmol) etil 5-(3-(1H-indol-2-karboksamido)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-karboksilata (**12**) ter ga raztopili v 2 ml absolutnega etanola in 2 ml THF. Dodali smo 350 µl (0,7 mmol) 2M raztopine litijevega hidroksida. Reakcijsko zmes smo mešali na sobni temperaturi. Po 48 urah smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla, zato smo reakcijski zmesi odparili topilo. Ostanek smo raztopili v 10 ml destilirane vode in raztopino nakisali z 1M raztopino klorovodikove kisline do pH=1. Izpadel je sivkast gel, ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem, posušili ter shranili.

### **Rezultati:**

**Izgled:** sivi kristali

**Izkoristek:** 28,5% (10 mg)

**Rf:** 0,26 (MF: heksan/etil acetat : 1/1)

**T<sub>talíšča</sub>:** 238 - 243 °C

**IR ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3296, 2331, 2016, 1656, 1569, 1538, 1474, 1445, 1417, 1329, 1311, 1242, 1191, 1146, 1117, 1086, 961, 896, 872, 793, 731, 681, 638, 610, 602, 577, 565, 555

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):**  $\delta$  [ppm]= 7,09 (s, 1H, Ar-H), 7,24 (s, 1H, Ar-H), 7,49 - 7,50 (m, 2H, Ar-H), 7,62 - 7,64 (m, 1H, Ar-H), 7,69 - 7,71 (m, 1H, Ar-H), 7,75 - 7,77 (m, 1H, Ar-H), 8,12 (s, 1H, Ar-H), 8,59 (s, 1H, Ar-H), 9,38 (s, 1H, oksadiazol-H), 10,51 (s, 1H, -CO-NH-), 11,80 (s, 1H, indol-NH-)

**MS (ESI):** 303,1 [M-H]<sup>-</sup>

**Mr (izračunana):** 304,30

**HR-MS:** 303,0877 (izračunana: 303,0882)    **Elementna sestava:** C<sub>17</sub>H<sub>12</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

#### 4.5. SINTEZA

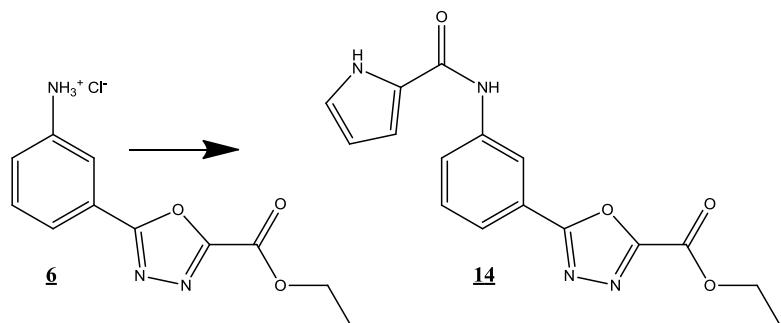
#### ETIL

#### 5-(3-(1H-PIROL-2-

#### KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-

#### KARBOKSILATA (**14**)

**Reakcija:**



**Postopek:**

V 10 ml bučko smo natehtali 41 mg (0,371 mmol) pirol-2-karboksilne kisline ter jo raztopili v 3 ml diklorometana. Dodali smo 204  $\mu\text{l}$  (1,855 mmol) NMM ter 131 mg (0,408 mmol) TBTU. Reakcijsko zmes smo 45 minut mešali na sobni temperaturi, nato pa dodali še 100 mg (0,371 mmol) 3-(5-(etoksikarbonil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)benzenaminijevega klorida (**6**) ter nekaj kristalov DMAP. Reakcijsko zmes smo 72 ur mešali na sobni temperaturi. S TLC smo zaznali, da je reakcija pretežno potekla, zato smo reakcijski zmesi odparili topilo. Ostanek smo raztopili v 30 ml diklorometana ter izvedli spiranje z naslednjimi raztopinami: 2 x 10 ml 1M HCl, 10 ml destilirane vode, 2 x 10 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in 10 ml nasičene raztopine natrijevega klorida. Organsko fazo smo dodatno posušili z natrijevim sulfatom. Dobljeno zmes smo prefiltrirali ter filtratu odparili topilo. Produkt smo brez uspeha poskusili očistiti s kolonsko kromatografijo. Uporabne frakcije smo zbrali v bučko, odparili topilo ter nalili 3 ml dietil etra. Bučko smo zamašili in ohladili v hladilniku. Izpadlo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in jo shranili. Produkt je zmes večih spojin, po NMR spektroskopiji smo sklepali, da gre za aktiviran ester pirol-2-karboksilne kisline.

**Rezultati:**

**Izgled:** rumeni kristali

**Izkoristek:** 62,0 % (75 mg) - nečisto

**Rf:** 0,45 (MF: heksan/etyl acetat : 1/1)

## 4.6. SINTEZA

5-(3-(5-FLUORO-1H-INDOL-2-

KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-

KARBOKSILNE KISLINE (16)

### 4.6.1. SINTEZA

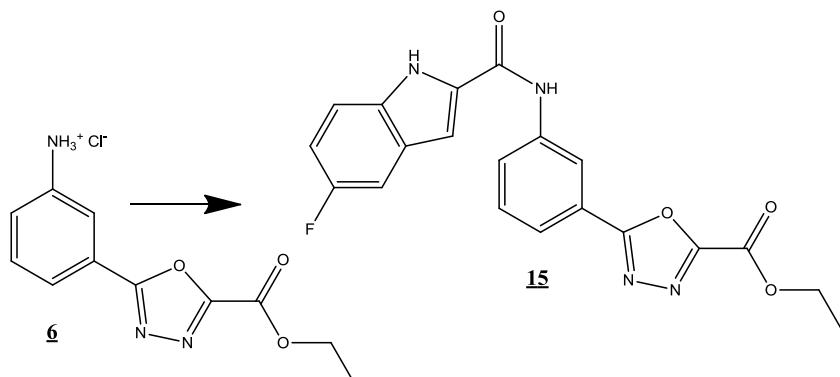
ETIL

5-(3-(5-FLUORO-1H-INDOL-2-

KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-

KARBOKSILATA (15)

Reakcija:



Postopek:

V 10 ml bučko smo natehtali 53 mg (0,297 mmol) 5-fluoroindol-2-karboksilne kisline ter jo raztopili v 3 ml diklorometana. Dodali smo 163 µl (1,485 mmol) NMM ter 105 mg (0,327 mmol) TBTU. Reakcijsko zmes smo 45 minut mešali na sobni temperaturi, nato pa dodali še 80 mg (0,297 mmol) 3-(5-(etoksikarbonil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)benzenaminijevega klorida (**6**) ter nekaj kristalov DMAP. Po 24 urah smo izpadlo oborino odfiltrirali z odsesavanjem. NMR spekter je pokazal, da je oborina aktiviran ester 5-fluoroindol-2-karboksilne kisline. Reakcijsko zmes smo prestavili na oljno kopel pri temperaturi refluksa (40 °C). Po skupno 48 urah smo reakcijski zmesi odparili topilo. Ostanek smo raztopili v 30 ml diklorometana ter izvedli spiranje z naslednjimi raztopinami: 2 x 10 ml 1M HCl, 10 ml destilirane vode, 2 x 10 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in 10 ml nasičene raztopine natrijevega klorida. Organsko fazo smo dodatno posušili z natrijevim sulfatom. Dobljeno zmes smo prefiltrirali ter filtratu odparili topilo. V bučko smo dodali 3 ml dietil etra ter zmes spraskali s sten bučke. Le-to smo zamašili in ohladili v hladilniku. Izpadlo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in jo posušili.

**Rezultati:**

**Izgled:** rumeni kristali

**Izkoristek:** 15,4 % (18 mg)

**Rf:** 0,48 (MF: heksan/etil acetat : 1/1)

**T<sub>tališča</sub>:** 235 - 243 °C

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3312, 2197, 1745, 1698, 1651, 1612, 1562, 1529, 1468, 1447, 1421, 1398, 1383, 1354, 1330, 1315, 1278, 1241, 1213, 1180, 1145, 1107, 1014, 966, 954, 906, 854, 842, 767, 777, 760, 729, 686, 641, 604, 587, 580, 575, 567

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm]= 1,39 (t, 3H, J=7,2 Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4,47 (k, 2H, J=7,2 Hz, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 7,09 – 7,14 (m, 1H, Ar-H), 7,46 – 7,53 (m, 3H, Ar-H), 7,64 – 7,68 (m, 1H, Ar-H), 7,82 – 7,84 (m, 1H, Ar-H), 8,18 – 8,21 (m, 1H, Ar-H), 8,59 – 8,60 (m, 1H, Ar-H), 10,59 (s, 1H, -CO-NH-), 11,93 (s, 1H, indol-NH-)

