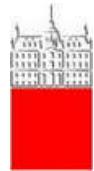


UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ROK PELC

**SINTEZA DERIVATOV 3- IN 4-CIANO BENZOJSKE
KISLINE S POTENCIALNIM PROTIMIKROBNIM
DELOVANJEM**

**SYNTHESIS OF DERIVATIVES OF 3- AND 4-CYANO
BENZOIC ACID WITH POTENTIAL ANTIMICROBIAL
ACTIVITY**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

Diplomsko naložbo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo pod vodstvom mentorice prof. dr. Marije Sollner Dolenc, 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 svoji mentorici, prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm., za ves trud, potrpežljivost in pomoč. Najlepša hvala tudi ostalim članom katedre za Farmacevtsko kemijo za izkazano pomoč med eksperimentalnim delom še posebej gospe Damjani Zalar za vso pomoč.

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

IZJAVA

Izjavljam, da sem diplomsko delo samostojno izdelal pod vodstvom mentorice prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

Ljubljana, 2016

Rok Pelc

Predsednik diplomske komisije: prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Simon Žakelj, mag. farm.

VSEBINA

VSEBINA	I
POVZETEK	IV
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD	1
1.1. DNA-GIRAZA.....	2
1.2. MEHANIZEM SUPERZVITJA DNA Z DNA-GIRAZO.....	3
1.3. ATP VEZAVNO MESTO.....	4
1.4. INHIBITORJI BAKTERIJSKE DNA-GIRAZE.....	5
1.4.1. INHIBITORJI PODENOTE B DNA-GIRAZE	6
1.4.1.1. AMINOKUMARINI	6
1.4.1.2. CIKLOTIALIDINI.....	8
1.4.1.3. SIMOCIKLINONI	9
1.4.1.4. TRICIKLIČNE SPOJINE S PIRIMIDOINDOLSKO OSNOVO	10
1.4.1.5. DERIVATI 2-PIRIDILUREE	11
1.4.1.6. SPOJINE S PIRIMIDINSKO OSNOVO	12
1.4.1.7. SPOJINE Z AMINOBENZIMIDAZOLSKIM OGRODJEM.....	12
1.4.1.8. NARAVNI PRODUKT KIBDELOMICIN	13
1.4.1.9. AMINOPIRAZINAMIDI.....	14
1.4.1.10. PIROLAMIDI	15
2.1. REAKCIJSKI SHEMI.....	17
3. MATERIALI IN METODE.....	19
3.1. Materiali	19
3.1.1. Reagenti in topila	19
3.1.2. Laboratorijska oprema.....	19
3.2. Metode.....	19
3.2.1. Kromatografske metode	19
3.2.2. Spektroskopske metode	20
3.2.3. Določanje tališča	21
3.2.4. Biološko testiranje spojin	21
4. EKSPERIMENTALNI DEL	22
4.1. SINTEZA ETILNEGA ESTRA 3-CIANO BENZOJSKE KISLINE (1)	22
4.2. SINTEZA ETIL 3-(AMINO-(HIDROKSIIMINO)-METIL) BENZOATA (2).....	23
4.3. SINTEZA ETIL 3-(N'((TERC-BUTOKSIKARBONIL) GLICIL) OKSI) KARBAMIMIDOIL) BENZOATA (3)	24

4.4. SINTEZA ETIL 3-(5-((TERC-BUTOJSIKARBONIL)AMINO) METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (4)	25
4.5. SINTEZA ETIL 3-(5-(AMINOMETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA v obliki soli s TRIFLUOROOCETNO KISLINO (5)	27
4.6. SINTEZA ETIL 3-(5-((1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOAT (6).....	28
4.7. SINTEZA 3-(5-((1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOJSKE KISLINE (7)	29
4.8. POSKUS SINTEZE 3-(5-((TERC-BUTOJSIKARBONIL)AMINO) METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOJSKE KISLINE (8).....	31
4.9. SINTEZA ETILNEGA ESTRA 4-CIANO BENZOJSKE KISLINE (9)	32
4.10. SINTEZA ETIL 4-(AMINO-(HIDROKSIIMINO)-METIL) BENZOATA (10)	33
4.11. SINTEZA ETIL 4-(N'-((TERC-BUTOJSIKARBONIL)GLICIL)OKSI)KARBAMIMIDOIL) BENZOAT (11)	34
4.12. SINTEZA ETIL 4-(5-((TERC-BUTOJSIKARBONIL) AMINO) METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (12)	35
4.13. SINTEZA ETIL 4-(5-(AMINOMETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA v obliki soli s TRIFLUOROOCETNO KISLINO (13)	37
4.14. SINTEZA ETIL 4-(5-((1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (14)	38
4.15. SINTEZA NATRIJEVEGA 4-(5-((1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (15)	39
4.16. SINTEZA 4-(5-((1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOJSKA KISLINA (16).....	40
4.17. SINTEZA NATRIJEVEGA 4-(5-((TERC-BUTOJSIKARBONIL) AMINO)METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (17)	42
4.18. SINTEZA 4-(5-((TERC-BUTOJSIKARBONIL)AMINO) METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOJSKE KISLINE (18).....	43
4.19. SINTEZA ETIL 4-(5-((TERC-BUTOJSIKARBONIL)AMINO) METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (19)	44
4.20. SINTEZA ETIL 4-(5-(1H-INDOL-2-IL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (20a)	45
4.21. SINTEZA ETIL 4-(5-(1H-INDOL-2-IL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (20b)	46
4.22. SINTEZA ETIL 3-(N'-((TERC-BUTOJSIKARBONIL)ALANIL) OKSI)KARBAMIMIDOIL) BENZOATA (21)	47
4.23. SINTEZA ETIL 3-(5-(1-((TERC-BUTOJSIKARBONIL)AMINO) ETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (22)	48
4.24. SINTEZA ETIL 3-(5-(AMINOETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA v obliki soli s TRIFLUOROOCETNO KISLINO (23)	49
4.25. SINTEZA ETIL 3-(5-((1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)ETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOAT (24)	50
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	52

5.1. Tvorba etilnega estra 3- in 4-ciano benzojske kisline (<u>1</u> in <u>9</u>).....	52
5.2. Tvorba amidoksimov (<u>2</u> in <u>10</u>).....	53
5.3. Tvorba 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov z uporabo DCC (<u>19</u> , <u>20a</u>) ter z uporabo TBTU (<u>20b</u>).....	54
5.4. Tvorba O-aciliranih produktov z BOC-Gly (<u>3</u> , <u>11</u>) in BOC-Ala (<u>21</u>) s peptidnim sklopitvenim reagentom TBTU.....	55
5.5. Tvorba 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov (<u>4</u> , <u>12</u> , <u>22</u>) s segrevanjem v toluenu.....	56
5.6. Odstranitev BOC zaščite (<u>5</u> , <u>13</u> in <u>23</u>)	57
5.7. Substitucija aminov (<u>5</u> , <u>13</u> , <u>23</u>) z indol-2-karboksilno kislino (<u>6</u> , <u>14</u> , <u>24</u>)	58
5.8. Hidroliza esterske skupine (<u>7</u> , <u>8</u> , <u>15</u> , <u>16</u> , <u>17</u> in <u>18</u>).....	59
6. SKLEPI	61
7. LITERATURA	63

POVZETEK

V nenehnem boju z bakterijskimi okužbami so odkrivali nove in nove zdravilne učinkovine. Pravi preboj in uspešen nadaljnji razvoj se je pričel z odkritjem penicilina in ostalih antibiotikov. V zadnjem času so znanstveniki po celi svetu zaradi pojava odpornosti bakterij na antibiotike in tudi druge protimikrobne učinkovine prisiljeni svoje raziskave usmeriti v odkrivanje novih bolj specifičnih tarč. Ena takšnih tarč je bakterijska DNA-giraza. Gre namreč za encim topoizomerazo, ki je sposobna negativno dodatno zviti dvojno vijačnico, sodeluje pri DNA-replikaciji in odstranitvi pozitivnih dodatno zvitih verig. Ta encim je v bakterijah zgrajen iz dveh podenot in ima heterodimerno strukturo A₂B₂.

V diplomski nalogi smo si zastavili cilj, da sintetiziramo derivate 3- in 4-ciano benzojske kisline s potencialnim inhibitornim delovanjem na podenoto B encima. Pri obeh izhodnih spojinah smo za pripravo končnih spojin v glavnem uporabili enako sintezno pot. Najprej smo pripravili etilni ester izhodnih spojin, ki je služil kot zaščitna skupina za karboksilno kislino: etilni ester 3-ciano benzojske kisline (**1**) in etilni ester 4-ciano benzojske kisline (**2**). Sledila je pretvorba estrov **1** in **2** v amidoksim: etil 3-(amino(hidroksiimino)metil)benzoat (**2**) in etil 4-(amino(hidroksiimino)metil)benzoat (**10**). Iz amidoksimov **2** in **10** smo po sinteznem postopku s peptidnim sklopitvenim reagentom TBTU pripravili O-acilirane produkte z BOC-Gly:

etyl 3-(N'-(((terc-butoksikarbonil)glicil)oksi)karbamimidoil) benzoat (**3**) in etil 4-(N'-(((terc-butoksikarbonil)glicil)oksi)karbamimidoil) benzoat (**11**) ter z BOC-Ala: etil 3-(N'-(((terc-butoksikarbonil)glicil)oksi)karbamimidoil) benzoat (**21**). Amidoksim **10** smo uporabili tudi v reakciji z dicikloheksil sečnino (DCC) in tako pripravili spojini z 1,2,4-oksadiazolskim obročem: etil 4-(5-(((terc-butoksikarbonil)amino)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoat (**19**) in etil 4-(5-(1H-indol-2-il)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoat (**20a**). V nadaljevanju smo O-acilirane produkte **3**, **11** in **21** segrevali v toluenu pri 115 °C in tako dosegli ciklizacijo v 1,2,4-oksadiazolski obroč. Tako smo pripravili naslednje spojine: etil 3-(5-(((terc-butoksikarbonil)amino)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoat (**4**), etil 4-(5-(((terc-butoksikarbonil)amino)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoat (**12**) in etil 3-(5-(1-((terc-butoksikarbonil)amino)ethyl)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoat (**22**).

Odstranjevanje BOC-zaščite sintetiziranih oksadiazolov smo izvedli s trifluoroacetno kislino in dobili trifluoroacetne soli: etil 3-(5-(aminometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoata

(**5**), etil 4-(5-(aminometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoata (**13**) in etil 3-(5-(aminoetil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoata (**23**). Da smo tvorili peptidno vez z amini in indol-2-karboksilno kislino, smo uporabili peptidni sklopitveni reagent TBTU in sintetizirali amide: etil 3-(5-((1H-indol-2-karboksamido)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoat (**6**), etil 4-(5-((1H-indol-2-karboksamido)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoat (**14**) in etil 3-(5-((1H-indol-2-karboksamido)etyl)-1,2,4-oksadiazol-5-il) benzoat (**24**). Za sintezo končnih kislin smo izvedli alkalno hidrolizo in s tem pripravili končni kislini:

3-(5-((1H-indol-2-karboksamido)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzojska kislina (**7**) in 4-(5-((1H-indol-2-karboksamido)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzojska kislina (**16**).

Za sintezo spojin **7** in **16** smo se odločili na podlagi računalniškega programa FlexX (LeadIT 2.1.3 (BioSolveIT)), s katerim smo izvedli sidranje različnih derivatov 3- in 4-ciano benzojske kisline in dobili spodbudne rezultate prav za sintetizirane spojine. Kljub obetavnim napovedim sidranja spojin pa nobena od spojin **4**, **6**, **7**, **12**, **14** in **16** ni izkazala inhibicije giraze pri koncentracijah nižjih od 100 µM.

ABSTRACT

In constant struggle with bacterial infections, new and new active substances are discovered. The real breakthrough and successful further developments began with the discovery of penicillin and other antibiotics. Recently, scientists around the world are forced to focus their researches on the discovery of new, more specific targets because of the occurrence of bacterial resistance on antibiotics and other antibacterial agents. One such target is bacterial DNA-gyrase. This is enzyme topoisomerase, which is capable of negatively supercoiled double-strand, to remove positive additional twisted chains and is involved in DNA-replication. In bacteria this enzyme is built up of two sub-units and has a structure of heterodimer A₂B₂.

In this thesis, we set a goal to synthesized derivatives of 3- and 4-cyano benzoic acid with a potential inhibitory activity on the B subunit of the enzyme. In both cases we mainly used the same route of synthesis for preparation of final compounds. Firstly we prepared an ethyl ester of the starting compounds, which served as a protecting group for carboxylic acid: ethyl ester of 3-cyano benzoic acid (**1**) and the ethyl ester of 4-cyano benzoic acid (**2**). This was followed by conversion of esters into an amidoximes: ethyl 3-(amine(hydroxyimine)methyl) benzoate (**3**) and ethyl 4-(amine(hydroxyimine)methyl) benzoate (**10**). With synthesis procedure with a peptide coupling reagent TBTU we prepared O-acylated products with BOC-Gly:

ethyl 3-(N'-(((tert-butoxycarbonyl)glycyl)oxy)carbamimidoyl) benzoate (**3**) and ethyl 4-(N'-(((tert-butoxycarbonyl)glycyl)oxy)carbamimidoyl) benzoate (**11**) and BOC-Ala: ethyl 3-(N'-(((tert-butoxycarbonyl)glycyl)oxy)carbamimidoyl) benzoate (**21**). The amidoxime **10** was used in the reaction with dicyclohexyl urea (DCC) and thus we obtained compounds with a 1,2,4-oxadiazole ring:

ethyl 4-(5-(((tert-butoxycarbonyl)amine)methyl)-1,2,4-oxadiazole-3-yl) benzoate (**19**) and ethyl 4-(5-(1H-indole-2-yl)-1,2,4-oxadiazole-3-yl) benzoate (**20a**). Next we heated O-acylated products **3**, **11** in **22** at 115 °C and thus achieve a cyclization to the 1,2,4-oxadiazole ring. We got compounds: ethyl 3-(5-(((tert-butoxycarbonyl)amine)methyl)-1,2,4-oxadiazole-3-yl) benzoate (**4**), ethyl 4-(5-(((tert-butoxycarbonyl)amine)methyl)-1,2,4-oxadiazole-3-yl) benzoate (**12**) and ethyl 3-(5-(1-((tert-butoxycarbonyl)amine)ethyl)-1,2,4-oxadiazole-3-yl) benzoate (**23**). Removing of BOC-protection group on synthesized oxadiazoles was carried out with trifluoroacetic acid and we got trifluoroacetic salts: ethyl

3-(5-(aminemethyl)-1,2,4-oxadiazole-3-yl) benzoate (**5**), ethyl 4-(5-(aminemethyl)-1,2,4-oxadiazole-3-yl) benzoate (**13**) and ethyl 3-(5-(amineethyl)-1,2,4-oxadiazole-3-yl) benzoate (**24**). To form the peptide bond with the so prepared amines and indole-2-carboxylic acid, we used peptide coupling reagent TBTU and thus get amides: ethyl 3-(5-((1H-indole-2-carboxamide)methyl)-1,2,4-oxadiazole-3-yl) benzoate (**6**), ethyl 4-(5-((1H-indole-2-carboxamide)methyl)-1,2,4-oxadiazole-3-yl) benzoate (**14**) and ethyl 3-(5-((1H-indole-2-carboxamide)ethyl)-1,2,4-oxadiazole-3-yl) benzoate (**25**). For the synthesis of the final acids we performed the alkaline hydrolysis and prepared: 3-(5-((1H-indole-2-carboxamide)methyl)-1,2,4-oxadiazole-3-yl) benzoic acid (**7**) and 3-(5-((1H-indole-2-carboxamide)methyl)-1,2,4-oxadiazole-3-yl) benzoic acid (**16**).

For the synthesis of compounds **7** and **16** we decided on the basis of a computer program FlexX (LeadIT 2.1.3 (BioSolveIT)) with which we performed anchoring of different derivatives of 3- and 4- cyano benzoic acid and obtained encouraging results, also for the synthesized compounds. Despite promising predictions, none of the compounds **4**, **6**, **7**, **12**, **14** and **16** showed inhibition of gyrase in a concentration of 100 µM.