**<sup>13</sup>C-NMR:** δ [ppm]= 13,89, 30,66, 62,92, 104,29, 104,34, 105,86, 106,08, 112,69, 112,96, 113,62, 113,71, 118,00, 118,04, 122,04, 122,98, 123,82, 126,97, 127,07, 130,21, 132,68, 133,69, 139,99, 154,05, 156,08, 156,52, 158,40, 159,72, 165,28

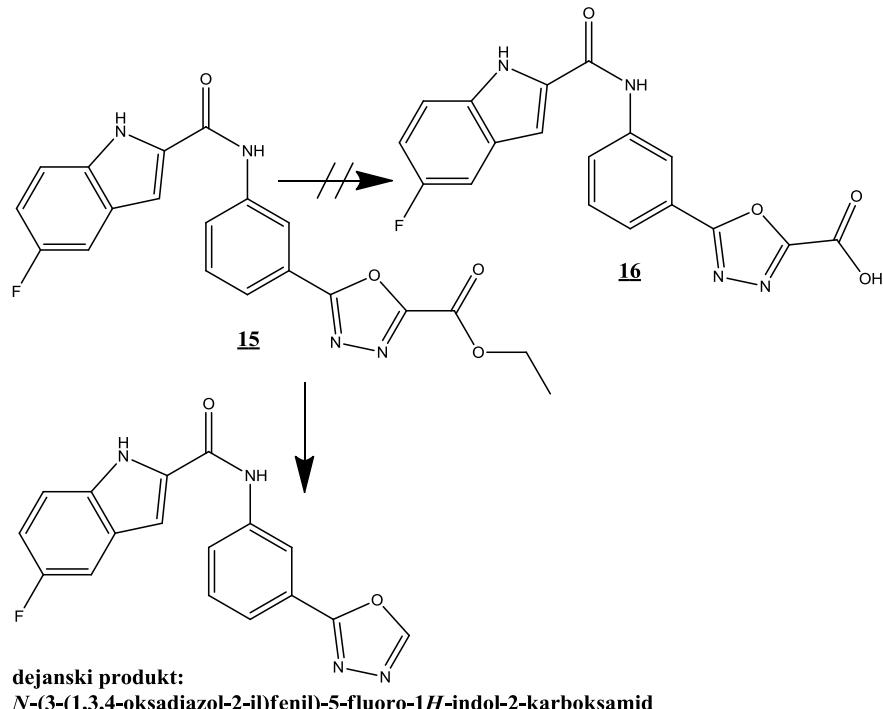
**MS (ESI):** 393,1 [M-H]<sup>-</sup>

**Mr (izračunana):** 394,36

**HR-MS:** 393,0997 (izračunana: 393,0999) **Elementna sestava:** C<sub>20</sub>H<sub>15</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

#### 4.6.2. SINTEZA 5-(3-(5-FLUORO-1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (16)

Reakcija:



Postopek:

V 10 ml bučko smo natehtali 13 mg (0,033 mmol) etil 5-(3-(5-fluoro-1*H*-indol-2-karboksamido)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-karboksilata (**15**) ter ga raztopili v 2 ml absolutnega etanola in 2 ml THF. Dodali smo 115 µl (0,231 mmol) 2M raztopine litijevega hidroksida. Reakcijsko zmes smo mešali na sobni temperaturi. Po 24 urah smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla, zato smo reakcijski zmesi odparili topilo. Ostanek smo raztopili v 10 ml destilirane vode in raztopino nakisali z 1M HCl do pH=1. Dobljeni zmesi smo temeljito odparili topilo ter ostanek raztopili v 2 ml absolutnega etanola. Izoborjene soli smo odfiltrirali z odsesavanjem, filtratu pa odparili topilo. Ostanek smo posušili in ga shranili v penicilinki.

Rezultati:

Izgled: rjavkasta pasta

Izkoristek: 57,9 % (7 mg)

Rf: 0,36 (MF: heksan/etil acetat : 1/1)

**T<sub>tališča</sub>:** ~250 °C (vzorec je higroskopen, se težko določi)

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3359, 1644, 1571, 1542, 1478, 1448, 1329, 1199, 1111, 954

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ [ppm]= 7,10 – 7,12 (m, 2H, Ar-H), 7,39 – 7,52 (m, 4H, Ar-H), 8,15 (m, 1H, Ar-H), 8,62 (m, 1H, Ar-H), 9,40 (m, 1H, oksadiazol-H-), 10,69 – 10,70 (m, 1H, -CO-NH-), 12,01 (s, 1H, indol-NH-)

**<sup>13</sup>C-NMR:** δ [ppm]= 105,31, 105,76, 105,99, 113,61, 113,70, 117,84, 121,65, 123,35, 123,45, 128,74, 129,90, 132,81, 133,57, 139,99, 154,62, 159,59, 163,64

**MS (ESI):** 321,1 [M-H]<sup>-</sup>

**Mr (izračunana):** 322,29

**HR-MS:** 321,0779 (izračunana: 321,0788)

**Elementna sestava:** C<sub>17</sub>H<sub>11</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

**4.7. SINTEZA**

**5-(3-(4,5-DIBROMO-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (18)**

-2-

**KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (18)**

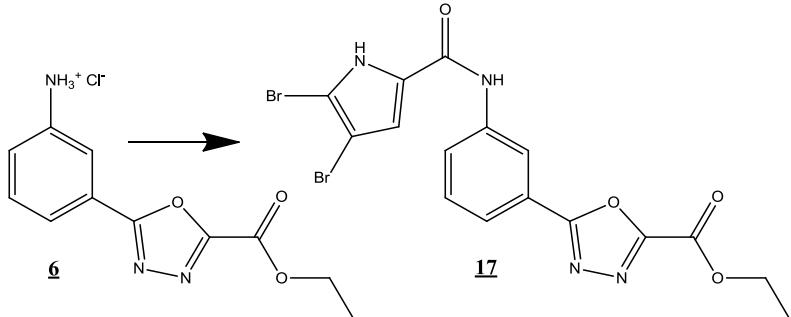
**4.7.1. SINTEZA**

**ETIL**

**5-(3-(4,5-DIBROMO-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILATA (17)**

**KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILATA (17)**

**Reakcija:**



**Postopek:**

V 10 ml bučko smo natehtali 100 mg (0,371 mmol) 4,5-dibromopirol-2-karboksilne kisline ter jo raztopili v 3 ml diklorometana. Dodali smo 204 µl (1,855 mmol) NMM ter 131 mg (0,408 mmol) TBTU. Reakcijsko zmes smo 45 minut mešali na sobni temperaturi, nato pa dodali še 100 mg (0,371 mmol) 3-(5-(etoksikarbonil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)benzenaminijevega klorida (**6**) ter nekaj kristalov DMAP. Po 48 urah smo izpadlo oborino odfiltrirali z odsesavanjem. NMR spekter je pokazal, da je oborina aktiviran ester 4,5-dibromopirol-2-karboksilne kisline. Matičnici smo nato odparili topilo, ostanek pa raztopili v 30 ml diklorometana ter izvedli spiranje z naslednjimi fazami: 2 x 10 ml 1M HCl, 10 ml destilirane vode, 2 x 10 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in 10 ml nasičene raztopine natrijevega klorida. Organsko fazo smo dodatno posušili z natrijevim sulfatom. Dobljeno zmes smo prefiltrirali ter filtratu odparili topilo. V bučko smo nalili 3 ml dietil etra ter zmes spraskali s sten bučke. Le-to smo zamašili in ohladili v hladilniku. Izpadlo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem in jo shranili. Spojina je tudi po ekstrakciji ostala nečista, zato smo kar s celotno količino šli v naslednjo stopnjo.

**Rezultati:**

**Izgled:** rjavo-rumeni kristali

**Izkoristek:** 11,7 % (21 mg)

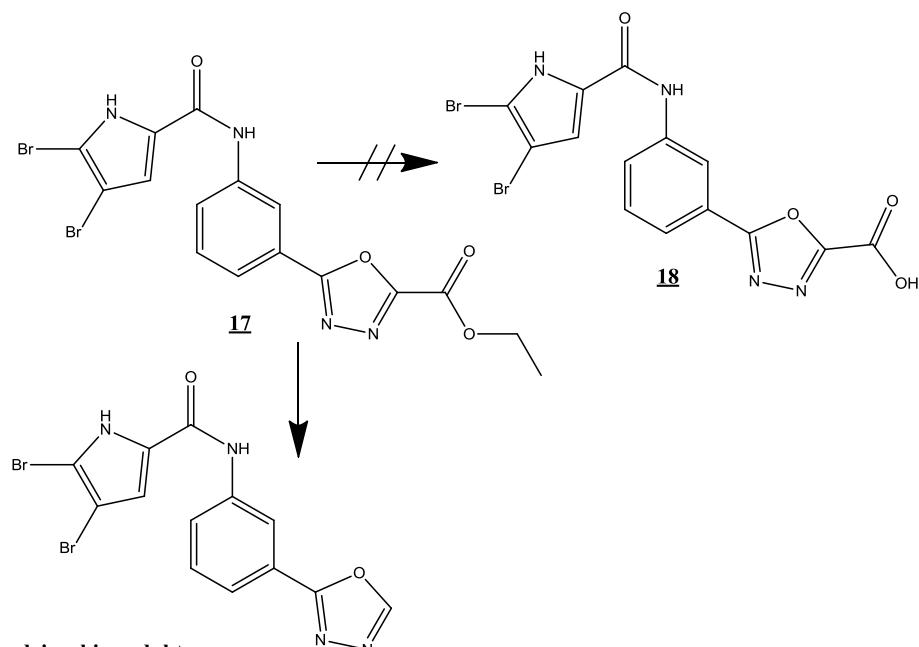
**Rf:** 0,45 (MF: heksan/etil acetat : 1/1)

**<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** 1,40 (t, 3H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 4,40 – 4,49 (k, 2H, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>), 7,29 – 7,30 (s, 1H, Ar-H), 7,60 – 7,64 (m, 1H, Ar-H), 7,72 – 7,74 (m, 1H, Ar-H), 8,08 – 8,11 (m, 1H, Ar-H), 8,48 – 8,49 (m, 1H, Ar-H), 10,17 (s, 1H, -CO-NH-), 13,00 (s, 1H, pirol-NH-)

#### 4.7.2. SINTEZA

#### 5-(3-(4,5-DIBROMO-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILNE KISLINE (18)

Reakcija:



dejanski produkt:

*N*-(3-(1,3,4-oxadiazol-2-il)fenil)-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamid

Postopek:

V 10 ml bučko smo natehtali 21 mg (0,043 mmol) surovega etil 5-(3-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-karboksilata (**17**) ter ga raztopili v 1,5 ml absolutnega etanola. Dodali smo 200 µl (0,4 mmol) 2M raztopine litijevega hidroksida. Reakcijsko zmes smo mešali na sobni temperaturi. Po 24 urah smo reakcijo ustavili, ker smo s TLC zaznali, da je potekla. Reakcijski zmesi smo dodali 3 ml destilirane vode ter jo ekstrahirali z 2 ml dietil etra, da smo se znebili nečistot od prejšnje stopnje. Vodno fazo smo nato nakisali s 6M raztopino klorovodikove kisline do pH=1, izpadlo oborino pa odfiltrirali z odsesavanjem in jo posušili.

Rezultati:

**Izgled:** rjavo-črni kristali

**Izkoristek:** 35,4% (7 mg)

**Rf:** 0,36 (MF: heksan/etil acetat : 1/1)

**T<sub>tališča</sub>:** 260-262 °C

Aleš Svete: *Načrtovanje in sinteza potencialnih zaviralcev giraze z 1,3,4-oksadiazolnim ogrodjem*

---

**IR ( $\text{cm}^{-1}$ ):** 3205, 2360, 2342, 1651, 1566, 1523, 1478, 1410, 1389, 1336, 1227, 1181, 1105, 1083, 975, 794, 746, 729, 679, 669, 638, 613, 595, 586, 567

**$^1\text{H-NMR}$  (400 MHz, DMSO- $\text{d}_6$ ):**  $\delta$  [ppm]= 7,30 (s, 1H, Ar-H), 7,57 – 7,61 (m, 1H, Ar-H), 7,73 (m, 1H, Ar-H), 8,00 – 8,02 (m, 1H, Ar-H), 8,49 (m, 1H, Ar-H), 9,37 (s, 1H, oksadiazol-H), 10,16 (s, 1H, -CO-NH-), 13,00 – 13,01 (s, 1H, pirol-NH-)

**$^{13}\text{C-NMR}$ :**  $\delta$  [ppm]= 90,33, 100,29, 102,97, 113,53, 115,50, 116,75, 117,52, 121,47, 123,77, 125,59, 130,03, 157,46, 157,50, 164,94, 165,01

**MS (ESI):** 408,9 [M-H]<sup>-</sup>

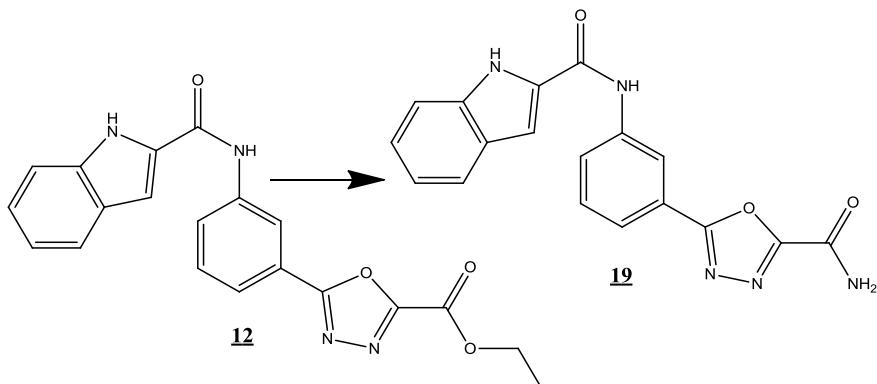
**Mr (izračunana):** 409,90

**HR-MS:** 408,8938 (izračunana: 408,8936)

**Elementna sestava:** C<sub>13</sub>H<sub>8</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

#### 4.8. SINTEZA 5-(3-(1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSAMIDA (19)

Reakcija:



Postopek:

V 10 ml bučko smo natehtali 30 mg (0,080 mmol) etil 5-(3-(1*H*-indol-2-karboksamido)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-karboksilata (**12**), ga raztopili v 3 ml absolutnega etanola in ohladili na 0 °C na ledeni kopeli. Raztopino smo nato 15 minut prepihovali s plinastim amonijakom. Reakcijsko zmes smo mešali na sobni temperaturi. Po 24 urah smo s TLC zaznali, da je reakcija potekla, zato smo reakcijski zmesi odparili topilo, ostanek pa posušili in dobili 26 mg 5-(3-(1*H*-indol-2-karboksamido)fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-karboksamida (**19**).

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 93,6% (26 mg)

Rf: 0,26 (MF: heksan/etil acetat : 1/1)

T<sub>tališča</sub>: 263-268 °C

IR (cm<sup>-1</sup>): 3307, 3193, 2926, 2359, 2162, 1987, 1957, 1702, 1651, 1597, 1565, 1531, 1419, 1341, 1312, 1279, 1238, 1190, 1145, 1105, 1079, 999, 885, 852, 793, 740, 707, 677, 623, 616, 601, 591, 574, 561, 553

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ [ppm] = 7,07 - 7,11 (m, 1H, Ar-H), 7,23 - 7,27 (m, 1H, Ar-H), 7,48 - 7,50 (m, 2H, Ar-H), 7,62 - 7,66 (m, 1H, Ar-H), 7,70 - 7,72 (m, 1H, Ar-H), 7,81 - 7,83 (m, 1H, Ar-H), 8,16 - 8,19 (m, 1H, Ar-H), 8,28 (s, 1H, oksadiazol-CO-N-H), 8,61 (s, 1H, Ar-H), 8,71 (s, 1H, oksadiazol-CO-N-H), 10,54 (s, 1H, -CO-NH-), 11,81 (s, 1H, indol-NH-)

Aleš Svete: *Načrtovanje in sinteza potencialnih zaviralcev giraze z 1,3,4-oksadiazolnim ogrodjem*

---

**<sup>13</sup>C-NMR:** δ [ppm]= 104,30, 112,42, 118,00, 120,01, 121,87, 123,25, 124,01, 126,97, 130,10, 131,01, 136,94, 139,99, 153,41, 154,54, 158,62, 159,98, 165,00, 167,33