SEZNAM OKRAJŠAV

ADME: angl. Absorption, Distribution, Metabolism, Elimination; absorpcija, porazdelitev, metabolizem, izločanje

ATP: angl. Adenosine triphosphate; adenozin-trifosfat

ADP: angl. Adenosine diphosphate; adenozin-difosfat

ADPNP: nehidrolizirani analog ATP-ja

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

d: dublet

DMF: Dimethylformamide; dimetilformamid

DMSO-d₆: devterirani dimetilsulfoksid

DNA: angl. Deoxyribonucleic acid; deoksiribonukleinska kislina

DDC: dicikloheksil karbodiimid

CDCl₃: devterirani kloroform

GHKL: angl. Gyrase, Hsp90, Histidine Kinase, MutL

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

IC₅₀: koncentracija zaviralca, pri kateri pade aktivnost encima na polovico

IR: angl. Infrared spectroscopy; infrardeča spektroskopija

k: kvartet

m: multiplet

MF: mobilna faza

Mr: molekulska masa

MS: masna spektroskopija

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

NMR: angl. Nuclear magnetic resonance; jedrska magnetna resonanca

Rf: retencijski faktor

s: singlet

T: temperatura

t: triplet

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

TLC: angl. Thin layer chromatography; tankoplastna kromatografija

1. UVOD

Človeštvo je že od nekdaj obkroženo z bakterijami in se bori proti bakterijskim okužbam. Skozi zgodovino so boj dobivale bakterije, saj ljudje niso poznali niti ustreznega zdravila niti niso vedeli kaj dosti o povzročitelju bolezni, bakterijah.

Bakterije (znanstveno ime *Bacteria*) so velika skupina enoceličnih živilih organizmov. Imajo razmeroma preprosto celično strukturo brez celičnega jedra in brez organelov, kot so mitohondriji ali kloroplasti. Najdemo jih praktično povsod, v zemlji, vodi in zraku ter tudi v simbiozi z drugimi organizmi (1).

Ti mikroorganizmi so lahko koristni, lahko pa delujejo kot patogeni in povzročajo tudi resne bolezni, kot so pljučnica, tetanus in sifilis. Za preprečevanje in zdravljenje bakterijskih okužb se uporabljajo protimikrobne učinkovine, ki jih razdelimo na antibiotike (to so naravne protibakterijske učinkovine) in na danes bolj uporabljenе kemoterapeutike (to so protibakterijske učinkovine sinteznega izvora) (1).

Prvi pravi preboj v razvoju protimikrobnih učinkovin je uspel škotskemu znanstveniku in dobitniku Nobelove nagrade Alexandru Flemingu leta 1928, ko je slučajno odkril penicilin – prvi antibiotik. Dokazal je, da gliva *Penicillium notatum* v ustreznem gojišču proizvaja protibakterijsko snov, ki jo je poimenoval penicilin. Od tu je šel razvoj antibiotikov strmo navzgor (2).

Vendar se danes soočamo z enim največjih problemov pri uporabi protimikrobnih učinkovin. Gre za pojav bakterijske odpornosti na veliko terapevtsko uporabnih antibiotikov. Bakterije so v 'boju za lastno preživetje' iznašle načine za izničenje učinka antibiotikov, a smo jim pri tem pomagali tudi ljudje sami z neustreznim postavljanjem diagnoze (predpisovanje teh učinkovin ne da bi izvedli bakteriogram, s katerim bi dokazali prisotnost oz. odsotnost bakterij) kot tudi z neustreznou uporabo zdravil (pacienti se ne držimo predписанega režima odmerjanja) (3).

Pojav bakterijske odpornosti na najbolj znane antibiotike je prisilil znanstvenike po vsem svetu, da odkrivajo nove protibakterijske učinkovine na že znane ali pred kratkim odkrite tarče. Pri razvoju novih potencialnih protibakterijskih učinkovin s širokim spektrom delovanja morajo znanstveniki paziti na selektivno toksičnost in farmako-kinetične (ADME) lastnosti. Napredok v proteomiki in genomiki v zadnjih letih je pospešil odkritja novih potencialnih tarč primernih za razvoj novih učinkovin (4).

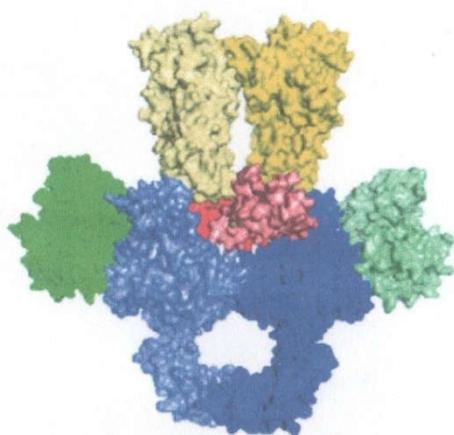
Ena izmed takšnih tarč je tudi DNA-giraza, katera je bolj predstavljena v nadaljevanju diplomske naloge.

1.1. DNA-GIRAZA

Bakterijski encim DNA-giraza so odkrili leta 1976 Gellert in sodelavci. Spada v razred DNA-topoizomeraz in je edinstvena bakterijska topoizomeraza, ki pripada encimski družini GHKL. Topoizomeraze so sposobne katalizirati spremembe v terciarni strukturi DNA tako *in vitro* kot *in vivo* (5). Igrajo ključno vlogo pri kataliziranju topoloških interkonverzij, ki so potrebne pri DNA-replikaciji in transkripciji v prokariontskih in evkariontskih celicah (6).

Topoizomeraze lahko razdelimo v dva tipa: tip I in tip II, odvisno od tega ali katalizirajo reakcijo na podlagi prehodne spremembe ene (tip I) ali obeh (tip II) verig DNA. Vse topoizomeraze lahko relaksirajo superzvito DNA, a samo DNA-giraza (tip II) lahko uvede negativne zavoje v molekulo DNA, kar zahteva hidrolizo molekule ATP (7). To pa je tudi glavna naloga DNA-giraze (5, 7).

Encim DNA-girazo najdemo v različnih oblikah. Pri človeku, se pravi v evkariontski celici najdemo topoizomerazo II kot enoenotni encim z molekulsko maso približno 170 kDa, ki je aktiven kot homodimer. V prokariontskih celicah (bakterije) pa je tako giraza kot njena bližnje sorodna topoizomeraza IV zgrajena iz dveh podenot in ima heterodimerno strukturo A₂B₂, kar lahko vidimo na sliki 1.



Slika 1: Model splošne zgradbe DNA-giraze (podenota A je sestavljena iz N-terminalne domene (modra barva) in C-terminalne domene (zelena barva); podenota B je sestavljena iz ATP-azne domene (rume-na barva) in TOPRIM domene (rdeča barva)) (8)

Podenota A giraze (GyrA) je odgovorna za razklenitev in združitev verige DNA, pri čemer sodeluje tudi podenota B. Ta katalitični proces vključuje večje konformacijske premike encima, ki jih omogoča vezava in hidroliza molekule ATP na podenoti B giraze (GyrB) (9).

Ker je DNA-giraza prisotna samo v prokariontskih celicah in je ključnega pomena za njihovo preživetje, je postala privlačna tarča za razvoj protimikrobnih učinkovin in je danes ena najbolj raziskanih in potrjenih tarč (10).

1.2. MEHANIZEM SUPERZVITJA DNA Z DNA-GIRAZO

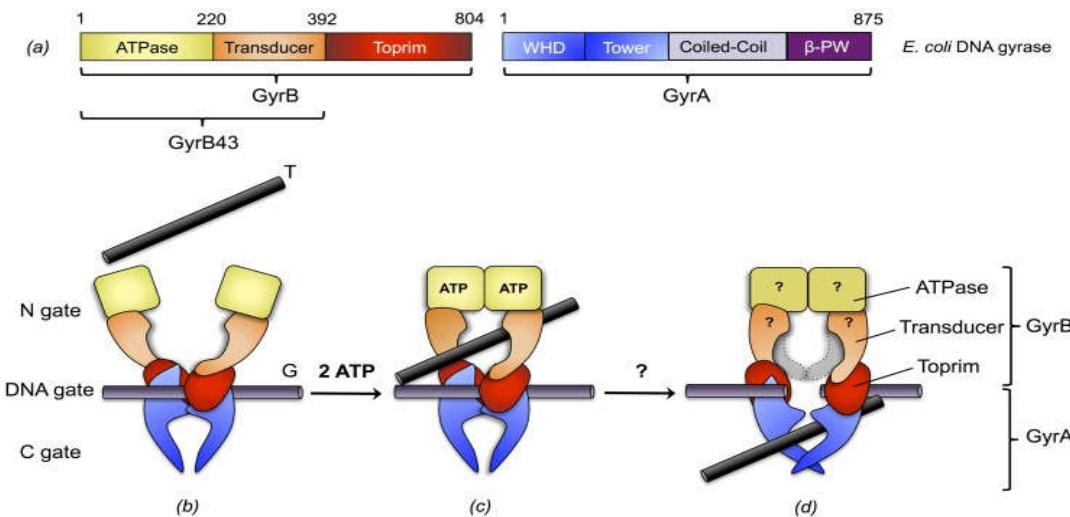
Uporabnost giraze kot tarče za protibakterijske učinkovine izvira iz njenega mehanizma superzvitja (10). Še vedno proučujejo mehanizem, vendar je model dvo-vratnega mehanizma močno podprt z biokemijskimi in strurnimi podatki (11). DNA giraza vsebuje tri področja, ki so lahko v odprti ali zaprti konformaciji. Ta področja so:

N-terminalna domena GyrB poimenovana N-vrata;

GyrA-GyrB-DNA vmesnik, kjer se cepi DNA poimenovana DNA-vrata in

C-terminalno področje v obliki zavite tuljave, ki tvori C oz. izstopna vrata.

Reakcija superzvitja, kot vidimo na sliki 2, naj bi potekala sledeče. Segment DNA-vrat sodeluje z encimom na vmesniku N-terminalnega dela GyrA dimera in TOPRIM domene GyrB, kjer se DNA ovije okoli encima in tvori desno-sučno superzvitje s približno 130 bp. Zvitje DNA na C-terminalno domeno giraze olajša drugi segment (transportni ali T-segment), ki pripada isti molekuli DNA, zato da doseže N-vrata, ki so locirana nad G-segmentom in se pripravi prehod verige. Vezava ATP povzroči zaprtje N-vrat in ujetje T-segmentsa. Encim cepi G-segment in tvori DNA fosfotirozilno vez štiri bazne pare stran in s tem ustvari zlom dvojne verige ter kovalentno vezavo GyrA na DNA. T-segment prehaja skozi odprta DNA-vrata in poškodovan G-segment ter na koncu še skozi izstopna vrata. Prehod T-segmentsa preko G-segmentsa omogoča vezava in hidroliza ATP do ADP, ki odpre N-vrata in obnovi encim za naslednji cikel superzvitja. En girazni cikel superzvitja uvede dva negativna zavoja v DNA molekulo na račun dveh molekul ATP-ja. V odsotnosti ATP lahko giraza katalizira relaksacijo negativnih zavojev DNA z reverznim mehanizmom (12).

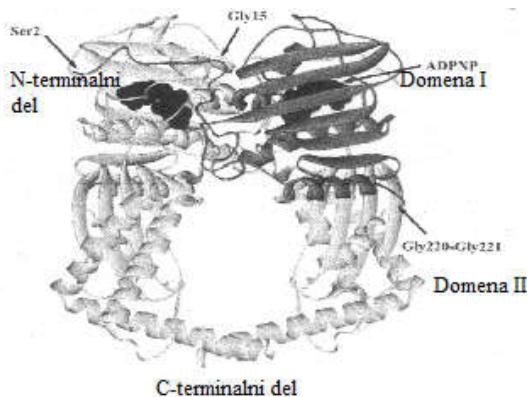


Slika 2: Reakcija superzvitja: zgoraj je prikaz strukture podenot GyrB in GyrA; spodaj pa njuna vloga pri reakciji superzvitja (13)

1.3. ATP VEZAVNO MESTO

Do danes niso objavili visoko-resolucijske strukture tetramera A_2B_2 . So pa objavili nekaj fragmentov domene ATP na podenoti B s številnimi ligandi (9).

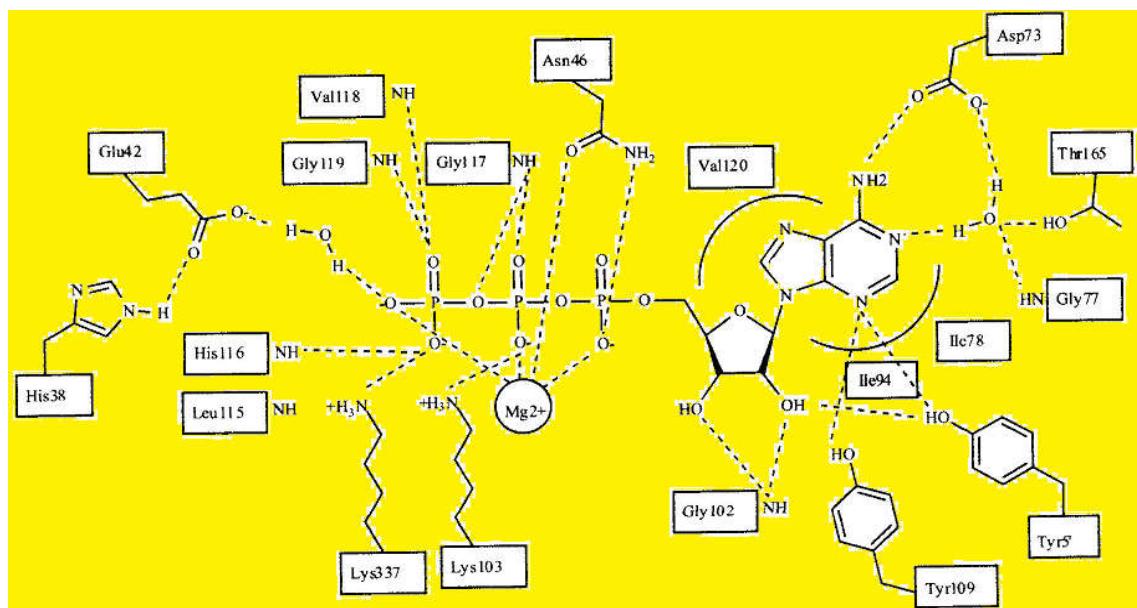
Eden takšnih je 43 kDa N-terminalni fragment GyrB iz *Escherichia coli* (im. GyrB43) v kompleksu z ADPNP (nehidrolizirani analog ATP-ja). GyrB43 tvori dimer v prisotnosti ATP ali ADPNP (slika 3). Takšen dimer je sestavljen iz domene I in domene II, med katerima se nahaja večja votlina s premerom 20 Å, kadar je encim v zaprti obliki. V to votlino so usmerjeni pozitivno nabiti argininski ostanki (9).



Slika 3: Primer tvorbe dimera GyrB43 s ADPNP (9)

Vezavno mesto je locirano na domeni I, ki vsebuje 8 beta-upognjenih ravnin (eight-stranded beta-sheet) in 5 alfa-vijačnic. Domena II pa vsebuje 4 beta-upognjene ravnine in 4 alfa-vijačnice (9).

Bolj detajlna analiza kristalne strukture kompleksa GyrB43-ADPNP prikazuje interakcije v vezavnem mestu med molekulom ATP in fragmentom podenote B DNA-giraze, kar lahko vidimo na spodnji sliki 4. Gre za številne vodikove vezi z aminokislinskimi ostanki proteina, kot so Glu42, Asn46, Asp73, Gly102, Lys103, Tyr109, Leu115, His116, Gly117 in Gly119 iz domene I. Dodatno ostanki Ile78, Ile94 in Val120 tvorijo hidrofobne vezi z adeninom in ribozo. Lys337 iz domene II tvori dodatno H-vez z gama-fosfatno skupino molekule ATP. Pomemben strukturni element je tudi kristalna molekula vode, ki je del omrežja vodikovih vezi, ki ga tvorijo adeninski obroč ATP-ja in ostanki Asp73, Gly77 in Thr165 (9).



Slika 4: Način vezave molekule ATP v vezavnem mestu na podenoti B giraze (9)

1.4. INHIBITORJI BAKTERIJSKE DNA-GIRAZE

Tako inhibitorji, ki delujejo na podenoto A, kot inhibitorji, ki delujejo na podenoto B DNA-giraze pri svojem delovanju izkoriščajo ključne korake v reakcijski poti encima.

Tako recimo inhibitorji GyrA stabilizirajo cepitveni kompleks med DNA, GyrA in C-terminalno domeno podenote B in s tem preprečijo, da bi DNA disociirala z encima.

Inhibitorji podenote B pa se vežejo v ATP-vezavni žep v N-terminalni domeni podenote B in blokirajo dostop molekul ATP in posledično prekinejo vir energije ter povzročijo izgubo aktivnosti encima (9).

Danes so fluorokinoloni kot inhibitorji GyrA edini uporabljeni girazni inhibitorji, ki se uporabljajo v terapiji bakterijskih okužb. Vendar se je zaradi neželenih učinkov, toksičnosti

in rezistence nekaterih bakterijskih sevov na fluorokinolone povečalo zanimanje za inhibitorje ATP-katalitične domene (9).

V nadaljevanju diplomske naloge smo se osredotočili na nekaj skupin inhibitorjev, ki delujejo na podenoto B DNA-giraze.

1.4.1. INHIBITORJI PODENOTE B DNA-GIRAZE

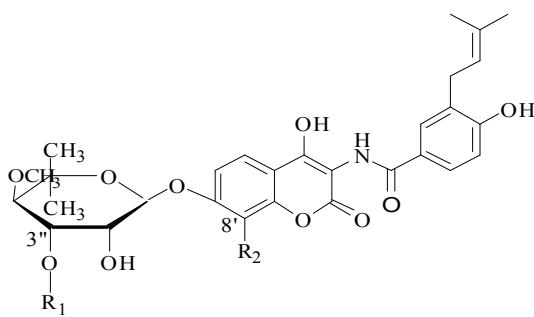
1.4.1.1. AMINOKUMARINI

Aminokumarini so spojine, ki vsebujejo 3-amino-4,7-dihidroksikumarinski obroč, ki služi kot nujni del ogrodja za delovanje na bakterijski tip topoizomeraze II – DNA-girazo in topoizomerazo IV. Predstavniki novobiocin, klorobiocin in kumermicin A₁ so naravni produkti izolirani iz vrste *Streptomyces* (14).

Čeprav se vežejo tesno na girazo, ne poročajo o njihovi signifikantni klinični uspešnosti (14). Novobiocin je bil registriran za klinično uporabo, vendar so ga hitro odstranili zaradi resnih toksikoloških učinkov. Strukturno podoben in celo z bolj močnim učinkom klorobiocin ni bil nikoli uporabljen v terapiji (15).

Z uporabo genetskega inžiniringa so proizvedli serijo analogov novobiocina. Strukture in rezultate lahko vidimo v Preglednici I. Ugotovili so, da je acilacija 3“-OH ključna za aktivnost, pri čemer uvedba MePC (5-metil-pirol-2-karbonil) na to mesto pomeni boljšo jakost delovanja kot uvedba karbamoila. Substitucija CH₃ ali Cl na mestu 8 vodi v večjo jakost, vendar je ta odvisna od narave acilne skupine na mestu 3“-OH. Za dobro sta se izkazali kombinaciji karbamoila in CH₃ ter MePC in Cl (novobiocin in klorobiocin) (16).

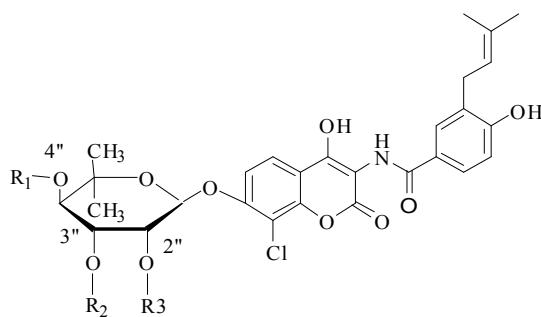
Preglednica I: Analogi novobiocina in njihove IC₅₀ vrednosti (16)



Spojina	R₁	R₂	IC₅₀ giraza
1	H-	-H	> 500 Mm
2		-CH ₃	> 500 Mm
3		-Cl	500 Mm
4	C=O NH ₂ karbamoil	-H	400 Mm
Novobiocin		-CH ₃	0,9 Mm
5		-Cl	1,9 Mm
6	H ₃ C MePC	-H	0,9 Mm
7		-CH ₃	0,2 Mm
Klorobiocin		-Cl	0,08 Mm

Kot je razvidno iz Preglednice II, so pripravili tudi analoge klorobiocina, kjer pa se modifikacije izkazale za slabše od klorobiocina. Testirali so derivate klorobiocina z ali brez metilne skupine na 4"-OH novobioze in z MePC na različnih mestih novobioze (mesti 2", 3" in 4") (16).

Preglednica II: Analogi klorobiocina in njihove IC₅₀ vrednosti (16)



Spojina	R₁	R₂	R₃	IC₅₀ giraza
klorobiocin	H ₃ C-	MePC-	H-	0,08 Mm
8	H-	MePC-	H-	2 Mm
9	H-	H-	MePC-	20 Mm

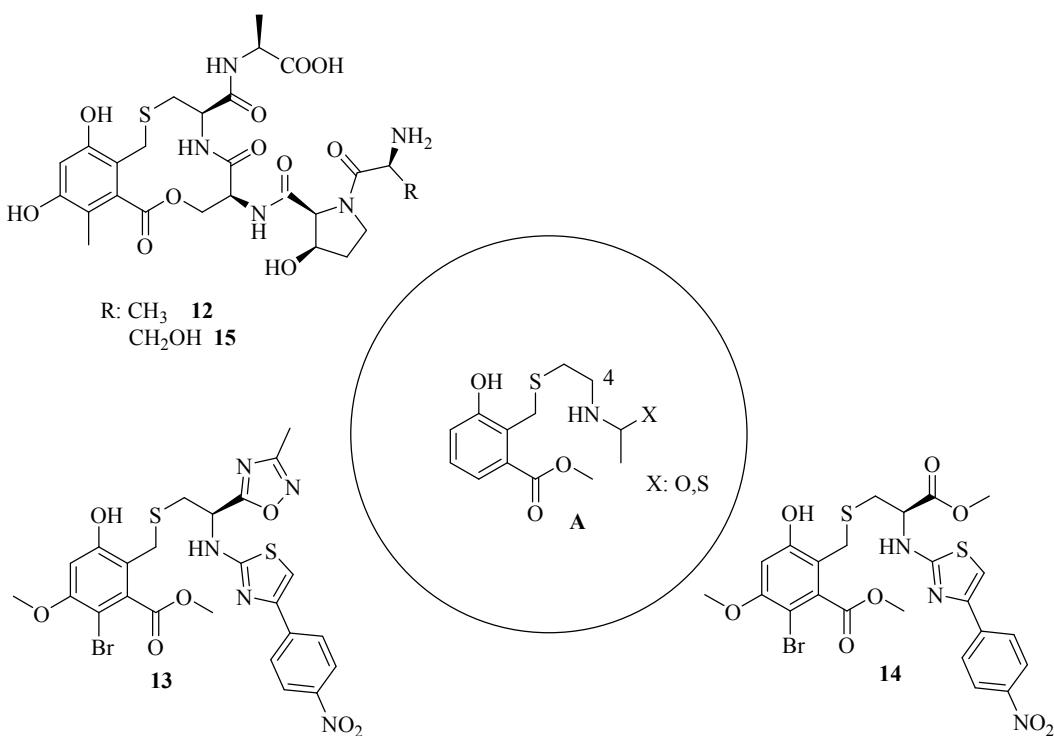
10	MePC-	H-	H-	100 Mm
11	H-	H-	H-	> 500 Mm

1.4.1.2. CIKLOTIALIDINI

So ciklični peptidi in vsebujejo 12-členske laktonske obroče s pentapeptidno verigo (Ala-Cys-Ser-Hyp-Ser) pripeto na resorcinol. Proizvajajo jih streptomicete (9).

Ciklotialidin ima 2-krat večjo protigrazno jakost v primerjavi z novobiocinom in je visoko selektiven za homologno evkariontsko topoizomerazo, vendar ima zaradi slabe penetracije šibko protimikrobno delovanje (9).

Podobno kot aminokumarini tudi ciklotialidin in njegov analog **12** (slika 5) inhibirata ATP-azno aktivnost DNA-giraze in se vežeta na N-terminalni 43 kDa fragment GyrB v stehiometričnem razmerju 1:1 (9).



Slika 5: Strukture ciklotialidinov in seko-ciklotialidinov (9)

Kristalografske študije kompleksa med GyrB in spojino **12** so pokazale, da so adeninski obroč (ATP), sladkor novioza (kumarin) in resorcinolski obroč (ciklotialidin) vpleteni v podobno mrežo vodikovih in hidrofobnih vezi s proteinom, kar razloži kompetitivni mehanizem teh inhibitorjev z ATP-jem (9).

Razvoj novejših derivatov ciklotialidina je pokazal, da ni le laktonski obroč ključnega pomena za protigirazno aktivnost, ampak tudi R-stehiometrija na mestu 4 (glej sliko 5, strukturni fragment A) (9).

Seko-ciklotialidini so zelo aktivni in selektivni DNA girazni inhibitorji, ki imajo "odprt" laktonski obroč. Primerna substitucija na mestu 4 pri spojini **13** (Hoffman La Roche; slika 5) in pri spojini **14** (Bayer; slika 5) močno izboljša prehajanje preko bakterijske celične stene. Izkazujejo zelo dobro protibakterijsko aktivnost proti G+ bakterijam v primerjavi z začetnim ciklotialidinom **15**. Po drugi strani pa imata inhibitorja **13** in **14** slabo aktivnost pri infekciji s *S. aureus* pri miših (9).

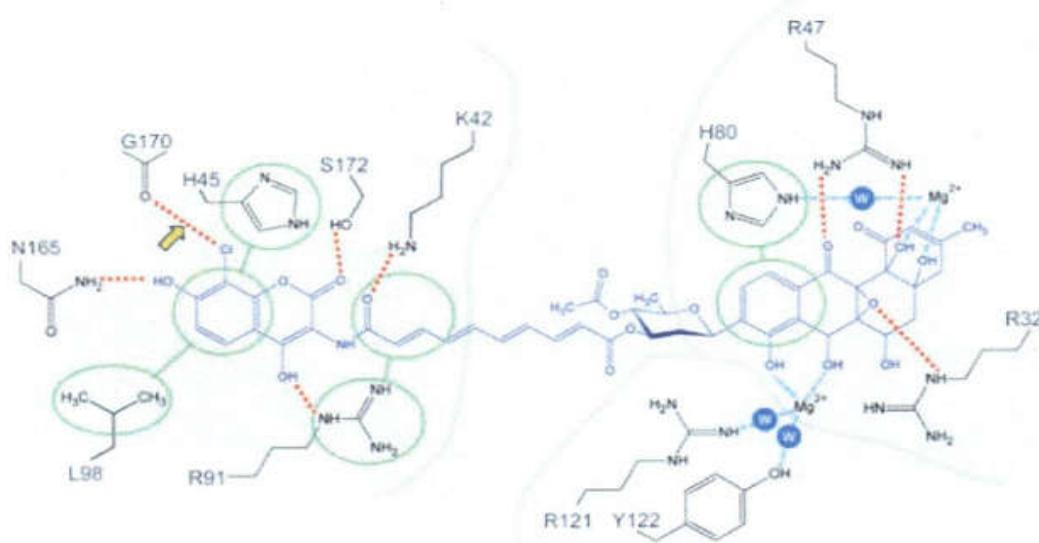
1.4.1.3. SIMOCIKLINONI

Simociklinoni so hibridni antibiotiki, ki vsebujejo tako aminokumarinski del kot poliketidne elemente. Veliko variant simociklinona proizvajajo bakterije *Streptomyces antibioticus* Tü 6040 in so večinoma intermediati simociklinona D8 (SD8) (17). SD8 ima protibakterijsko učinkovitost in je najbolj učinkovit proti Gram pozitivnim organizmom, kot je *Streptomyces viridochromogenes* Tü 57 in je neaktivен proti Gram negativnim bakterijam. SD8 ima tudi izrazito citotoksično aktivnost proti tumorskim celičnim linijam pri človeku (18).

Navkljub njihovi sorodnosti s klasičnimi aminokumarini pa SD8 ne cilja na ATP-vezavno mesto na GyrB, ki je locirano znotraj N-terminalne domene, ampak se veže na N-terminalno domeno GyrA v regiji, kjer se veže tudi DNA. Našli pa so tudi dokaze za drugo vezavno mesto na C-terminalni domeni GyrB (19).

Učinek SD8 doseže tako, da prepreči vezavo DNA. SD8 je "dvoglavi" antibiotik, saj se veže z aminokumarinskim in poliketidnim delom z dvema ločenima vezavnima žepoma v N-terminialnem delu GyrA. Določitev kristalne strukture razkriva, da štiri molekule simociklinona D8 stabilizirajo tetramer GyrA tako, da je ena molekula SD8 kot most med dvema monomeroma GyrA (20).

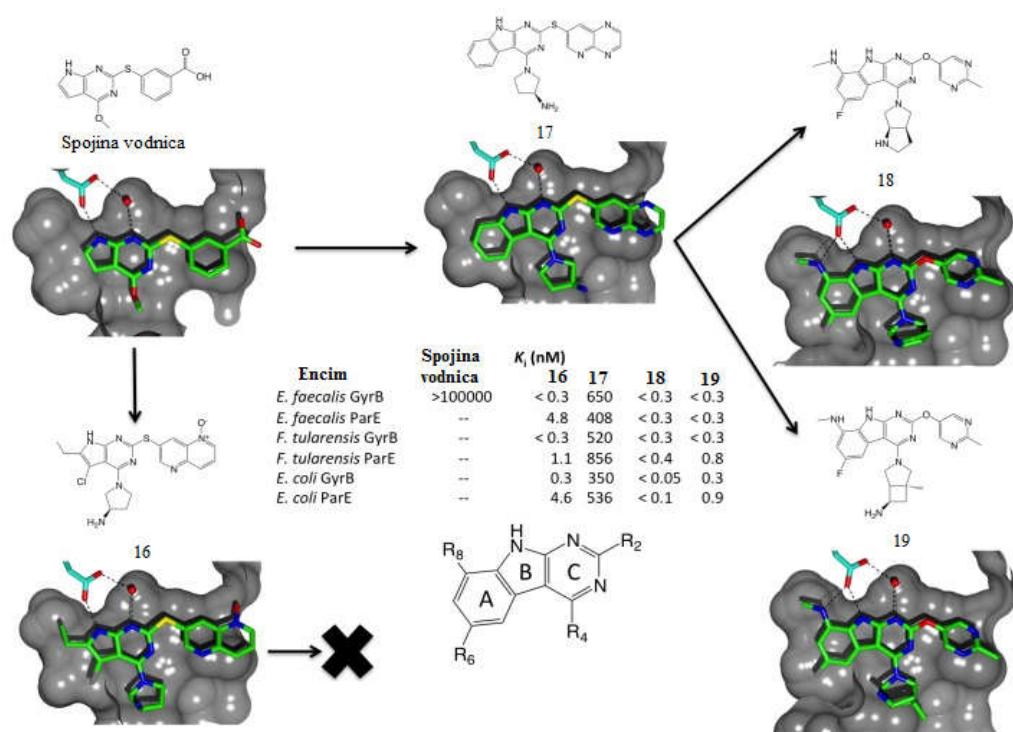
Način vezave simociklinona lahko vidimo na spodnji sliki 6.