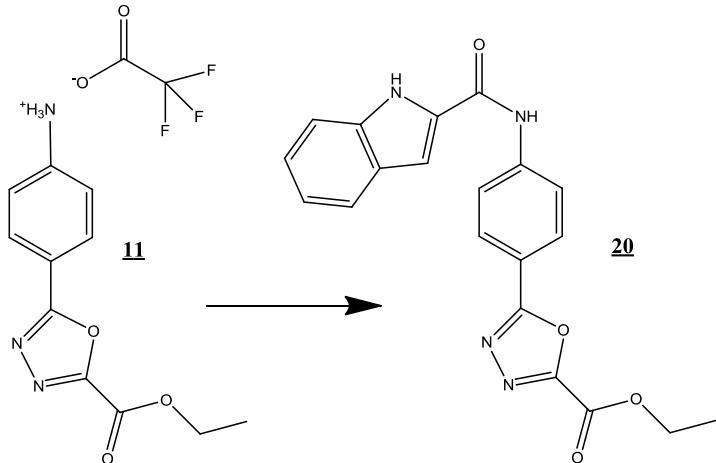
**MS (ESI):** 346,1 [M-H]<sup>-</sup>

**Mr (izračunana):** 347,33

**HR-MS:** 346,0949 (izračunana: 346,0940) **Elementna sestava:** C<sub>18</sub>H<sub>13</sub>N<sub>5</sub>O<sub>4</sub>

**4.9. SINTEZA ETIL KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILATA (20)**

**Reakcija:**



**Postopek:**

V 10 ml bučko smo natehtali 25 mg (0,153 mmol) indol-2-karboksilne kisline ter jo raztopili v 3 ml diklorometana. Dodali smo 51 µl (464 µmol) NMM ter 54 mg (0,168 mmol) TBTU. Reakcijsko zmes smo 1 uro mešali na sobni temperaturi. Vzporedno smo pripravili penicilinko s 53 mg (0,153 mmol) 4-(5-(etoksikarbonil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)benzenaminijevega trifluoroacetata (**11**), ki smo ga raztopili v 1 ml diklorometana ter 34 µl (309 µmol) NMM. Dobljeno zmes smo prenesli v prvotno bučko ter dodali nekaj kristalov DMAP. Po 24 urah smo reakcijo prekinili ter reakcijski zmesi odparili topilo. Ostanek smo raztopili v 20 ml diklorometana ter izvedli ekstrakcijo z naslednjimi fazami: 2x 10 ml 1M raztopine klorovodikove kisline, 10 ml destilirane vode, 2x 10 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in 10 ml nasičene raztopine natrijevega klorida. Organsko fazo smo dodatno posušili z natrijevim sulfatom. Dobljeno zmes smo prefiltrirali ter filtratu odparili topilo. V bučko smo nalili 3 ml dietil etra, premešali, zamašili ter ohladili v hladilniku. Izpadlo oborino smo nato odfiltrirali z odsesavanjem in dobili 55 mg nečiste zmesi, ki je v sledovih vsebovala tudi želeni produkt **20**.

**Rezultati:**

**Izgled:** rumeni kristali

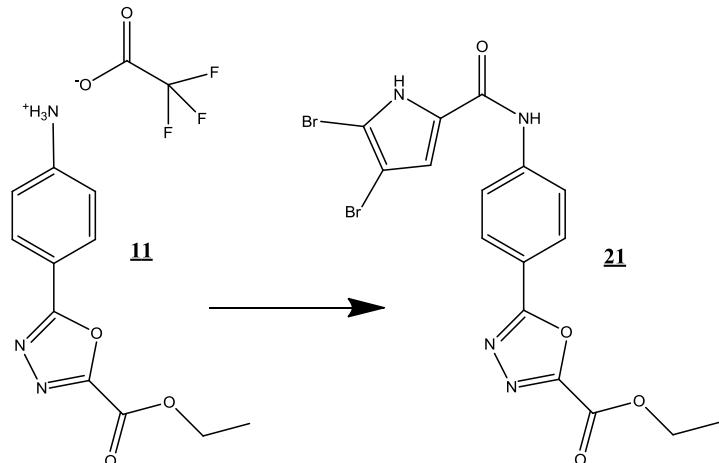
**MS (ESI):** 375,1 [M-H]<sup>-</sup>

**Mr (izračunana):** 376,37

**HR-MS:** 375,1099 (izračunana: 375,1093) **Elementna sestava:** C<sub>20</sub>H<sub>16</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

**4.10. SINTEZA ETIL 5-(4-(4,5-DIBROMO-1H-PIROL-2-KARBOKSAMIDO)FENIL)-1,3,4-OKSADIAZOL-2-KARBOKSILATA (21)**

**Reakcija:**



**Postopek:**

V 10 ml bučko smo natehtali 40 mg (0,147 mmol) 4,5-dibromopirol-2-karboksilne kisline ter jo raztopili v 3 ml diklorometana in 0,5 ml DMF. Dodali smo 49 µl (446 µmol) NMM ter 52 mg (0,162 mmol) TBTU. Reakcijsko zmes smo 1 uro mešali na sobni temperaturi. Vzperedno smo pripravili penicilinko z 49 mg (0,147 mmol) 4-(5-(etoksikarbonil)-1,3,4-oksadiazol-2-il)benzenaminijevega trifluoroacetata (**11**), ki smo ga raztopili v 1 ml diklorometana ter 33 µl (300 µmol) NMM. Dobljeno zmes smo prenesli v prvotno bučko ter dodali nekaj kristalov DMAP. Reakcijsko zmes smo najprej 24 ur mešali na sobni temperaturi, nato pa prestavili na oljno kopel pri temperaturi refluksa (40 °C). Po skupno 96 urah smo reakcijo prekinili ter reakcijski zmesi odparili topilo. Ostanek smo raztopili v 20 ml diklorometana ter izvedli ekstrakcijo z naslednjimi fazami: 2x 10 ml 1M raztopine klorovodikove kisline, 10 ml destilirane vode, 2x 10 ml nasičene raztopine natrijevega hidrogenkarbonata in 10 ml nasičene raztopine natrijevega klorida. Organsko fazo smo dodatno posušili z natrijevim sulfatom. Dobljeno zmes smo prefiltrirali, filtratu odparili topilo ter dobili nečisto zmes, ki je v sledovih vsebovala tudi želeni produkt **21**.

**Rezultati:**

**Izgled:** rumeni kristali

**MS (ESI):** 480,9 [M-H]<sup>-</sup>

**Mr (izračunana):** 484,10

**HR-MS:** 480,9136 (izračunana: 480,9147) **Elementna sestava:** C<sub>16</sub>H<sub>12</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1. SINTEZNI POSTOPKI

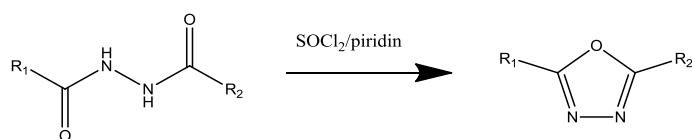
Na kratko bomo predstavili problematiko nekaterih ključnih sinteznih postopkov, ki smo jih uporabili tekom eksperimentalnega dela.

#### 5.1.1. SINTEZA 1,3,4-OKSADIAZOLNEGA OBROČA

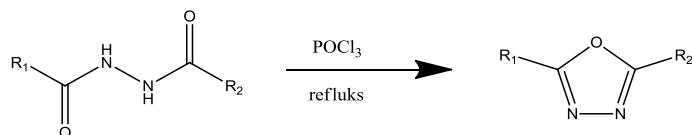
Sinteza 1,3,4-oksadiazolov največkrat vključuje ciklizacijo diacilhidrazinov v prisotnosti brezvodnega reagenta (npr. tionični klorid, fosforični klorid, fosforjevi pentoksid, trifenilfosfin) in pod vplivom segrevanja. Dokaj pogost postopek je tudi oksidacija acilhidrazonov. 1,3,4-oksadiazole lahko sintetiziramo tudi direktno iz hidrazidov, brez vmesne stopnje diacilhidrazina (40, 41, 42).

Primeri sintez 1,3,4-oksadiazolov iz diacilhidrazinov (43):

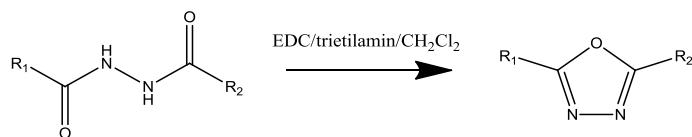
- reakcija diacilhidrazina s tioničnim kloridom v piridinu:



- reakcija diacilhidrazina s fosforičnim kloridom:



- ciklizacija diacilhidrazina z EDC in trietilaminom v diklorometanu:

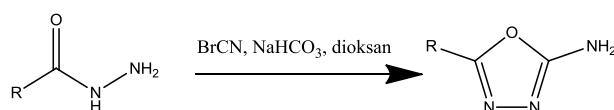


Primeri sintez 1,3,4-oksadiazolov iz hidrazidov (41, 42, 43):

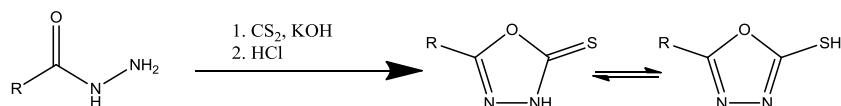
- reakcija hidrazida in karboksilne kisline s CDI, trifenilfosfinom, tetrabromometanom v diklorometanu:



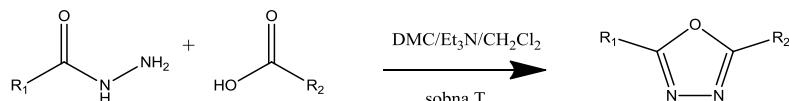
- reakcija hidrazida s cianogen bromidom in natrijevim hidrogenkarbonatom v dioksanu:



- reakcija hidrazida z ogljikovim disulfidom, KOH in klorovodikovo kislino:

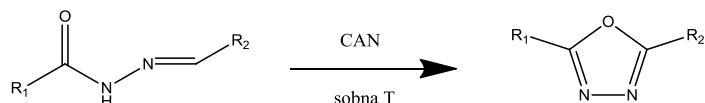


- reakcija hidrazida in karboksilne kisline z 2-kloro-1,3-dimetilimidazolinijev kloridom (DMC) in trietilaminov v diklorometanu:

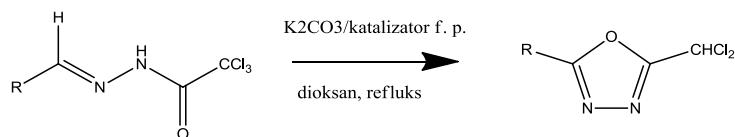


Primeri sintez 1,3,4-oksadiazolov preko oksidacije acilhidazonov (42):

- oksidacija acilhidazona s cerijevim amonijevim nitratom pri sobni T:

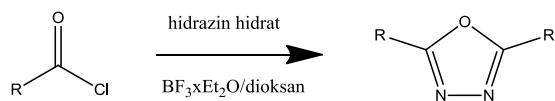


- oksidacija acilhidazona triklorooacetne kisline s kalijevim karbonatom v prisotnosti katalizatorja faznega prehoda v dioksanu:

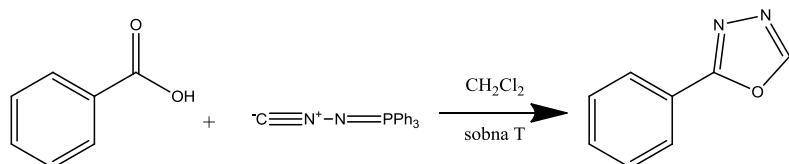


Ostali primeri sintez 1,3,4-oksadiazolov (42):

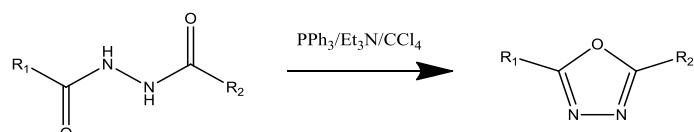
- tvorba simetričnih derivatov 1,3,4-oksadiazolov z reakcijo kislinskega klorida s hidrazin hidratom in sledečo ciklizacijo nastalega diacilhidrazina z  $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$  v dioksanu



- reakcija derivata benzojske kisline z (*N*-izocianimino)trifenilfosforanom v diklorometanu pri sobni temperaturi:



V diplomskem delu smo se za tvorjenje 1,3,4-oksadiazolnega obroča odločili za Appelovo dehidracijsko reakcijo (*Appel's dehydration condition*), ker gre za poceni, lahko obvladljivo in stabilno reakcijo (40). Ključno je, da reakcija poteka v bazičnih pogojih, saj je amin na naši izhodni spojini zaščiten z Boc zaščitno skupino, ki pa je nestabilna v kislih pogojih. Ustrezen diacilhidrazin reagira s trifenilfosfinom in tetraklorometanom v prisotnosti baze (v našem primeru je to trietilamin), kar vodi do ciklizacije, kot produkt pa nastane omenjeni obroč (44).

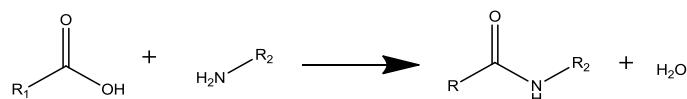


Slika 23: Sinteza 1,3,4-oksadiazolov prek Appelove dehidracijske reakcije

### 5.1.2. SINTEZA AMIDOV

Amidi so dokaj pogosta funkcionalna skupina v naravnih in tudi v sintetičnih spojinah. Amidna oziroma peptidna vez je ključen del beljakovin, amidne funkcionalne skupine pa so prisotne v več kot četrtini vseh do sedaj poznanih učinkovin (45).

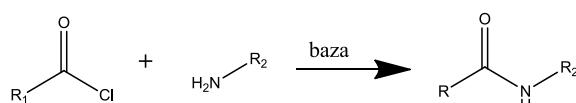
Najbolj osnovna tvorba amida je reakcija med karboksilno kislino in aminom.



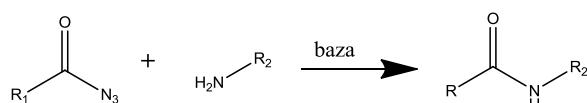
Slika 24: Tvorba amida iz karboksilne kisline in amina

Problem nastane, ko imamo manj reaktivne reagente, takrat pa se poslužujemo reakcij s takšnimi ali drugačnimi aktivatorji. Najpogosteje se uporablja različne derivate karboksilnih kislin, ki so reaktivnejši od osnovne kisline. Primeri (45):

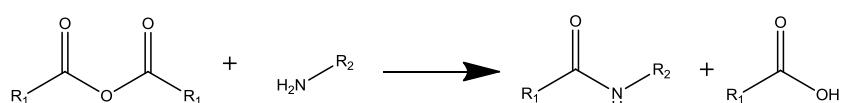
- reakcija amina in acil halida v prisotnosti baze:



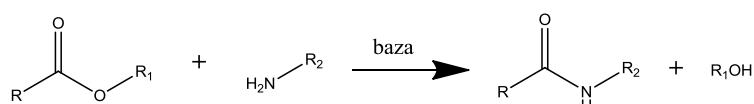
- reakcija amina in acil azida v prisotnosti baze:



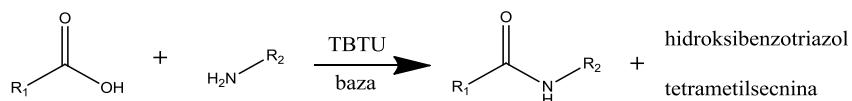
- reakcija amina in anhidrida (simetričnega ali nesimetričnega):



- reakcija amina in aktiviranega estra

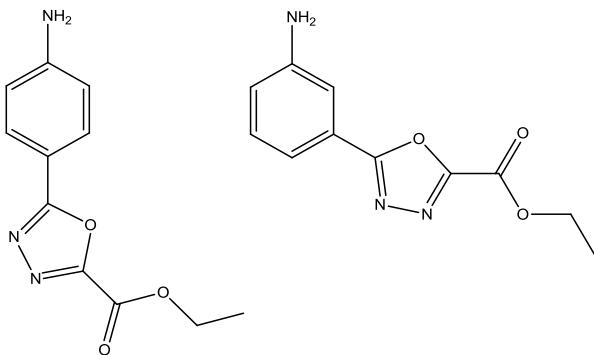


- reakcija amina in s sklopitvenim reagentom aktivirane kisline:



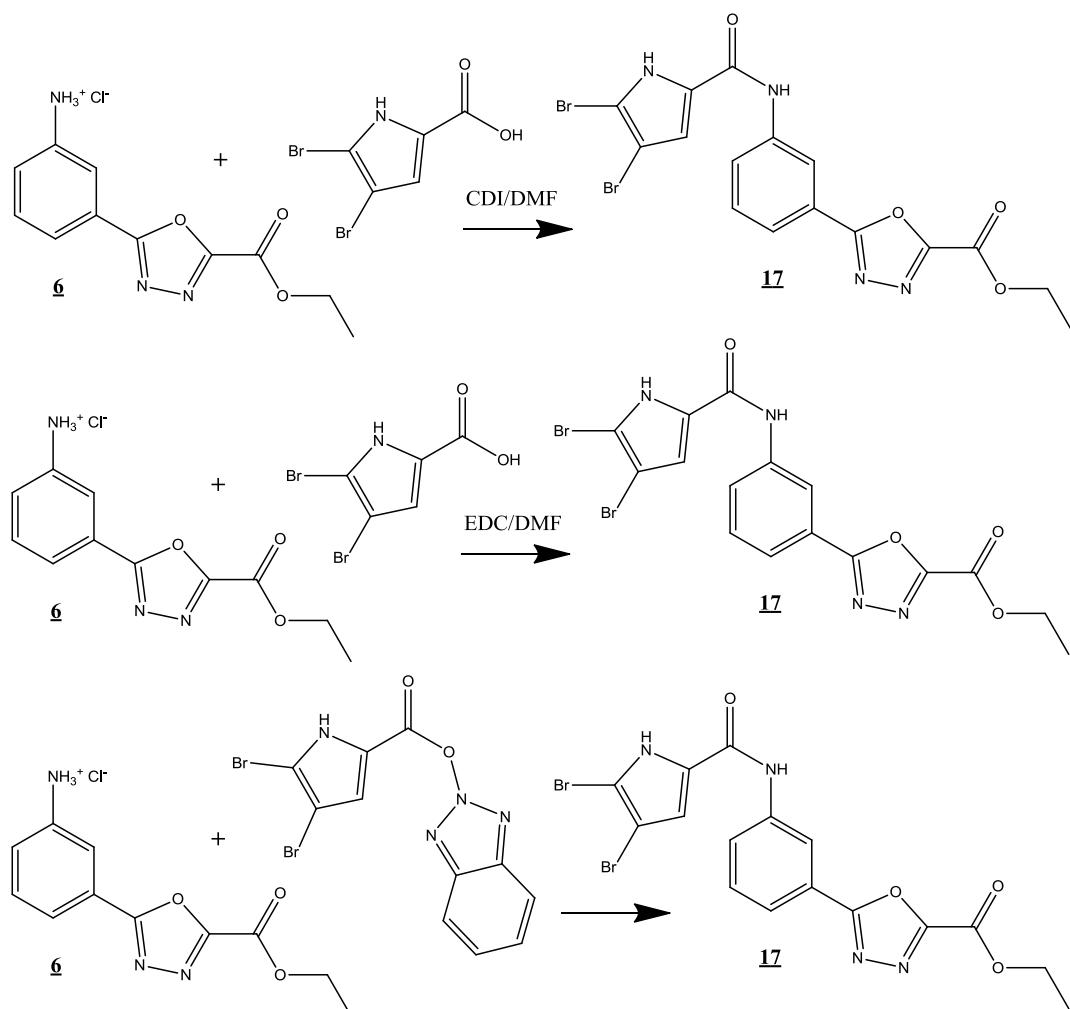
V diplomskem delu smo se pri reakciji tvorbe amida odločili za uporabo sklopitvenega reagenta TBTU. Prednost tega postopka je preprosta priprava in pa tako imenovana "one-pot" sinteza, kjer se *in situ* tvori aktivirana oblika kisline, ki potem reagira z aminom.