Slika 6: Vezava simociklinona v vezavnem mestu na DNA-girazi: rdeče pikaste linije predstavljajo vodikove vezi in edino halogensko vez (označena z rumeno puščico), modre pikaste linije prikazujejo interakcije z Mg²⁺ ioni, modri krogec z W prikazuje interakcije z vodnimi molekulami, skupine, ki so obkrožene z zeleno barvo prikazujejo nevezne interakcije (20)

1.4.1.4. TRICIKLIČNE SPOJINE S PIRIMIDOINDOLSKO OSNOVO

Triciklične spojine s pirimidoindolsko osnovno so inhibitorji, ki spadajo v novejši razred inhibitorjev z dvojno tarčo, saj delujejo na GyrB/ParE (ParE je podenota pri topoizomerazi IV in je ekvivalentna GyrB podenoti pri DNA-girazi). Inhibitorji izkazujejo visoko jakost učinka in imajo širok spekter delovanja, saj delujejo proti številnim bakterijskim patogenom vključno na rezistentne seve, kot so *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* in *Klebsiella pneumoniae*. Na podlagi analize vezavnega mesta na GyrB pri *Enterococcus faecalis* so se odločili za optimizacijo pirolopirimidinskega ogrodja in tako dobili inhibitor **16** z dobro aktivnostjo. Nadaljna širitev bicikličnega pirolopirimidina do tricikličnega pirimidoindolnega obročnega sistema je privedla do spojine **17** in omogoča zapolnitve notranjega lipofilnega žepa ter ponuja odlično optimizacijo za izboljšanje encimske učinkovitosti. Naknadna obdelava tricikličnega obroča z dodatkom F na R6 in aminometilno skupino na R8 bistveno izboljša inhibitorno delovanje. Takšni sta spojini **18** in **19**, ki sta pokazali učinkovitost tudi *in vivo* v različnih mišjih modelih. Serija tricikličnih inhibitorjev je v nadaljnji optimizaciji in predkliničnih študijah (21). Strukture teh spojin lahko vidimo na spodnji sliki 7.



Slika 7: Strukture inhibitorjev 16, 17, 18 in 19 (21)

Spojine so izkazale tudi visoko selektivnost do bakterijskih tarč v primerjavi z evkariontskimi ATP vezavnimi proteini, kot sta protein kinaza in humana topoizomeraza II, kar nakazuje na to, da ne povzročajo toksičnosti za gostitelja (21).

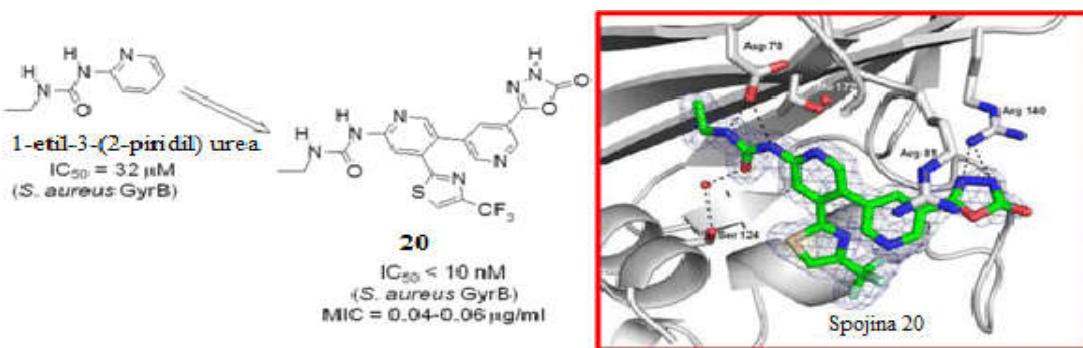
1.4.1.5. DERIVATI 2-PIRIDILUREE

Derivati 2-piridiluree so bili izdelani z namenom izboljšanja fizikalnih lastnosti.

Optimizacija ogrodja 2-piridiluree se je skoncentrirala na povečanje topnosti, zmanjšanju vezave na plazemske proteine in zmanjšanju metabolizma (22).

Pri sintezi spojine **20** so, kot lahko vidimo na sliki 8, izhajali iz 1-etil-3-(2-piridil)uree, ki je že sama izkazovala neko encimsko inhibicijo. Na mesto 5 v piridilu so nato uvedli karboksilno skupino in njene izostere, s čimer so izboljšali inhibicijo encima in s tem protibakterijsko aktivnost. Substituent CF₃-tiazol so uvedli na mesto 4 piridila, kar je privedlo do izboljšane jakosti inhibicije zaradi hidrofobne interakcije. Obetavna protimikrobnna aktivnost se je pokazala proti G+ patogenom, kot sta *Staphylococcus aureus* in *Streptococcus pneumoniae* ter proti G- patogenom, kot sta *Haemophilus influenzae* in *Moraxella catarrhalis* (22).

Študije potrjujejo doseganje inhibicije s preprečitvijo sinteze DNA (22).



Slika 8: Struktura spojine 20 in vezava le-te v vezavno mesto (22)

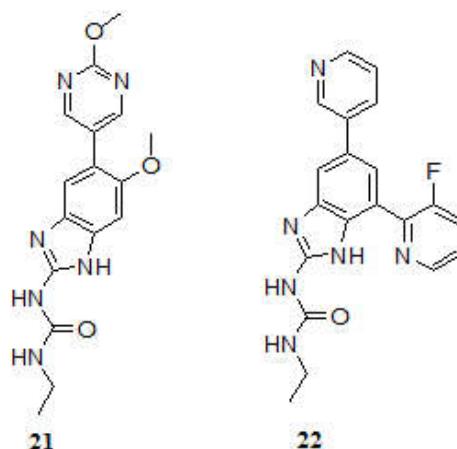
1.4.1.6. SPOJINE S PIRIMIDINSKO OSNOVO

Uria-Nickelsen opisuje set spojin s pirimidinsko osnovo, ki imajo protimikrobnou aktivnost proti G+ patogenom (vključno z na meticilin rezistenten *S.aureus*, na kinolon in meticilin rezistenten *S.aureus*, na vankomicin rezistentne enterokoke, na penicilin neobčutljiv *S.pneumoniae* in *Streptococcus pyogenes*) in G- patogenom (*Haemophilus influenzae* in *Moraxella catarrhalis*). Te spojine imajo dvojno tarčo, saj inhibirajo tako podenoto ParE DNA-topoizomeraze IV kot podenoto GyrB DNA-giraze (23).

Mikrobiološke lastnosti in učinkovitost *in vivo* poudarjajo potencial teh spojin kot kandidatov za zdravljenje okužb mehkih tkiv in bolnišnične pljučnice (23).

1.4.1.7. SPOJINE Z AMINOBENZIMIDAZOLSKIM OGRODJEM

Grossman je več let proučeval inhibitorje z aminobenzimidazolskim ogrodjem. Iskali so novo serijo aminobenzimidazolov, ki inhibira ključno aktivnost ATP-aze bakterijske DNA-giraze in topoizomeraze IV ter kaže močno aktivnost proti številnim bakterijskim patogenom. Sintetizirali so dve takšni spojini: **21** in **22** (slika 9). Obe spojini inhibirata negativno superzvitje pri plazmidu v *E.coli*. Spojina **21** pa poleg tega inhibira tudi DNA in RNA-sintezo ter ima majhen učinek tudi na sintezo proteinov (24).



Slika 9: Strukturi inhibitorjev 21 in 22 z aminobenzimidazolskim ogrodjem (24)

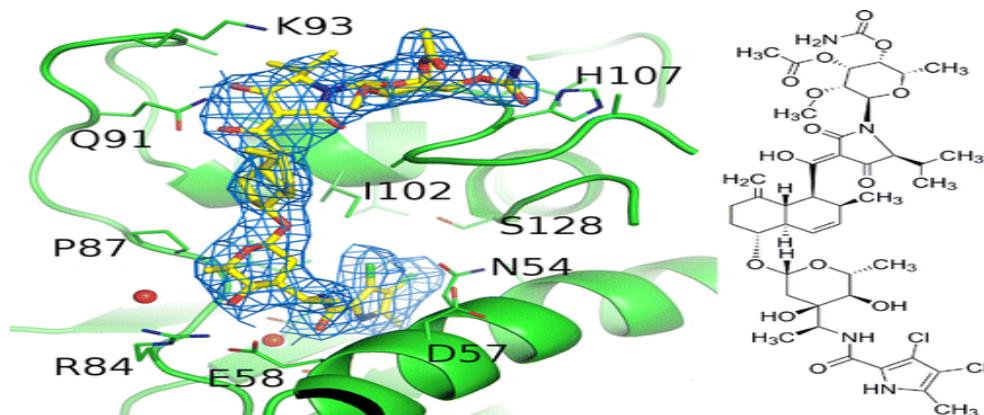
Kažejo učinek proti *E.coli*, *S.aureus*, *S.pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* in *H.influenzae* (24).

1.4.1.8. NARAVNI PRODUKT KIBDELOMICIN

Za kibdelomicin so najprej poročali, da povzroča protibakterijsko aktivnost proti G+ organizmom, vključno s *S.aureus* z mehanizmom inhibicije, ki je podoben aminokumarinom. Kibdelomicin namreč inhibira bakterijsko sintezo DNA preko specifične inhibicije girazne podenote B (25).

V poročilu so opisali tudi kibdelomicin A, ki je demetilirana sorodna spojina kibdelomicina. Je potencialni inhibitor DNA-giraze in topoizomeraze IV, inhibira sintezo DNA in kaže antibiotično aktivnost v celici, čeprav šibkeje kot kibdelomicin (25).

Pri strukturi kibdelomicina se je za najbolj pomemben del ogrodja izkazala pirolamidna skupina, saj zaseda isti žep kot adeninski del molekule ATP-ja. Substitucija tega obroča na mestih 3 in 4 s klorom pa pripomore k večji hidrofobni interakciji v vezavnem žepu (26).



Slika 10: Vezava in struktura kibdelomicina (28)

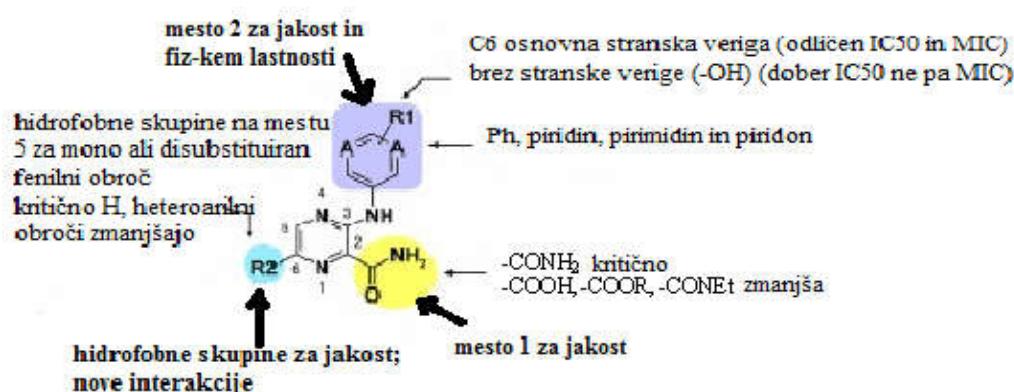
Kot lahko vidimo na zgornji sliki 10, se kibdelomicin pri vezavi oblikuje v posebno oz. unikatno konformacijo dvojnih rok (dual arm) obliko. Lahko rečemo, da zavzame obliko črke U. Pirolamidni del v spodnjem delu molekule vstopa globoko v ATP-vezavni žep, medtem ko izopropiltetramična kislina in slatkorni del v zgornjem delu vstopita v polarne interakcije s površino proteina. Ta način vezave je unikaten, saj ga ne zasledimo pri drugih poznanih giraznih inhibitorjih in je tudi razlog za nizko frekvenco pojava odpornosti (27).

1.4.1.9. AMINOPIRAZINAMIDI

Aminopirazinamidi prikazujejo specifičnost za Gyr B iz *M.tuberculosis*. Struktura kompleksa GyrB z aminopirazinamidom je pokazala obetajočo specifičnost proti širokemu spektru patogenov in selektivnost proti evkariontskim kinazam zaradi novih interakcij v hidrofobnem žepu, česar pri ostalih giraznih inhibitorjih ne zasledimo (29).

Iz SAR-a aminopirazinamidov (slika 11) lahko ugotovimo, da gre za tri pomembna področja v molekuli, ki omogočajo interakcijo z GyrB:

- mesto-1 (tu je ključen primarni amid, ki je vključen v H-vez z Asp79; ustrezni ester, kislina ali sekundarni amid niso pokazali encimske inhibicije),
- mesto-2 (arilna ali heteroarilna skupina je vključena v pi-interakcije z argininskim ostankom, ki je vpletен tudi v tvorbo H-vezi bodisi s O iz etra stranske verige bodisi z N v arilnem obroču) in
- hidrofobne interakcije na mestu 5 fenilnega obroča (29).



Slika 11: SAR aminopirazinamidov (30)

Ugotovili so, da je ključno za aktivnost to, da je stranska veriga pripeta na aril ali heteroaril na mestu-2. Za encimsko aktivnost je potreben substituiran fenilni obroč na C6 mestu

pirazinskega obroča, bolje disubstituiran kot monosubstituiran. Zamenjava fenilnega obroča s heteroarilnim na C6 pa pomeni popolno izgubo aktivnosti (30).

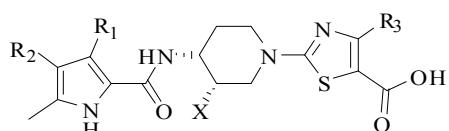
1.4.1.10. PIROLAMIDI

Inhibitorji iz razreda pirolamidov zavirajo ATP-azno aktivnost in tako delujejo na *M. tuberculosis* (30).

NH na pirolu in karbonilna skupina tvorita H-vezi z Asp118 in Ser208. Tiazolni obroč pripet na piperidinski N kaže pi-kationske interakcije z Arg180 v aktivnem mestu Gyr B pri *M. Tuberculosis*. Piperidinski obroč v konformaciji stola pomaga za dosego optimalnih interakcij v aktivnem mestu Gyr B (30).

V Preglednici III so zbrane določene modifikacije na pirolamidi.

Preglednica III: Derivati pirolamidov in njihove IC₅₀ vrednosti (ND = ni določeno) (30)



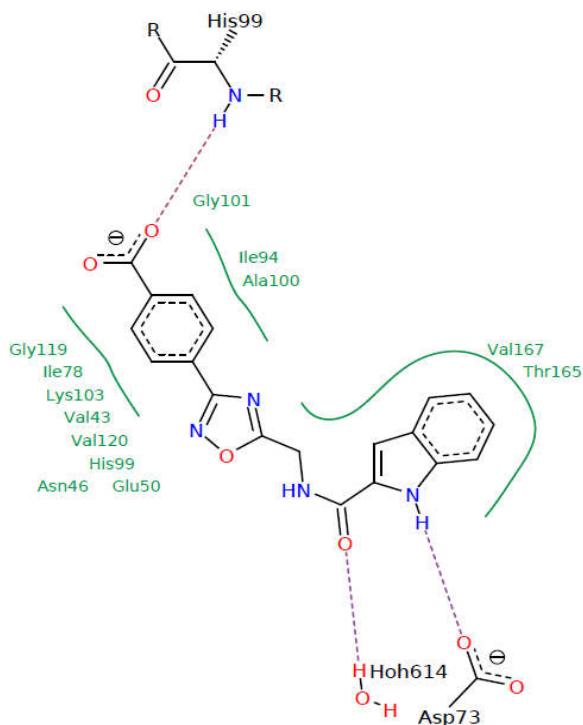
Spojina	R1	R2	X	R3	<i>M. smegmatis</i> GyrB	<i>M. tuberculosis</i> GyrB	<i>M. tuberculosis</i> gyrase	<i>M. tuberculosis</i> H37Rv
					ATPase IC ₅₀ (nM)	K _D (nM)	SC IC ₅₀ (nM)	MIC (µg/ml)
23	Cl	Cl	H	-	164	ND	ND	1.000
24	Cl	Cl	OCH ₃	-	6	ND	ND	0.250
25	Br	Cl	OCH ₃	-	5	ND	ND	0.063
26	Br	Cl	OCH ₃	-	5	0.5	<5	0.031
27	Cl	Br	OCH ₃	-	5	ND	<5	0.063
28	Br	Cl	OCH ₂ CH ₃	-	<2	0.3	<5	0.015
29	Br	Cl	OCH ₃	-	5	0.4	<5	0.031
30	Br	Cl	OCH ₃	-	<2	0.2	<5	0.031
31	Br	Cl	OCH ₃	-	<2	0.6	<5	0.031

Zamenjava H-atoma na mestu 3 piperidina z metoksi skupino je pripomogla k izboljšanju učinkovitosti zaradi tvorbe interakcij s sladkorjem in fosfatom v aktivnem mestu encima. Vpeljava broma v pirolni obroč rezultira v zmernem povečanju jakosti. Tako izboljšanje je bilo prisotno v vseh 3-bromo-4-kloro pirolnih derivatih (30).