Velik problem je bila slaba reaktivnost aminov (prikazanih na Sliki 25) po pretvorbi iz kloridne oziroma trifluoroacetatne soli, najverjetneje zaradi prevelikega elektronoprivlačnega učinka 1,3,4-oksadiazolnega obroča, ki pa je še bolj izrazit pri para derivatu.



Slika 25: para in meta oblika aromatskega amina

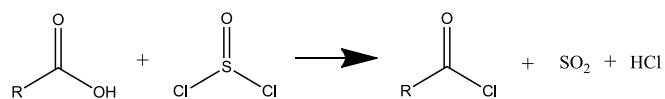
Spojino **17**, predzadnjo stopnjo najbolj obetajoče spojine, smo zaradi slabega izkoristka sinteze s TBTU poskusili sintetizirati še na tri dodatne načine. Najprej smo izbrali način z aktivacijo 4,5-dibromopirol-2-karboksilne kisline s CDI ter raztopljanjem v DMF. Drugi način je bila uporaba 2H-benzo[d][1,2,3]triazol-2-il-4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksilata, aktivirane oblike 4,5-dibromopirol-2-karboksilne kisline. Aktivirano kislino smo raztopili v DMF ter ji dodali 1 ekvivalent spojine **6**, raztopljene v THF. Tretji način je bil podoben prvemu, le da smo namesto CDI uporabili EDC. Pri vseh treh sintezah (prikazanih na Sliki 26) smo sicer zaznali novo nastale lise po TLC analizi, a je bil produkt nečist, njegova količina pa premajhna za uspešno izolacijo.



Slika 26: alternativne sinteze spojine 17

Posledično je slaba reaktivnost aminov vodila v zelo nizek izkoristek, zato smo dobili le majhne količine spojin za zadnjo stopnjo hidrolize estra. Izkazalo se je, da so para substituirani analogi še posebej slabo reaktivni. Poskusili smo pripraviti amide, vendar so bili produkti reakcij vedno nečisti in pa v zelo majhnih količinah. Po analizi spojin **20** in **21** z masno spektroskopijo smo ugotovili, da sta spojini sicer nastali, vendar le v sledovih. Zaradi slabe reaktivnosti para analogov smo opustili nadaljnje reakcije.

Za doseganje višjega izkoristka reakcij bi lahko posegli po aktivnejših derivatih karboksilnih kislin. Najbolj aktivni so kislinski kloridi (primer pretvorbe karboksilne kisline v kislinski klorid je prikazan na Sliki 27), lahko pa bi poskusili tudi z aktivacijo kisline v obliki mešanega anhidrida ali pa acil azida.



Slika 27: aktivacija karboksilne kisline preko tvorbe kislinskega klorida s tionil kloridom

Pri reakcijah spojine 6 s pirol-2-karboksilno kislino, 5-fluoroindol-2-karboksilno kislino ter 4,5-dibromopirol-2-karboksilno kislino so nastale oborine, za katere se je kasneje izkazalo, da so izoborjene aktivirane oblike kislin. Natančneje gre za 2H-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il-1*H*-pirol-2-karboksilat, 2H-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il-5-fluoro-1*H*-indol-2-karboksilat ter 2H-benzo[*d*][1,2,3]triazol-2-il-4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksilat. Aktiviranim oblikam smo s segrevanjem poskusili zvišati reaktivnost a se je izkazalo, da so preveč stabilne.

**Analizni podatki aktiviranih kislin:**

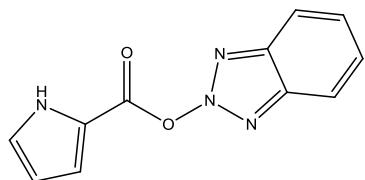
**2H-BENZO[D][1,2,3]TRIAZOL-2-IL-1H-PIROL-2-KARBOKSILAT**

**T<sub>tališča</sub>:** 156 - 240 °C (nečisto)

**MS (ESI):** 229,1 [M+H]<sup>+</sup>

**Mr (izračunana):** 228,21

**HR-MS:** 229,0721 (izračunana: 229,0726) **Elementna sestava:** C<sub>11</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>



Slika 28: 2H-benzo[d][1,2,3]triazol-2-il-1H-pirol-2-karboksilat

**2H-BENZO[D][1,2,3]TRIAZOL-2-IL-5-FLUORO-1H-INDOL-2-KARBOKSILAT**

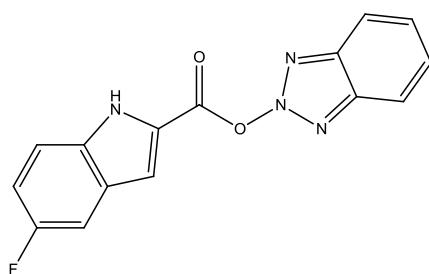
**T<sub>tališča</sub>:** 189 - 191 °C

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3369, 1650, 1630, 1519, 1492, 1459, 1445, 1434, 1409, 1394, 1343, 1327, 1303, 1288, 1253, 1231, 1224, 1207, 1186, 1161, 1136, 1102, 1004, 983, 959, 930, 883, 868, 831, 798, 775, 755, 743, 724, 667, 638, 616, 599, 584, 563

**MS (ESI):** 295,1 [M-H]<sup>-</sup>

**Mr (izračunana):** 296,26

**HR-MS:** 295,0636 (izračunana: 295,0631) **Elementna sestava:** C<sub>15</sub>H<sub>9</sub>FN<sub>4</sub>O<sub>2</sub>



Slika 29: 2H-benzo[d][1,2,3]triazol-2-il-5-fluoro-1H-indol-2-karboksilat

**2H-BENZO[D][1,2,3]TRIAZOL-2-IL-4,5-DIBROMO-1H-PIROL-2-KARBOKSILAT**

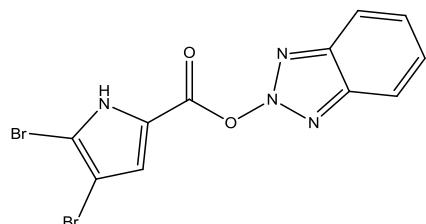
**T<sub>tališča</sub>:** 200 - 203 °C

**MS (ESI):** 382, 9 [M-H]<sup>-</sup>

**Mr (izračunana):** 386,00

**HR-MS:** 382,8777 (izračunana: 382,8779) **Elementna sestava:** C<sub>11</sub>H<sub>6</sub>Br<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>2</sub>

**IR (cm<sup>-1</sup>):** 3154, 2986, 2906, 2750, 2660, 1682, 1592, 1552, 1531, 1490, 1454, 1443, 1399, 1381, 1369, 1344, 1300, 1274, 1256, 1243, 1203, 1179, 1148, 1137, 1101, 1076, 1060, 999, 976, 948, 890, 845, 819, 809, 777, 756, 743, 728, 660, 636, 618, 600, 577, 553

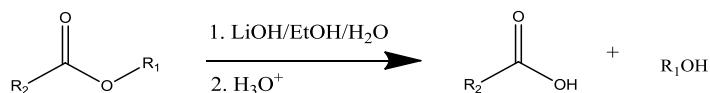


Slika 30: 2H-benzo[d][1,2,3]triazol-2-il-4,5-dibromo-1H-pirol-2-karboksilat

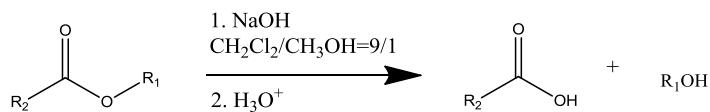
### 5.1.3. ALKALNA HIDROLIZA ESTROV

Estri predstavljajo dokaj pogosto obliko zaščite karboksilnih kislin, hidroliziramo pa jih lahko na različne načine. Eden od postopkov je hidroliza pod bazičnimi pogoji, včasih mu rečemo tudi saponifikacija. Največkrat se za alkalno estersko hidrolizo uporabi kombinacijo dveh topil, vode in pa organskega topila, ki je topno v vodi. To je potrebno za zagotavljanje topnosti tako estra kot tudi hidroksida, ki je potreben za hidrolizo. Obstajajo pa tudi sicer redkejši postopki saponifikacije v brezvodnih pogojih (46).

Primer alkalne hidrolize v vodi:



Primer cepitve esterske vezi v brezvodnih pogojih:

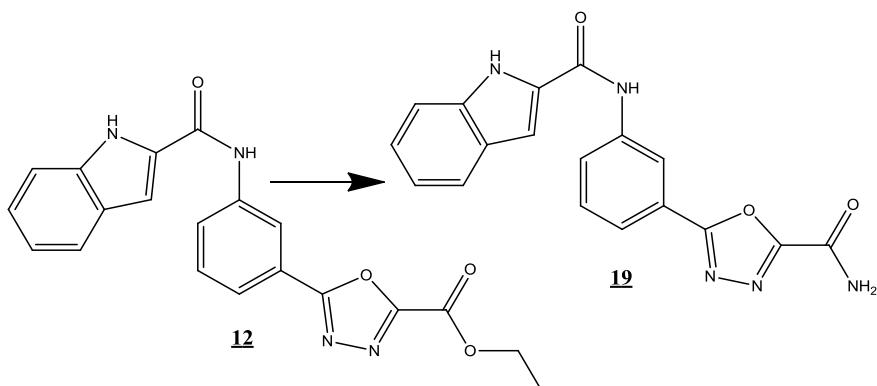


V diplomskem delu smo se odločili za alkalno hidrolizo z 2 molarnim litijevim hidroksidom, organski topili pa sta bila brezvodni etanol in THF.

Alkalna hidroliza etilnega estra je bila zadnja stopnja naše sintezne poti, produkt pa bi morali biti karboksilna kislina. Z analizo dobljenih NMR in masnih spektrov vseh 3 končnih produktov smo ugotovili, da le-ti niso karboksilne kisline temveč dekarboksilirani derivati. Ugotovili smo, da so proste karboksilne kisline po hidrolizi etilnega estra na mestu 2 na 1,3,4-oksadiazolnem obroču nestabilne, medtem ko so estri stabilni. Takoj po

hidrolizi namreč pride do dekarboksilacije, nestabilnost karboksilne kisline na mestu 2 1,3,4-oksadiazolnega obroča so v literaturi že omenili (47, 48).

Namesto alkalne hidrolize estra v zadnji stopnji reakcije, smo poskusili še s pretvorbo estra v amid. Prednost amidov pred karboksilnimi kislinami je večja stabilnost ter manjša reaktivnost, saj ne morejo dekarboksilirati tako kot kisline. Spojino **12** smo raztopili v etanolu in raztopino prepihovali s plinastim amoniakom (Slika 31).



Slika 31: pretvorba estra v amid

Dobljeni amid (**19**) smo vključili v testiranje na girazi.

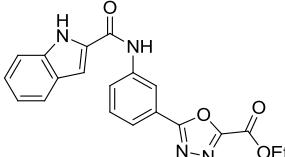
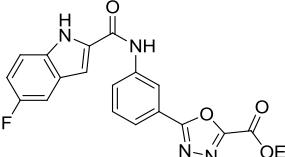
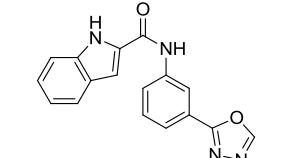
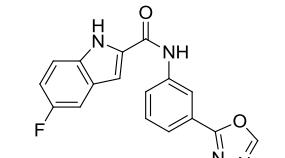
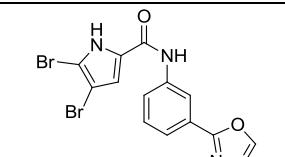
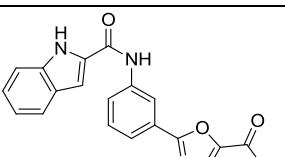
## 5.2. TESTIRANJE SPOJIN NA DNA GIRAZI

V diplomskem delu smo želeli sintetizirati karboksilne kisline z 1,3,4-oksadiazolnim ogrodjem. Kot že rečeno, se je izkazalo, da so tovrstne spojine nestabilne. Končni produkti so zato dekarboksilirani analogi prvotno načrtovanih spojin. Vseeno smo dobljene spojine ter esterske oblike načrtovanih kislin testirali na izolirani DNA girazi. Učinkovitost spojin smo merili na podlagi rezidualne aktivnosti DNA giraze, torej preostali aktivnosti encima po inkubaciji z našimi zaviralci.

Po testiranju se je izkazalo, da spojina **18** premore šibak zaviralni učinek na encim ( $IC_{50}$  je približno  $100 \mu M$ ), čeprav v molekuli ni kislinskega fragmenta. 4,5-dibromopiroolni fragment najverjetneje nudi dovolj močne interakcije v encimskem žepu. Ostali dekarboksilirani analogi ter estri pri koncentraciji  $100 \mu M$  nimajo učinka na DNA girazo.

Spojina **19** prav tako ne premore zaviralne aktivnosti. Amidni fragment lahko kot donor in akceptor tvori vodikove vezi z ustrezno tarčo, ne more pa tvoriti ionskih interakcij kot jih lahko karboksilna kisline. Zaradi neaktivnosti amida **19** smo sklepali, da je za zaviralno aktivnost potrebna ionska interakcija spojine z encimskim žepom na girazi.

Preglednica 1: Testiranje spojin na DNA girazi

Spojina	Struktura	RA (10 µM) [%]	RA (100 µM) [%]	Aktivnost
<b>12</b>		100	133	neaktivna
<b>15</b>		128	119	neaktivna
<b>13</b>		120	106	neaktivna
<b>16</b>		109	93	neaktivna
<b>18</b>		81	54	aktivna
<b>19</b>		88	81	neaktivna

**Legenda:**

RA= rezidualna aktivnost

## 6. SKLEPI

V okviru diplomskega dela smo predstavili sintezo potencialnih zaviralcev giraze z 1,3,4-oksadiazolnim ogrodjem.

Za zamenjavo tiazolnega obroča iz spojine vodnice smo se odločili za že večkrat omenjen heteroaromatski obroč, kar pa se je žal izkazalo za neprimerno. Na mestu 2 namreč pride do dekarboksilacije, za zaviralno delovanje spojin na DNA girazi pa je najverjetneje potrebna ionska interakcija z encimskim žepom preko karboksilne kisline. 1,3,4-oksadiazolni obroč bi bilo potrebno zamenjati s podobnim heteroaromatskim obročem, kjer bi bil karboksilni fragment stabilen, na primer z 1,2,4-oksadiazolnim ali pa oksazolnim obročem.

Pri tvorbi amidne vezi smo se odločili za uporabo sklopitvenih reagentov, kar je sicer vodilo do željenih produktov, reaktivnost pa bi za dosego boljših rezultatov lahko povečali z uporabo aktivnejših oblik aktiviranih kislin, najbolje kislinskih kloridov.

Para substituirani derivati so se izkazali za slabo reaktivne pri tvorbi amidne vezi, vendar bi jih lahko v prihodnje poskusili sintetizirati z drugačnim pristopom. Začeli bi s tvorbo amida, nato pa bi se šele lotili tvorbe na novo izbranega heteroaromata. Isti postopek bi prav tako lahko uporabili tudi pri meta derivatih.

Izbira 4,5-dibromopirolnega obroča se je izkazala za dobro, saj spojina **18** kljub pomanjkanju karboksilnega fragmenta premore šibko zaviralno aktivnost ( $IC_{50} \sim 100 \mu M$ ).

V prihodnjih sintezah zaviralcev DNA giraze z delovanjem na podenoto B bi priporočili uporabo omenjenega fragmenta pa tudi 3,4-dikloro-5-metilpirolnega obroča, ki je del naše spojine vodnice.