2. NAMEN DELA

V okviru diplomskega dela bomo sintetizirali potencialne zaviralce DNA-giraze z delovanjem na podenoto B, pri čemer bomo izhajali iz spojin 3- in 4-ciano benzojske kisline ter jih ustrezeno fizikalno-kemijsko in spektroskopsko ovrednotili, določili pa bomo tudi njihovo inhibitorno delovanje na tarčni encim.

Na podlagi rezultatov sidranja spojin z računalniškim programom FlexX (LeadIT 2.1.3 (BioSolveIT)) (slika 13) in že poznane povezave med strukturo in delovanjem spojin z vezavo na podenoto B DNA-giraze, ki smo jo predstavili v uvodu tega dela, smo se odločili za sintezo derivatov 3- in 4-ciano benzojske kisline.



Slika 12: Sidranje spojine v vezavno mesto na podenoti B DNA-giraze

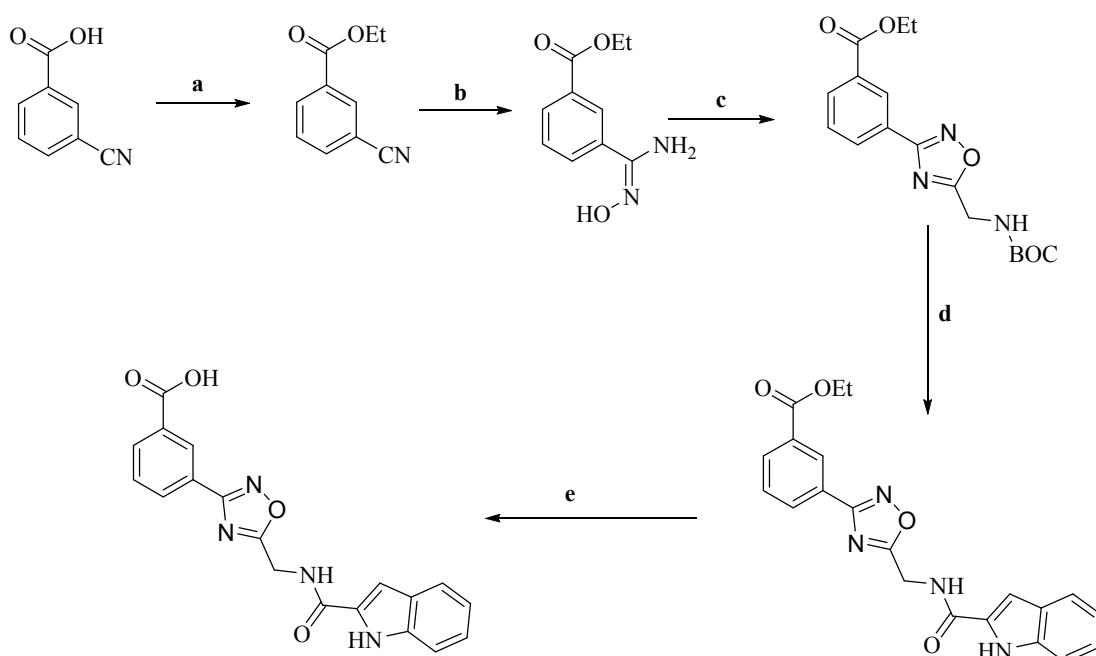
Iz izhodnih spojin, 3- in 4-ciano benzojske kisline, bomo najprej pripravili etilna estra 3- in 4-ciano benzojske kisline. Iz estrov bomo tvorili amidoksima: etil 3-(amino(hidroksiimino)metil)benzoata in etil 4-(amino(hidroksiimino)metil)benzoata. V naslednji reakciji bomo iz amidoksimov pripravili 3,5-disubstituirane-1,2,4-oksadiazolske obroče. Nato bo sledila hidroliza esterske vezi s pomočjo 4 M NaOH, po nakisanju pa bomo tako dobili ustrezeni kislini.

Predpostavljam, da bodo reakcije z različnimi AK in izomeri potekale z različnimi izkoristki in bo tudi čas reakcije različen.

Če bo potrebno bomo postopke optimizirali z izbiro ustreznih reagentov in izbiro postopkov izolacije.

2.1. REAKCIJSKI SHEME

Reakcijska shema 1:



a: CC(C)(Br)O[Et]/KF

b: NH2OH x HCl/Et3N

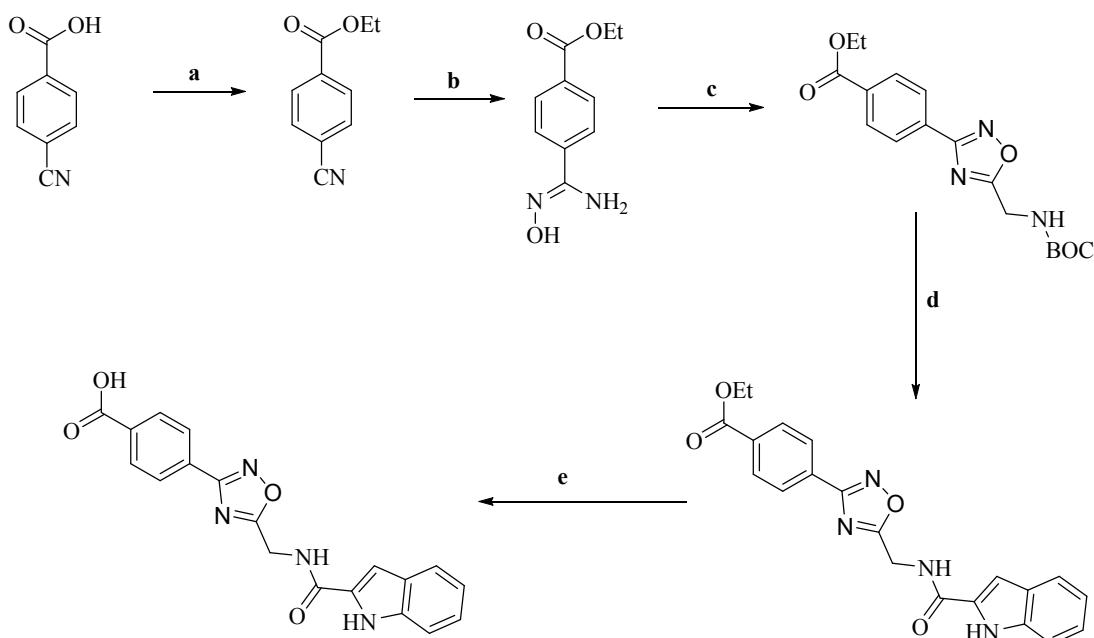
c: BOC-Gly (BOC-Ala), DCC (TBTU)

d: indol-2-karboksilna kislina, TBTU

e: 1. NaOH, abs. EtOH

2. voda, HCl, etilacetat

Reakcijska shema 2:



3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

3.1.1. Reagenti in topila

Pri eksperimentalnem delu v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Fluka (Švica), Merck (Nemčija), Sigma Aldrich (ZDA) in Acros organics (Belgija). Reagenta BOC-Gly in BOC-Ala sta bila sintetizirana na Fakulteti za farmacijo. Vsi reagenti so imeli najmanj 95 % čistost.

Poimenovanje in risanje struktur

Za risanje struktur in njihovo poimenovanje smo uporabljali program ChemBioDraw 13.0, proizvajalca CambridgeSoft.

3.1.2. Laboratorijska oprema

Pri izvedbi reakcij za diplomsko delo smo uporabljali naslednjo laboratorijsko opremo:

- magnetno mešalo z grelnikom IKA Labortechnik RCT basic
- rotavapor Büchi Rotavapor R-114, Švica
- tehtnico Mettler Toledo PG 803
- analitsko tehtnico Mettler Toledo AG245
- UV svetilko Lamag UV-CABINET II, Nemčija
- žarilno pištolo SKILL 1800 Watt
- steklovina različnih proizvajalcev

3.2. Metode

3.2.1. Kromatografske metode

- **Tankoplastna kromatografija**

Tankoplastno kromatografijo smo potrebovali za spremljanje poteka reakcij, izolacij ter jih neposredno uporabljali pri spremljanju poteka kolonske kromatografije. Pri tem smo uporabili plošče DC Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu velikosti 20x20 cm proizvajalca Merck (Nemčija). Za mobilne faze smo uporabili različna topila v različnih razmerjih. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščicah smo uporabili UV svetilko z valovnima dolžinama $\lambda=254$ nm in $\lambda=366$ nm. Kot orositvena reagenta pa smo uporabili ninhidrin in bromkrezol zeleno. S pomočjo ninhidrina smo detektirali amine, z bromkrezol zelenim pa kisline.

- **Kolonska kromatografija**

Kolonsko kromatografijo smo uporabili za čiščenje spojin. Uporabili smo steklene kolone različnih velikosti. Za stacionarno fazo smo uporabili Silikagel 60 (Kieselgel 60) s premerom delcev 0,040-0,063 mm (flash silikagel) proizvajalca Merck (Nemčija). Za mobilno fazo pa smo uporabili različna topila: kloroform in metanol.

- **Mobilne faze**

Pri kolonski in tankoplastni kromatografiji smo uporabili naslednje mobilne faze:

MF 1: kloroform/metanol = 9/1

MF 2: heksan/etilacetat = 3/2

MF 3: butanol/ocetna kislina/voda = 5/1/4

3.2.2. Spektroskopske metode

- **Jedrska magnetna resonanca (NMR)**

^1H NMR spektri so bili posneti na spektrometu Brucker UltraShieldTMPlus pri 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Uporabljali smo devterirani topili CDCl_3 in DMSO-d_6 . Za računalniško obdelavo spektrov smo uporabili program MestRec 4.8.6. proizvajalca Mestrelab Research.

- **Infrardeča spektroskopija (IR)**

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

- **Masna spektroskopija (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)**

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

3.2.3. Določanje tališča

Tališča spojin smo določili s talilnim mikroskopom znamke Leica z ogrevalno mizico na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Tališča niso korigirana.

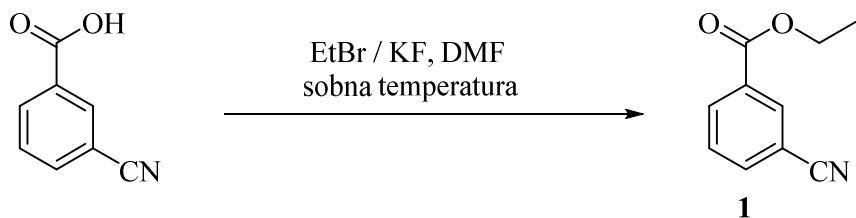
3.2.4. Biološko testiranje spojin

In vitro testiranje spojin na inhibicijo giraze B iz *E.coli* so izvedli na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakulteta za farmacijo. Za testiranje je bil uporabljen set *E.coli* mikroplošč podjetja Spiralis. Set je vseboval encim girazo, substrat DNA plazmida, pufer za redčenje encima, pufer za določanje aktivnosti, pufer za spiranje in oligonukleotid. Postopek za določanje aktivnosti se izvaja po patentu podjetja Plant Biosciences Ltd (31). Vrednosti IC₅₀ smo ocenili s testiranjem pri 10 µM in 100 µM koncentracijah učinkovin.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. SINTEZA ETILNEGA ESTRA 3-CIANO BENZOJSKE KISLINE (1)

Reakcija:



Postopek:

Zmes 12,00 g (81,63 mmol) 3-ciano benzojske kisline, 7,11 g (122,38 mmol) KF; 9,12 mL (122,38 mmol) EtBr in 220 mL DMF mešamo 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji dodamo 50 mL nasičene raztopine NaHCO₃ in ekstrahiramo 3-krat s 100 mL etra. Organsko fazo sušimo z MgSO₄, filtriramo in topilo uparimo pri znižanem tlaku. Produkt je viskozna tekočina, ki na hladnem preide v trdno fazo.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 85,7 % (12,25 g)

Rf: 0,82 (MF: diklorometan/metanol : 9/1), orositveni reagent: bromkrezol zeleno

T_{tališča}: 48-50 °C

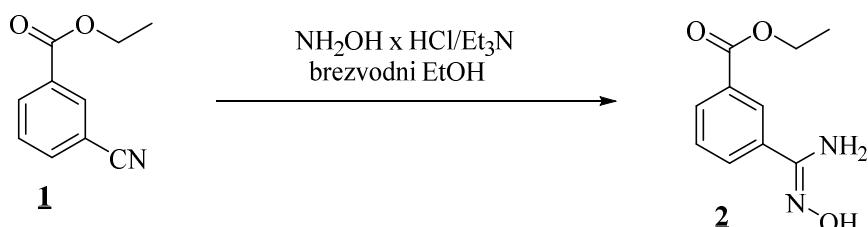
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 1,40 (t, 3H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 4,40 (q, 2H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 7,56 – 7,60 (m, 1H, Ar-H), 7,81 – 7,83 (m, 1H, Ar-H), 8,25 – 8,27 (m, 1H, Ar-H), 8,31 (s, 1H, Ar-H)

IR (Kbr, cm⁻¹): 3067, 2985, 2909, 2227, 1718, 1606, 1579, 1479, 1432, 1395, 1366, 1283, 1190, 1173, 1119, 1106, 1023, 934, 915, 863, 821, 780, 747, 681, 667

MS (ESI): 176,1 (M+H)⁺, **Mr(izračunana):** 175

4.2. SINTEZA ETIL 3-(AMINO-(HIDROOKSIIMINO)-METIL) BENZOATA (2)

Reakcija:



Postopek:

17,38 g (250,13 mmol) hidroksilamonijevega klorida dodamo 34,81 mL (250,13 mmol) Et₃N v prebitku (5 %) in raztopimo v 210 mL brezvodnega EtOH ter pustimo mešati 10 minut. Nato dodamo 12,25 g (70,00 mmol) etilnega estra 3-ciano benzojske kisline (**1**) in reakcijsko zmes segrevamo pri 50 °C 4 ure.

Po končani reakciji odparimo topilo, zaostanku dodamo 150 mL etilacetata. Speremo z vodo (3-krat 50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (3-krat 50 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄. Sušilno sredstvo odfiltriramo in odparimo topilo. Produkt prelijemo z etrom in izpadlo oborino filtriramo z odsesavanjem. Spojino dodatno čistimo s spiranjem z etrom. Dobimo bel trden produkt.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 81,2 % (11,82 g)

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

T_{tališča}: 117-119 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,42 (t, 3H, *J* = 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 4,41 (q, 2H, *J* = 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 5,18 (rs, 2H, -NH₂), 7,47 – 7,51 (m, 1H, Ar-H), 7,86 – 7,88 (m, 1H, Ar-H), 8,10 – 8,12 (m, 1H, Ar-H), 8,29 (s, 1H, Ar-H)

IR (cm⁻¹): 3450, 3358, 2979, 1705, 1667, 1601, 1474, 1398, 1364, 1275, 1154, 1125, 1110, 1022, 948, 913, 864, 822, 762, 696, 655, 512, 460, 434

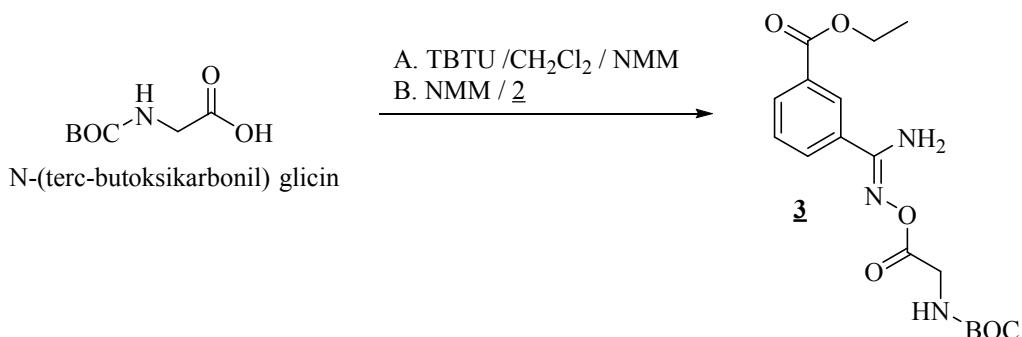
Elementna za C₁₀H₁₂N₂O₃: izračunana ugotovljena

%C	57,70	57,72
%H	5,82	5,77
%N	13,46	13,70

MS (ESI): 209,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 208

4.3. SINTEZA ETIL 3-(N'((TERC-BUTOXIKARBONIL) GLICIL) OKSI) KARBAMIMIDOIL) BENZOATA (**3**)

Reakcija:



Postopek:

V bučko zatehtamo 6,94 g (39,66 mmol) N-(terc-butoxyskarbonil) glicina (BOC-Gly) in 12,73 g (39,66 mmol) TBTU, ju raztopimo v 100 mL diklorometana in dodamo 9,69 mL (88,14 mmol) NMM. Po eni uri mešanja dodamo še 4,85 mL (44,07 mmol) NMM in 5,50 g (26,44 mmol) etil-3-(amino-(hidroksiimino)-metil) benzoata (**2**) ter segrevamo pri temperaturi 50 °C. Po končani reakciji topilo odparimo, spojino **3** izoborimo iz diklorometana in jo posušimo v sušilniku pri 50 °C.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 94,5 % (9,12 g)

Rf: 0,45 (MF: heksan/etilacetat : 3/2, orositveni reagent: ninhidrin)

T_{tališča}: 116-120 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 1,42 (t, 3H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 1,48 (s, 9H, -3CH₃), 4,17 (d, 2H, J= 6,0 Hz, -NH-CH₂-), 4,41 (q, 2H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 5,24 – 5,35 (rs, 1H, -NH-CH₂-), 5,47 – 5,62 (rs, 2H, NH₂) 7,51 – 7,54 (m, 1H, Ar-H), 7,95 – 7,97 (m, 1H, Ar-H), 8,16 – 8,17 (m, 1H, Ar-H), 8,31 (s, 1H, Ar-H).

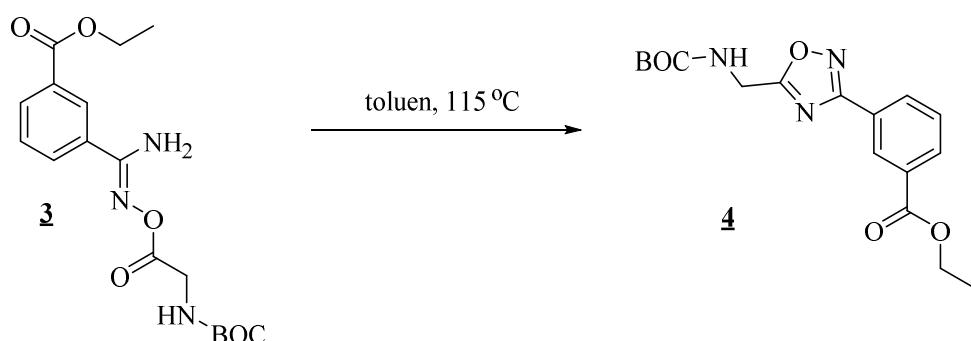
IR (KBr, cm⁻¹): 3904, 3854, 3822, 3806, 3677, 3478, 3376, 3298, 3062, 2977, 2949, 2912, 2363, 2345, 1758, 1725, 1707, 1676, 1670, 1637, 1600, 1572, 1560, 1523, 1490, 1450, 1439, 1401, 1371, 1280, 1248, 1157, 1113, 1052, 1019, 948, 927, 893, 864, 824, 785, 764, 704, 686, 670, 648, 548, 502, 458, 406

Elementna za C ₁₇ H ₂₃ O ₆ N ₃ :	izračunana	ugotovljena
%C	55,89	55,86
%H	6,30	6,14
%N	11,51	11,50

MS (ESI): 364,15 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 365

4.4. SINTEZA ETIL 3-((TERC-BUTOXIKARBONIL)AMINO)METIL-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (**4**)

Reakcija:



Postopek:

9,00 g (24,66 mmol) spojine etil 3-(N'-((terc-butoxikarbonil) glicil) oksi) karbamimidoil) benzoata (**3**) raztopimo v 200 mL toluena in prepihamo z argonom. Zmes segrevamo ob refluksu na 115 °C, dokler s tankoplastno kromatografijo ne zaznamo izhodne spojine (**4**)

ure). Po končani reakciji topilo odparimo pod znižanim tlakom ter dobljeno oborino prelijemo z etrom.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 89,9 % (7,69 g)

Rf: 0,60 (MF: heksan/etilacetat : 3/2)

T_{tališča}: 65-68 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 1,45 (t, 3H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 1,51 (s, 9H, 3CH₃), 4,44 (q, 2H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 4,68 (d, 2H, J= 5,7 Hz, -NH-CH₂), 5,29 (rs, 1H, -NH-CH₂), 7,57 – 7,61 (m, 1H, Ar-H), 8,20 – 8,22 (m, 1H, Ar-H), 8,27 – 8,29 (m, 1H, Ar-H), 8,75 (s, 1H, Ar-H)

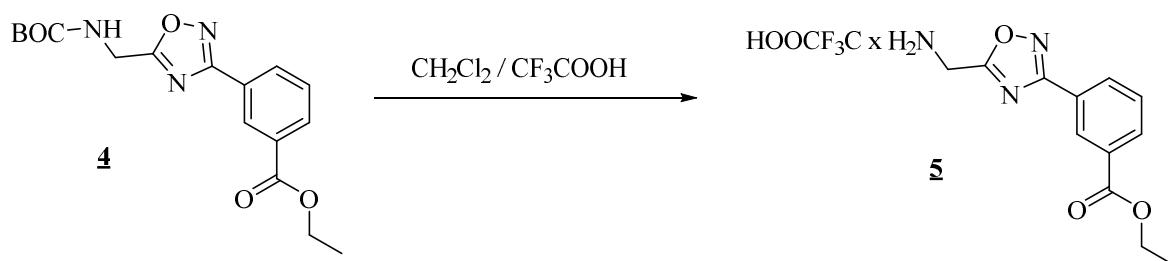
IR (KBr, cm⁻¹): 3904, 3854, 3822, 3367, 3077, 3029, 2988, 2939, 2906, 2797, 2578, 2363, 2344, 1980, 1928, 1718, 1679, 1610, 1596, 1579, 1560, 1527, 1461, 1446, 1436, 1395, 1370, 1353, 1320, 1285, 1257, 1167, 1131, 1093, 1082, 1055, 1030, 1002, 974, 941, 915, 901, 880, 863, 824, 793, 772, 762, 736, 712, 682, 660, 634, 594, 469, 434, 420

Elementna za C₁₇H₂₁N₃O₅:	izračunana	izmerjena
%C	58,78	58,75
%H	6,05	6,20
%N	12,10	12,11

MS (ESI): 348,15 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 347

4.5. SINTEZA ETIL 3-(5-(AMINOMETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA v obliki soli s TRIFLUOROOOCETNO KISLINO (5)

Reakcija:



Postopek:

V bučko smo natehtali 6,00 g (17,29 mmol) etil 3-((terc-butoksikarbonil)amino)metil-1,2,4-oksadiazol-3-il benzoata (**4**), jo raztopili v 100 mL diklorometana ter ohladili na ledeni kopeli. Nato smo dodali 10,05 mL trifluoroocetne kisline in pustili mešati na sobni temperaturi 3 ure. Zmes odparimo pod znižanim tlakom in prelijemo z etrom ter to ponovimo 3-krat.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 68,9 % (4,31 g)

Rf: 0,04 (MF: kloroform/metanol : 9/1; detekcija: ninhidrin)

T_{tališča}: 133-136 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1,36 (t, 3H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 4,39 (q, 2H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 4,65 (rs, 2H, -NH₂), 7,78 – 7,82 (m, 1H, Ar-H), 8,21 – 8,23 (m, 1H, Ar-H), 8,31 – 8,33 (m, 1H, Ar-H), 8,60 (s, 1H, Ar-H), 8,78 (rs, 3H, -NH₃⁺)

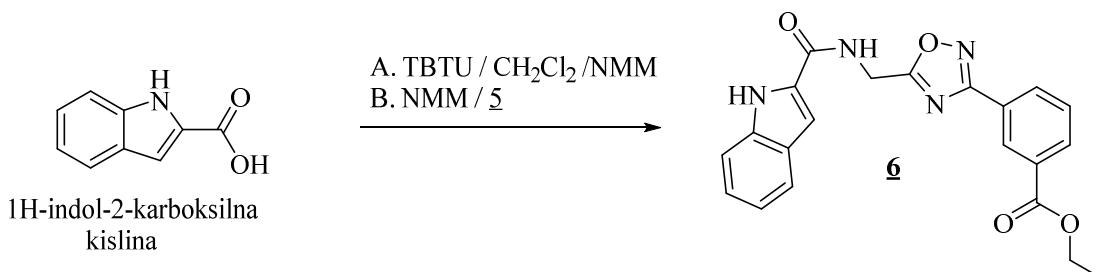
IR (cm⁻¹): 3904, 3854, 3840, 3822, 3807, 3677, 3368, 3004, 2943, 2751, 2654, 2363, 2344, 2149, 1717, 1673, 1615, 1600, 1560, 1542, 1522, 1474, 1458, 1448, 1426, 1394, 1364, 1344, 1287, 1274, 1197, 1169, 1154, 1141, 1134, 1101, 1038, 1022, 1000, 925, 911, 892, 848, 838, 799, 774, 731, 722, 685, 670, 657, 602, 550, 518, 497, 436

Elementna za C ₁₂ H ₁₃ N ₃ O ₃ .CF ₃ COOH:	izračunana	izmerjena
%C	46,54	46,59
%H	3,88	3,71
%N	11,63	11,36

MS (ESI): 248 ((M+H)⁺ -CF₃COOH), **Mr (izračunana):** 247 (M -CF₃COOH)

4.6. SINTEZA ETIL 3-((1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL BENZOAT (6)

Reakcija:



Postopek:

V bučko zatehtamo 750 mg (4,65 mmol) indol-2-karboksilne kislino in 1,49 g (4,65 mmol) TBTU, ju raztopimo v 50 mL diklorometana in dodamo 1,14 mL (10,34 mmol) NMM. Po eni uri mešanja dodamo še 1,14 mL (10,34 mmol) NMM in 1,12 g (3,11 mmol) etil 3-(aminometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il benzoata v obliki soli s trifloroocetno kislino (**5**) ter segrevamo pri temperaturi 50 °C. Po končani reakciji topilo odparimo, spojino **6** izoborimo iz diklorometana in jo posušimo v sušilniku pri 50 °C.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 13,3 % (161 mg)

Rf: 0,38 (MF: heksan/etilacetat : 3/2; detekcija: ninhidrin)

T_{tališča}: 133-136 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1,34 (t, 3H, *J*= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 4,37 (q, 2H, *J*= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 4,89 (rs, 2H, CH₂-NH), 7,05 – 7,08 (m, 1H, Ar-H), 7,19 – 7,24

(m, 2H, Ar-H), 7,43 – 7,45 (m, 1H, Ar-H), 7,65 – 7,67 (m, 1H, Ar-H), 7,73 – 7,76 (m, 1H, Ar-H), 8,16 – 8,18 (m, 1H, Ar-H), 8,26 – 8,29 (m, 1H, Ar-H), 8,55 (s, 1H, Ar-H), 9,47 (rs, 1H, -NH-), 11,73 (s, 1H, indol-NH)

IR (cm^{-1}): 3904, 3854, 3323, 3101, 2983, 2368, 2345, 1774, 1719, 1685, 1654, 1626, 1578, 1542, 1508, 1458, 1448, 1419, 1372, 1342, 1315, 1298, 1255, 1232, 1170, 1136, 1100, 1080, 1022, 1000, 944, 911, 886, 818, 786, 772, 749, 734, 718, 682, 662, 626, 588, 556, 534, 432

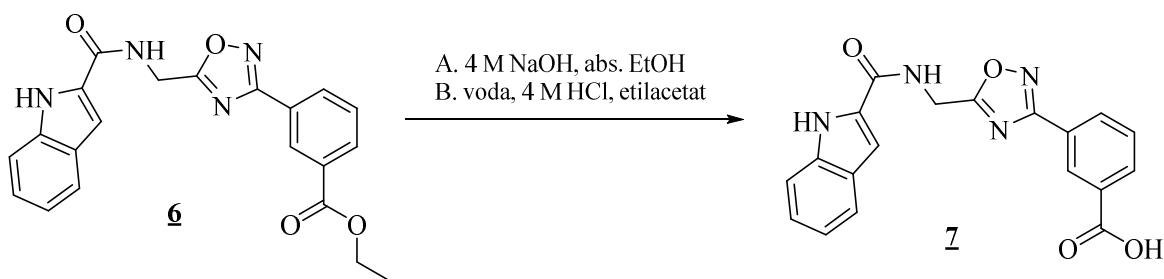
Elementna za $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$:	izračunana	izmerjena
%C	64,62	64,40
%H	4,62	4,28
%N	14,36	13,53

MS (ESI): 389,1 ($\text{M}+\text{H})^-$, **Mr (izračunana):** 390

HR-MS: 389,1258 (izračunana: 389,1250)

4.7. SINTEZA 3-((1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOJSKE KISLINE (7)

Reakcija:



Postopek:

1,01 g (2,57 mmol) etil 3-((1H-indol-2-karboksamido)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il benzoata (**6**) raztopimo v 50 mL brezvodnega etanola in dodamo 3 ekvivalente 4 M NaOH (7,72 mmol) ter pustimo pri sobni temperaturi mešati 28 ur. Nato dodamo 10 mL vode in po kapljicah dodajamo 4 M HCl, da nakisamo do pH 2. Potem sledi ekstrakcija z etilacetatom (5-krat 10 mL). Dodamo sušilno sredstvo Na₂SO₄. Po ekstrakciji odparimo topilo.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 64,9 % (604 mg)

Rf: 0,80 (MF: butanol/ocetna kislina/voda : 5/1/4; detekcija: bromkrezol zeleno)

T_{tališča}: 270 – 273°C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 4,89 (d, 2H, J= 5,7 Hz, -NH-CH₂), 7,05 – 7,08 (m, 1H, 1Ar-H), 7,20 – 7,24 (m, 2H, 2Ar-H), 7,44 – 7,46 (m, 1H, 1Ar-H), 7,66 – 7,73 (m, 2H, 2Ar-H), 8,14 – 8,16 (m, 1H, 1Ar-H), 8,23 – 8,25 (m, 1H, 1Ar-H), 8,55 (s, 1H, 1Ar-H), 9,44 (t, 1H, J= 5,7 Hz, -NH-CH₂), 11,71 (s, 1H, indol-NH), 13,34 (rs, 1H, -COOH)

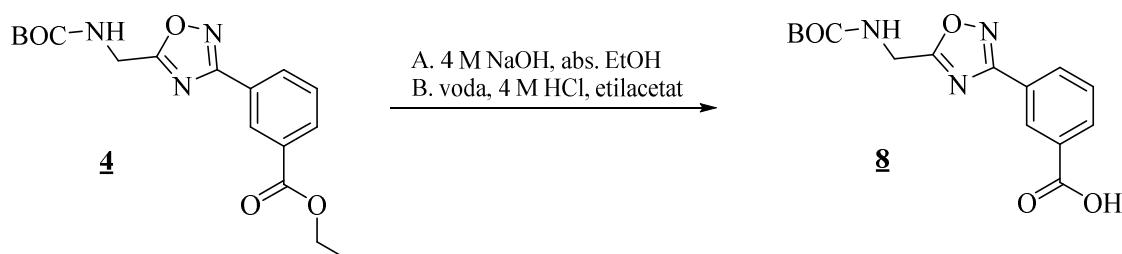
IR (cm⁻¹): 3361, 3281, 3138, 2935, 2606, 1706, 1640, 1575, 1543, 1402, 1344, 1314, 1293, 1262, 1225, 1140, 1096, 1072, 914, 897, 821, 783, 744, 717, 696, 675, 647, 615

MS (ESI): 361,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 362

HR-MS: 361,0931 (izračunana: 361,0937)

4.8. POSKUS SINTEZE 3-((TERC-BUTOKSIKARBONIL)AMINO)METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL BENZOJSKE KISLINE (8)

Reakcija:



Postopek:

1,2 g (3,46 mmol) etil 3-((terc-butoksikarbonil)amino)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il benzoata (**4**) raztopimo v 50 mL brezvodnega etanola in dodamo 3 ekvivalente 4 M NaOH (10,38 mmol) ter pustimo pri sobni temperaturi mešati 28 ur. Nato dodamo 20 mL vode in po kapljicah dodajamo 4 M HCl, da nakisamo do pH 2. Potem sledi ekstrakcija z etilacetatom (5-krat 10 mL). Dodamo sušilno sredstvo Na_2SO_4 . Po ekstrakciji odparimo topilo.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 94,6 % (1,04 g)

Rf: 0,54 (MF: kloroform/metanol : 3/2; detekcija: bromkrezol zeleno)

T_{tališča}: ni določljivo do 260 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1,43 (s, 9H, 3CH₃), 4,51 (d, 2H, $J= 5,78$ Hz, -NH-CH₂), 7,80 (d, 1H, $J= 5,97$ Hz, Ar-H), 8,11 (s, 2H, Ar-H), 13,31 (s, 1H, -COOH)

IR (cm⁻¹): 3354, 2987, 1698, 1676, 1618, 1538, 1373, 1299, 1217, 1103, 905, 864, 781, 696, 663, 637, 613

MS (ESI): 318,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 319

4.9. SINTEZA ETILNEGA ESTRA 4-CIANO BENZOJSKE KISLINE (9)

Reakcija:



Postopek:

Zmes 7,30 g (49,66 mmol) 4-ciano benzojske kisline, 4,32 g (74,42 mmol) KF; 5,55 mL (74,42 mmol) EtBr in 130 mL DMF mešamo 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji dodamo 50 mL nasičene raztopine NaHCO₃ in ekstrahiramo 3-krat s 100 mL etra. Organsko fazo sušimo z MgSO₄, filtriramo in topilo uparimo pri znižanem tlaku. Produkt je viskozna tekočina, ki na hladnem preide v trdno fazo.