## 7. LITERATURA

1. Tanitame A, Oyamada Y, Ofuji K, Kyoya Y, Suzuki K, Ito H, Kawasaki M, Nagai K, Wachid M, Yamagishi J: Design, synthesis and structure–activity relationship studies of novel indazole analogues as DNA gyrase inhibitors with Gram-positive antibacterial activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2004; 14: 2857–2862
2. Eakin AE et al: Pyrrolamide DNA Gyrase Inhibitors: Fragment-Based Nuclear Magnetic Resonance Screening To Identify Antibacterial Agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011; 56 (3): 1240–1246
3. Guillemot D: Antibiotic use in humans and bacterial resistance. *Current Opinion in Microbiology*, 1999; 2: 494–498
4. Patrick GL: An Introduction to Medicinal Chemistry, 4th edition, Oxford University Press Inc., New York, 2009: 421 – 474
5. de la Cruz F, Davies J: Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria. *Trends in microbiology*, 2000; 8 (3): 128–132
6. Bower CK, Daeschel MA: Resistance responses of microorganisms in food environments. *International Journal of Food Microbiology*, 1999; 50: 33–44
7. Rodríguez-Rojas A, Rodríguez-Beltrán J, Couce A, Blázquez J: Antibiotics and antibiotic resistance: A bitter fight against evolution. *International Journal of Medical Microbiology*, 2013; 303 (6-7): 293–297
8. Blázquez J, Couce A, Rodríguez-Beltrán J, Rodríguez-Rojas A: Antimicrobials as promoters of genetic variation. *Current Opinion in Microbiology*, 2012; 15: 561–569
9. Hitchings GH: Mechanism of Action of Trimethoprim-Sulfamethoxazole—I. *J. Infect. Dis.* 1973; 128 (3): 433–436
10. Tipper DJ, Strominger JL: Mechanism of action of penicillins: A proposal based on their structural similarity to acyl-d-alanyl-d-alanine. *Microbiology: Tipper and Strominger*, 1965; (54): 1133–1141
11. Adegoke OA, Quadri MO: Novel spectrophotometric determinations of some cephalosporins following azo dye formation with p-dimethylaminobenzaldehyde. *Arabian Journal of Chemistry*, 2012

12. Buynak JD: Understanding the longevity of the b-lactam antibiotics and of antibiotic/b-lactamase inhibitor combinations. *Biochemical Pharmacology*, 2006; 71: 930–940
13. Allen NE, Nicas TI: Mechanism of action of oritavancin and related glycopeptide antibiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 2003; 26: 511–532
14. HsuChen CC, Feingold DS: The Mechanism of Polymyxin B Action and Selectivity toward Biologic Membranes. *Biochemistry*, 1973; 12 (11): 2105–2111
15. Jana S, Deb JK: Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Applied Microbiology Biotechnology*, 2006; 70 (2): 140-150
16. Roberts MC: Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution. *FEMS Microbiology Reviews*, 1996; 19: 1–24
17. Tenson T, Lovmar M, Ehrenberg M: The Mechanism of Action of Macrolides, Lincosamides and Streptogramin B Reveals the Nascent Peptide Exit Path in the Ribosome. *Journal of Molecular Biology*, 2003; 330 (5): 1005–1014
18. Bozdogan B, Appelbaum PC: Oxazolidinones: activity, mode of action, and mechanism of resistance. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2004; 23 (2): 113–119
19. Lübbbers T, Angehrn P, Gmünder H, Herzig S: Design, synthesis, and structure–activity relationship studies of new phenolic DNA gyrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007; 17: 4708–4714
20. Wehrli W, Staehelin M: Actions of the Rifamycins. *Bacteriological reviews*, 1971; 290–309
21. Göttler T, Klostermeier D: Dissection of the Nucleotide Cycle of *B. subtilis* DNA Gyrase and its Modulation by DNA. *J. Mol. Biol.*, 2007; 367: 1392–1404
22. Hockings SC, Maxwell A: Identification of Four GyrA Residues Involved in the DNA Breakage–Reunion Reaction of DNA Gyrase. *J. Mol. Biol.*, 2002; 318: 351–359
23. Gore J, Bryant Z, Stone MD, Nöllmann M, Cozzarelli NR, Bustamante C: Mechanochemical analysis of DNA gyrase using rotor bead tracking. *Nature*, 2006; 439 (7072): 100–104

24. Papillon J, Menetret JF, Batisse C, Helye R, Schultz P, Potier N, Lamour V: Structural insight into negative DNA supercoiling by DNA gyrase, a bacterial type 2A DNA topoisomerase. *Nucleic Acids Research*, 2013; 1–13
25. Velez-Cruz R, Osheroff N: DNA Topoisomerases: Type II. *Encyclopedia of Biological Chemistry*, 2004; 1: 806–811
26. Huang Z, Lin K, You Q: De novo design of novel DNA–gyrase inhibitors based on 2D molecular fingerprints. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013; 23: 4166–4171
27. Ostrov DA, Prada JAH, Corsino PE, Finton KA, Le N, Rowe TC: Discovery of Novel DNA Gyrase Inhibitors by High-Throughput Virtual Screening. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2007; 51 (10): 3688–3698
28. Verghese J, Nguyen T, Oppegard LM, Seivert LM, Hiasa H, Ellis KC: Flavone based analogues inspired by the natural product simocyclinone D8 as DNA gyrase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013; 23 (21): 5874–5877
29. Tran TP et al: Structure–activity relationships of 3-aminoquinazolinediones, a new class of bacterial type-2 topoisomerase (DNA gyrase and topo IV) inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2007; 17: 1312–1320
30. Sherer BA et al: Pyrrolamide DNA gyrase inhibitors: Optimization of antibacterial activity and efficacy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2011; 21: 7416–7420
31. Ronkin SM et al: Discovery of pyrazolthiazoles as novel and potent inhibitors of bacterial gyrase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2010; 20: 2828–2831
32. Angehrn P, Buchmann S, Funk C, Goetschi E, Gmuender H, Hebeisen P, Kostrewa D, Link H, Luebbers T, Masciadri R, Nielsen J, Reindl P, Ricklin F, Schmitt-Hoffmann A, Theil FP: New Antibacterial Agents Derived from the DNA Gyrase Inhibitor Cyclothialidine. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2004; 47 (6): 1487–1513
33. Tanitame A, Oyamada Y, Ofuji K, Fujimoto M, Suzuki K, Ueda T, Terauchi H, Kawasaki M, Nagai K, Wachi M, Yamagishi J: Synthesis and antibacterial activity of novel and potent DNA gyrase inhibitors with azole ring. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2004; 12: 5515–5524

34. Mitton-Fry MJ et al: Novel quinoline derivatives as inhibitors of bacterial DNA gyrase and topoisomerase IV. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2013; 23: 2955–2961
35. Uria-Nickelsen M, Blodgett A, Kamp H, Eakin A, Sherer B, Green O: Novel DNA gyrase inhibitors: Microbiological characterisation of pyrrolamides. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 2013; 41: 28–35
36. Brvar M, Perdih A, Hodnik V, Renko M, Anderluh G, Jerala R, Solmajer T: In silico discovery and biophysical evaluation of novel 5-(2-hydroxybenzylidene) rhodanine inhibitors of DNA gyrase B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2012; 20: 2572–2580
37. Brvar M, Perdih A, Renko M, Anderluh G, Turk D, Solmajer T: Structure-Based Discovery of Substituted 4,5'-Bithiazoles as Novel DNA Gyrase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2012; 55: 6413–6426
38. Manchester JI, Dussault DD, Rose JA, Boriack-Sjodin PA, Uria-Nickelsen M, Ioannidis G, Bist S, Fleming P, Hull KG: Discovery of a novel azaindole class of antibacterial agents targeting the ATPase domains of DNA gyrase and Topoisomerase IV. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2012; 22: 5150–5156
39. Ferdani R, Pajewski R, Djedovic N, Pajewska J, Schlesinger PH, Gokel GW: Anion transport in liposomes responds to variations in the anchor chains and the fourth amino acid of heptapeptide ion channels. *New Journal of Chemistry*, 2005; 29: 673–680
40. Lee CH, Cho HI, Lee KJ: Synthesis of 1,3,4-Oxadiazoles Having Phenol or Thiophenol Group. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 2001; 22 (10): 1153–1155
41. Sahin G, Palaska E, Ekizoglu M, Ozalp M: Synthesis and antimicrobial activity of some 1,3,4-oxadiazole derivatives. *Il Farmaco*, 2002; 57: 539–542
42. Jakopin Ž, Sollner Dolenc M: Recent Advances in the Synthesis of 1,2,4- and 1,3,4-Oxadiazoles. *Current Organic Chemistry*, 2008; 12: 850–898
43. Oliveira CS, Lira BF, Barbosa-Filho JM, Lorenzo JGF, Athayde-Filho PF: Synthetic Approaches and Pharmacological Activity of 1,3,4-Oxadiazoles: A Review of the Literature from 2000–2012. *Molecules*, 2012; 17: 10192–10231

44. Kolb et al.: Large scale synthesis of 1,2,4- and 1,3,4-oxadiazole carboxylates; United States Patent, Patent number: 6,951,946 B2, date of patent Oct. 4, 2005
45. Montalbetti CAGN, Falque V: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 2005; 61: 10827–10852
46. Theodorou V, Skobridis K, Tzakos AG, Ragoussis V: A simple method for the alkaline hydrolysis of esters. *Tetrahedron Letters*, 2007; 48: 8230–8233
47. Spinelli D, Noto R, Consiglio G, Werber G, Buccheri F: Kinetic study of the decarboxylation of 5-amino-1,3,4-oxadiazole-2-carboxylic acid to 2-amino-1,3,4-oxadiazole in water as a function of proton activity. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1977; 2: 639–642
48. Noto R, Buccheri F, Consiglio G, Spinelli D: Studies on decarboxylation reactions. Prat 4. Kinetic study of the decarboxylation of some *N*-alkyl- or *N*-phenyl-substituted 5-amino-1,3,4-oxadiazole-2-carboxylic acids. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.*, 1980; 2: 1627–1630