Rezultati:

Izgled: bela oborina

Izkoristek: 67,7 % (5,88 g)

Rf: 0,80 (MF: diklorometan/metanol : 9/1, orositveni reagent: bromkrezol zeleno)

T_{tališča}: 50-52 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,40 (t, 3H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 4,40 (q, 2H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 7,73 – 7,75 (m, 2H, 2Ar-H), 8,13 – 8,15 (m, 2H, 2Ar-H)

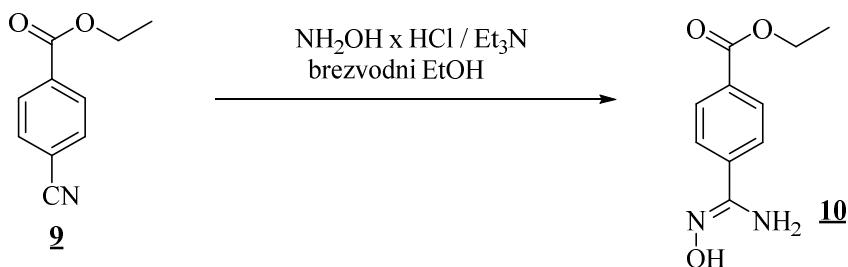
IR (Kbr, cm-1): 3424.98, 3050.44, 2978.94, 2230.18, 1718.55, 1367.52, 1278.98, 1185.46, 1108.97, 1022.33, 873.71, 765.79, 691.77, 641.97, 548.93

Elementna za C ₁₀ H ₉ NO ₂ :	izračunana	ugotovljena
%C	68,57	68,24
%H	5,14	5,24
%N	8,00	7,85

MS (ESI): 176 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 175

4.10. SINTEZA ETIL 4-(AMINO-(HIDROOKSIIMINO)-METIL) BENZOATA (10)

Reakcija:



Postopek:

8,34 g (120,06 mmol) hidrosilamonijevemu kloridu dodamo 16,71 mL (120,06 mmol) Et₃N v prebitku (5 %) in raztopimo v 120 mL brezvodnega EtOH ter pustimo mešati 10 minut. Nato dodamo 5,88 g (33,60 mmol) etil 4-ciano benzojske kisline (**2**) in reakcijsko zmes segrevamo pri 50 °C 4 ure.

Po končani reakciji odparimo topilo, zaostanku dodamo 180 mL etilacetata. Speremo z vodo (3-krat 70 mL) in nasičeno raztopino NaCl (3-krat 70 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄. Sušilno sredstvo odfiltriramo in odparimo topilo. Produkt prelijemo z etrom in izpadli produkt filtriramo z odsesavanjem. Spojino dodatno čistimo s spiranjem z etrom. Dobimo bel trden produkt.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 84,3 % (5,90 g)

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

T_{tališča}: 144-146 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1,33 (t, 3H, *J*= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 4,32 (q, 2H, *J*= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 5,95 (s, 2H, -NH₂), 7,82 – 7,84 (m, 2H, 2Ar-H), 7,94 – 7,96 (m, 2H, 2Ar-H), 9,93 (s, 1H, -OH)

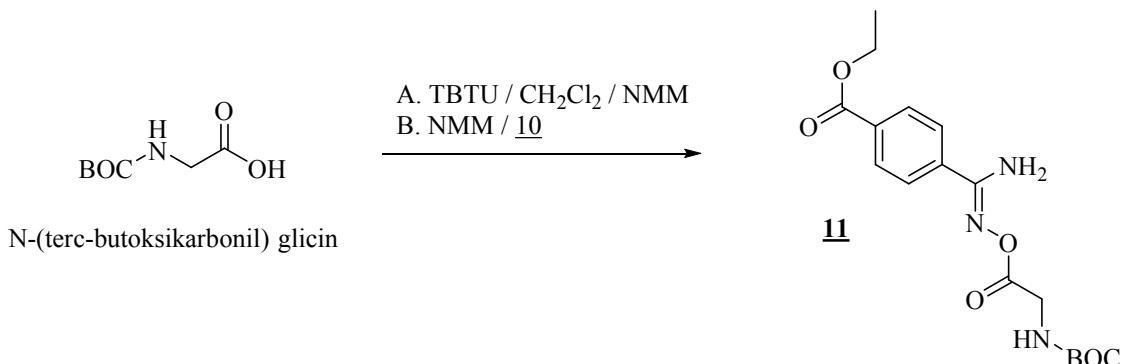
IR (cm⁻¹): 3453, 3356, 3201, 2902, 2362, 1700, 1656, 1604, 1474, 1410, 1390, 1367, 1285, 1188, 1133, 1104, 1018, 933, 861, 826, 778, 744, 704, 520, 501, 437

Elementna za C₁₀H₁₂N₂O₃:	izračunana	ugotovljena
%C	57,69	58,02
%H	5,77	6,06
%N	13,46	13,25

MS (ESI): 209,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 208

4.11. SINTEZA ETIL 4-(N'-(TERC-BUTOXIKARBONIL)GLICIL)OKSIKARBAMIMIDOIL BENZOAT (11)

Reakcija:



Postopek:

V bučko zatehatamo 6,94 g (39,66 mmol) N-(terc-butoksikarbonil) glicina (BOC-Gly) in 12,73 g (39,66 mmol) TBTU, ju raztopimo v 150 mL diklorometana in dodamo 9,69 mL (88,14 mmol) NMM. Po eni uri mešanja dodamo še 4,85 mL (44,07 mmol) NMM in 5,50 g (26,44 mmol) etil 4-(amino-hidroksiimino)-metil benzoata (10) ter segrevamo pri temperaturi 50 °C. Po končani reakciji topilo odparimo, spojino 11 izoborimo iz diklorometana in jo posušimo v sušilniku pri 50 °C.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 87,9 % (8,48 g)

Rf: 0,51 (MF: heksan/etilacetat : 3/2, orositveni reagent: ninhidrin)

T_{tališča}: 119-124 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 1,43 (t, 3H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 1,49 (s, 9H, -3CH₃), 4,18 (d, 2H, J= 5,7 Hz, -NH-CH₂-), 4,42 (q, 2H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 5,23 (rs, 1H, -NH-CH₂-), 5,32 (s, 2H, -NH₂), 7,77 – 7,79 (m, 2H, 2Ar-H), 8,09 – 8,12 (m, 2H, 2Ar-H)

IR (Kbr, cm⁻¹): 3905, 3854, 3822, 3808, 3502, 3420, 3358, 3267, 3232, 3069, 2977, 2939, 2364, 2345, 2128, 1777, 1720, 1703, 1644, 1606, 1553, 1476, 1458, 1428, 1407, 1390, 1366, 1350, 1277, 1151, 1106, 1058, 1046, 1020, 969, 949, 906, 885, 863, 816, 780, 764, 703, 618, 598, 555, 526, 502, 468

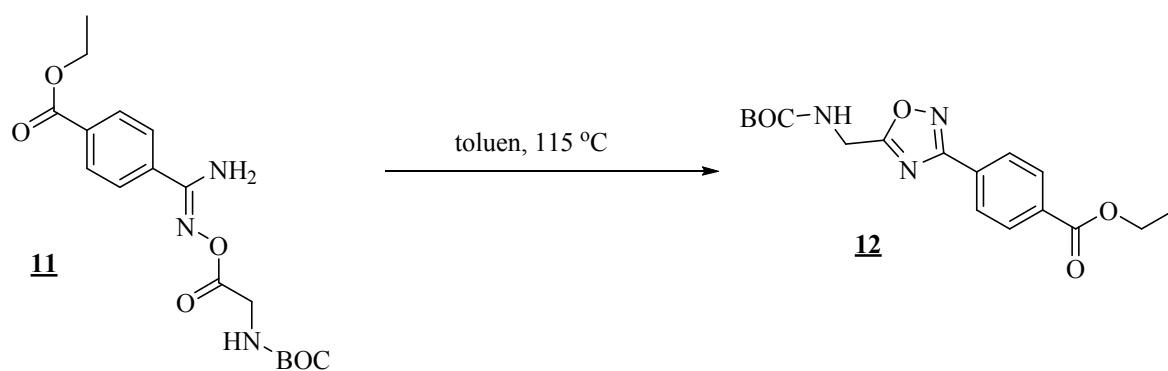
Elementna za C ₁₇ H ₂₃ O ₆ N ₃ :	izračunana	ugotovljena
%C	55,89	56,03
%H	6,30	6,05
%N	11,51	11,65

MS (ESI): 364,2 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 365

HR-MS: 364,1503 (izračunana: 364,1509)

4.12. SINTEZA ETIL 4-((TERC-BUTOKSIKARBONIL) AMINO) METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (12)

Reakcija:



Postopek:

8,00 g (21,92 mmol) etil 4-(N'-(terc-butoksikarbonil)glicil)oksi)karbamimidoil) benzoata (**11**) raztopimo v 150 mL toluena in prepihamo z argonom. Zmes segrevamo ob refluksu na 115 °C, dokler s tankoplastno kromatografijo ne zaznamo izhodne spojine (4 ure). Po končani reakciji topilo odparimo pod znižanim tlakom ter dobljeno oborino prelijemo z etrom.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 83,1 % (6,32 g)

Rf: 0,74 (MF: heksan/etilacetat : 3/2, detekcija: ninhidrin)

T_{tališča}: 112-116 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1,44 (t, 3H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 1,51 (s, 9H, 3CH₃), 4,43 (q, 2H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 4,67 (d, 2H, J= 5,6 Hz, -NH-CH₂), 5,28 (rs, 1H, -NH-CH₂), 8,17 (s, 4H, 4Ar-H)

IR (Kbr, cm⁻¹): 3904, 3855, 3841, 3822, 3806, 3677, 3352, 3088, 3066, 3001, 2980, 2962, 2938, 2906, 2798, 2556, 2404, 2366, 2245, 2133, 1958, 1717, 1682, 1617, 1591, 1568, 1526, 1476, 1464, 1442, 1417, 1394, 1368, 1356, 1314, 1279, 1240, 1169, 1128, 1112, 1054, 1023, 1003, 966, 936, 924, 912, 868, 854, 794, 785, 737, 729, 711, 691, 644, 634, 604, 566, 521, 506, 455, 431

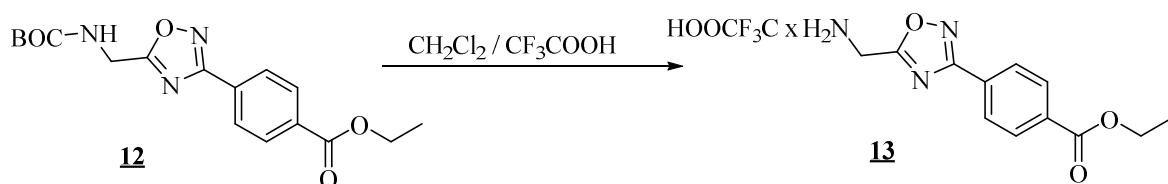
Elementna za C₁₇H₂₁N₃O₅:	izračunana	izmerjena
%C	58,78	58,44
%H	6,05	6,01
%N	12,10	11,98

MS (ESI): 348,2 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 347

HR-MS: 348,1551 (izračunano: 348,1559)

4.13. SINTEZA ETIL 4-(5-(AMINOMETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA v obliki soli s TRIFLUOROOOCETNO KISLINO (13)

Reakcija:



Postopek:

V bučko smo natehtali 5,00 g (14,41 mmol) etil 4-(5-(((terc-butoksikarbonil)amino)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoata (**12**), jo raztopili v 80 mL diklorometana ter ohladili na ledeni kopeli. Nato smo dodali 8,60 mL trifluoroocetne kisline in pustili mešati na sobni temperaturi 3 ure. Zmes odparimo pod znižanim tlakom in prelijemo z etrom ter to ponovimo 3-krat.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 79,9 % (4,16 g)

Rf: 0,05 (MF: kloroform/metanol : 9/1, detekcija: ninhidrin)

T_{tališča}: 142-146 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1,35 (t, 3H, *J*= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 4,37 (q, 2H, *J*= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 4,65 (s, 2H, -CH₂-), 8,19 (s, 4H, 4Ar-H), 8,97 (rs, 3H, -NH₃⁺)

IR (cm⁻¹): 3904.58, 3854.33, 3840.42, 3822, 3807.72, 3677.04, 3429.66, 3124.99, 3005.37, 2602.55, 2365.07, 2344.89, 2066.04, 1720.69, 1662.47, 1609.78, 1576.01, 1551.72, 1531.89, 1471.79, 1458.18, 1439.16, 1418.02, 1370.17, 1351.33, 1311.59, 1290.65, 1211.44, 1148.83, 1121.14, 1108.05, 1038.28, 1020.31, 997.92, 962.53, 897.92, 865.81, 840.41, 801.67, 781.15, 725.50, 690.26, 599.99, 548.42, 516.36, 439.93, 419.98

Elementna za C₁₂H₁₃N₃O₃.CF₃COOH: izračunana izmerjena

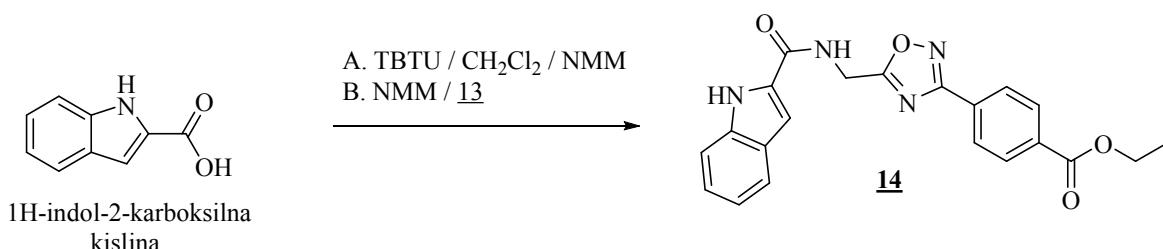
%C	46,54	46,82
%H	3,88	3,75
%N	11,63	11,69

MS (ESI): 248,1 ($(M+H)^+$ -CF₃COOH), **Mr (izračunana):** 247 (M -CF₃COOH)

HR-MS: 248,1033 (izračunano: 248,1035)

4.14. Sinteza etil 4-((1H-indol-2-karboksamido)metyl)-1,2,4-oksadiazol-3-il benzoata (**14**)

Reakcija:



Postopek:

V bučko zatehtamo 1,45 g (9,01 mmol) indol-2-karboksilne kislino in 2,89 g (9,01 mmol) TBTU, ju raztopimo v 90 mL diklorometana in dodamo 2,20 mL (20,03 mmol) NMM. Po eni uri mešanja dodamo še 2,20 mL (20,03 mmol) NMM in 2,17 g (6,01 mmol) etil 4-(aminometil)-1,2,4-oksadiazol-3-il benzoata v obliki soli s trifluoroocetno kislino (**13**) ter segrevamo pri temperaturi 50 °C. Po končani reakciji topilo odparimo, spojino **14** izoborimo iz diklorometana in jo posušimo v sušilniku pri 50 °C.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 76,3 % (1,79 g)

Rf: 0,35 (MF: heksan/etilacetat : 3/2, detekcija: ninhidrin)

T_{tališča}: 198-200 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1,35 (t, 3H, *J*= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 4,36 (q, 2H, *J*= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 4,89 (d, 2H, *J*= 5,7 Hz, -NH-CH₂-), 7,05 – 7,09 (m, 1H, 1Ar-H), 7,19 – 7,24 (m, 2H, 2Ar-H), 7,43 – 7,45 (m, 1H, 1Ar-H), 7,66 – 7,68 (m, 1H, 1Ar-H), 8,12 – 8,17 (m, 4H, 4Ar-H), 9,44 (t, 1H, *J*= 5,7 Hz, -NH-CH₂-), 11,71 (s, 1H, indol-NH)

IR (cm^{-1}): 3904, 3854, 3840, 3822, 3807, 3677, 3390, 3288, 3159, 3137, 3059, 2978, 2934, 2906, 2365, 2345, 1773, 1751, 1708, 1685, 1651, 1618, 1592, 1579, 1550, 1516, 1499, 1477, 1458, 1475, 1415, 1396, 1367, 1344, 1318, 1307, 1277, 1231, 1214, 1174, 1130, 1106, 1017, 964, 946, 923, 867, 852, 824, 815, 789, 772, 746, 734, 724, 643, 618, 610, 590, 552, 538, 502, 451, 436

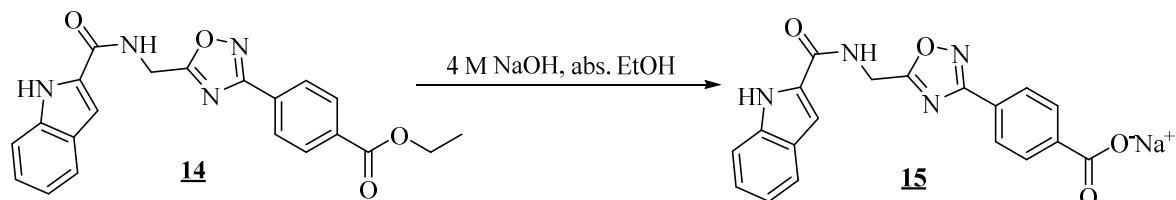
Elementna za $\text{C}_{21}\text{H}_{18}\text{N}_4\text{O}_4$:	izračunana	izmerjena
%C	64,62	63,68
%H	4,62	4,50
%N	14,36	14,15

MS (ESI): 389,1 ($\text{M}+\text{H})^-$, **Mr (izračunana):** 390

HR-MS: 389,1243 (izračunana: 389,1250)

4.15. SINTEZA NATRIJEVEGA 4-((1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (15)

Reakcija:



Postopek:

1,7 g (4,35 mmol) etil 4-(5-((1H-indol-2-karboksamido)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il)benzoata (**14**) raztopimo v 80 mL brezvodnega etanola in dodamo 3 ekvivalente 4 M NaOH (14,70 mmol) ter pustimo pri sobni temperaturi mešati 28 ur. Izpadlo oborino odfiltriramo z odsevanjem in spiramo z EtOH. Produkt prekrstaliziramo iz EtOH.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 45,8 % (764 mg)

Rf: 0 (MF: heksan/etilacetat : 3/2, detekcija: ninhidrin)

T_{tališča}: ni določljivo do 300 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 4,87 (s, 2H, -NH-CH₂-), 7,05 – 7,08 (m, 1H, 1Ar-H), 7,20 – 7,23 (m, 2H, 2Ar-H), 7,45 – 7,48 (m, 1H, 1Ar-H), 7,66 – 7,67 (m, 1H, 1Ar-H), 7,87 – 7,98 (m, 4H, 4Ar-H), 9,65 (rs, 1H, -NH-CH₂-), 12,01 (s, 1H, indol-NH)

IR (cm⁻¹): 3405, 3281, 1632, 1579, 1537, 1377, 1339, 1312, 1253, 1135, 1108, 1049, 1015, 904, 872, 840, 782, 748, 730

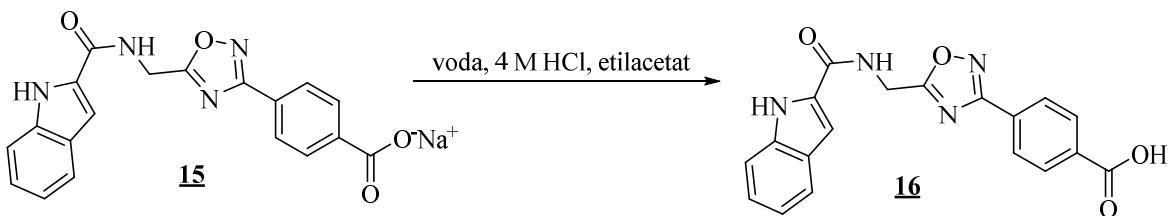
Elementna za C ₁₉ H ₁₃ N ₄ O ₄ Na x 5H ₂ O:	izračunana	izmerjena
%C	48,06	48,20
%H	4,85	4,41
%N	11,80	11,54

MS (ESI): 361,1 ((M+H)⁺ -Na⁺), **Mr (izračunana):** 362 (M -Na⁺)

HR-MS: 361,0933 (izračunana: 361,0937)

4.16. Sinteza 4-(((1H-INDOL-2-KARBOKSAMIDO)METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOJSKA KISLINA (16)

Reakcija:



Postopek:

0,450 g (1,17 mmol) natrijevega 4-(5-((1H-indol-2-karboksamido)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoata (**15**) raztopimo v 5 mL vode in po kapljicah dodajamo 4 M HCl, da nakisamo do pH 2. Potem sledi ekstrakcija z etilacetatom (5-krat 10 mL). Dodamo sušilno sredstvo Na₂SO₄. Po ekstrakciji odparimo topilo.

Rezultati

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 88,9 % (375 mg)

Rf: 0,84 (MF: butanol/ocetna kislina/voda : 5/1/4, detekcija: bromkrezol modro)

T_{tališča}: 280-283 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 4,89 (d, 2H, J= 5,7 Hz, -NH-CH₂-), 7,05 – 7,09 (m, 1H, 1Ar-H), 7,19 – 7,24 (m, 2H, 2Ar-H), 7,43 – 7,45 (m, 1H, 1Ar-H), 7,66 – 7,68 (m, 1H, 1Ar-H), 8,10 – 8,15 (m, 4H, 4Ar-H), 9,44 (t, 1H, J= 5,7 Hz, -NH-), 11,70 (s, 1H, indol-NH), 13,30 (s, 1H, -COOH)

IR (cm⁻¹): 3431, 3222, 2913, 2626, 1694, 1634, 1593, 1541, 1485, 1413, 1369, 1341, 1306, 1245, 1170, 1126, 1092, 1043, 1017, 1003, 931, 890, 863, 800, 767, 738, 723, 676, 612

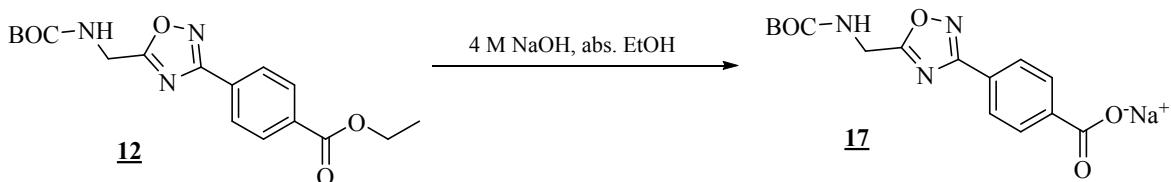
Elementna za C₁₉H₁₄N₄O₄:	izračunana	izmerjena
%C	62,98	62,44
%H	3,87	3,97
%N	15,47	14,95

MS (ESI): 361,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 362

HR-MS: 361,0945 (izračunana: 361,0937)

4.17. SINTEZA NATRIJEVEGA 4-((TERC-BUTOKSIKARBONIL)AMINO)METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL BENZOATA (17)

Reakcija:



Postopek:

1,2 g (3,46 mmol) etil 4-((terc-butoksikarbonil)amino)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il benzoata (12) raztopimo v 50 mL brezvodnega etanola in dodamo 3 ekvivalente 4 M NaOH (10,38 mmol) ter pustimo pri sobni temperaturi mešati 28 ur. Izpadlo oborino odfiltriramo z odsesavanjem in spiramo z EtOH. Produkt prekristaliziramo iz EtOH.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 82,4 % (972 mg)

Rf: 0,052 (MF: heksan/etilacetat : 3/2, detekcija: ninhidrin)

T_{tališča}: ni določljivo do 300 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1,41 (s, 9H, 3CH₃), 4,50 (d, 2H, J= 5,9 Hz, -NH-CH₂), 7,77 (t, 1H, J= 5,9 Hz, -NH-CH₂-), 7,89 – 7,91 (m, 2H, 2Ar-H), 7,99 – 8,01 (m, 2H, 2Ar-H)

IR (cm⁻¹): 3337, 2978, 1693, 1583, 1547, 1405, 1367, 1287, 1251, 1164, 1091, 1051, 937, 898, 867, 845, 794, 729, 618

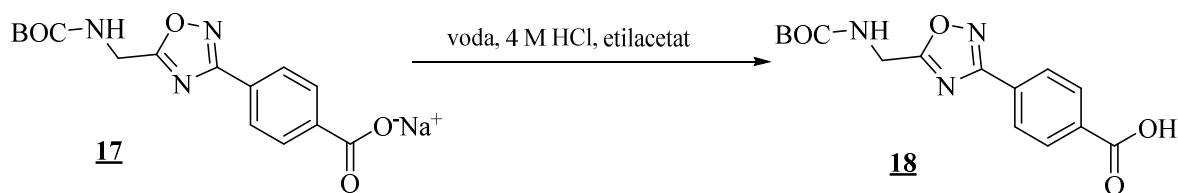
Elementna za C₁₅H₁₆N₃O₅Na x 5H₂O:	izračunana	izmerjena
%C	41,76	41,94
%H	6,03	4,44
%N	9,74	9,06

MS (ESI): 318,1 ((M+H)⁺ -Na⁺), **Mr (izračunana):** 317 (M -Na⁺)

HR-MS: 318,1098 (izračunana: 318,1090)

4.18. SINTEZA 4-((TERC-BUTOJSIKARBONIL)AMINO) METIL-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOJSKE KISLINE (**18**)

Reakcija:



Postopek:

0,91 g (2,68 mmol) natrijevega 4-((tert-butoksikarbonil)amino)metil-1,2,4-oksadiazol-3-il benzoata (**17**) raztopimo v 10 mL vode in po kapljicah dodajamo 4 M HCl do pH 2. Potem ekstrahiramo z etilacetatom (5-krat 10 mL). Dodamo sušilno sredstvo Na₂SO₄. Po ekstrakciji topilo odparimo.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 68,7 % (587 mg)

Rf: 0,02 (MF: heksan/etilacetat : 3/2, detekcija: bromkrezol zeleno)

T_{tališča}: 190-193 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1,41 (s, 9H, 3CH₃), 4,53 (d, 2H, J= 5,7 Hz, -NH-CH₂-), 7,77 (t, 1H, J= 5,4 Hz, -NH-CH₂-), 8,13 (s, 4H, 4Ar-H), 13,31 (rs, 1H, -COOH)

IR (cm⁻¹): 3355, 2984, 2553, 1681, 1617, 1590, 1567, 1522, 1487, 1412, 1358, 1314, 1281, 1253, 1161, 1107, 1056, 1002, 937, 899, 863, 790, 759, 718, 707

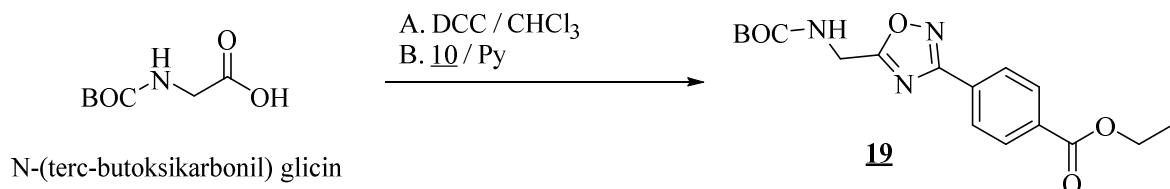
Elementna za C₁₅H₁₇N₃O₅: izračunana izmerjena

%C	56,43	55,10
%H	5,33	5,67
%N	13,17	12,50

MS (ESI): 318,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 319

4.19. SINTEZA ETIL 4-((TERC-BUTOKSIKARBONIL)AMINO)METIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (19)

Reakcija:



Postopek:

0,19 g (1,06 mmol) **N**-(tert-butylsulfonyl) glicina in 0,20 g (0,96 mmol) etil 4-(amino-hidroksiimino)-metil benzoata (**10**) raztopimo v 5,71 mL CHCl₃ in ohladimo na -5-0 °C. Nato dodamo naenkrat 0,33 g (1,58 mmol) DCC. Pri isti temperaturi mešamo reakcijsko zmes še 2 uri. Izpadlo dicikloheksil sečnino odfiltriramo z odsesavanjem preko dveh finih filter papirjev in filtrat uparimo (T kopeli ne sme preseči 40 °C). Sirupast zaostanek raztopimo v 1,14 mL piridina. Ob refluksu segrevamo to zmes 3 ure pri temperaturi 120 °C. Gosto sirupasto snov, ki jo dobimo, ko uparimo piridin, raztopimo v 1,2 mL CH₂Cl₂ in speremo z 0,3 mL vode. Organsko fazo speremo še 2-krat s 15 mL NaHCO₃, 2-krat s 15 mL 1 M HCl in 2-krat s 15 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z MgSO₄ in uparimo. Dobimo zmes, ki jo ločimo na koloni (mobilna faza: kloroform; stacionarna faza: silikagel).

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 7,5 % (25 mg)

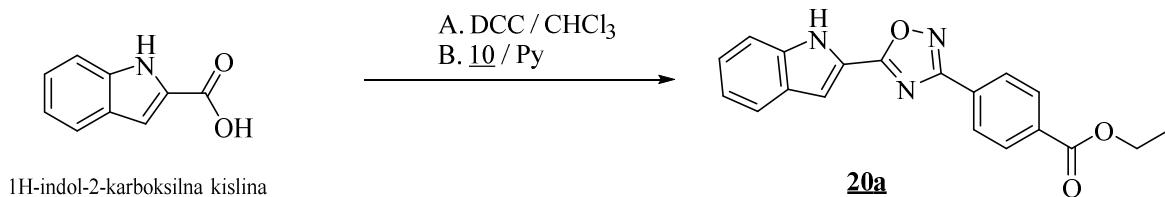
Rf: 0,65 (MF: heksan/etilacetat : 3/2, detekcija: ninhidrin)

T_{tališča}: 114-117 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1,43 (t, 3H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 1,51 (s, 9H, 3CH₃), 4,44 (q, 2H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 5,26 (rs, 1H, -NH-CH₂-), 7,68 (d, 2H, J= 6,0 Hz, -NH-CH₂-), 8,18 (s, 4H, 4Ar-H)

4.20. SINTEZA ETIL 4-(5-(1H-INDOL-2-IL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (20a)

Reakcija:



Postopek:

0,47 g (2,89 mmol) indol-2-karboksilne kisline raztopimo v 5,73 mL CHCl₃ in ohladimo na -5-0 °C. Nato dodamo naenkrat 0,30 g (1,45 mmol) DCC. Pri isti temperaturi mešamo reakcijsko zmes še 2 uri. Izpadlo dicikloheksil sečnino odfiltriramo z odsesavanjem preko dveh finih filter papirjev in filtrat uparimo (T kopeli ne sme preseči 40 °C). Sirupast zaostanek raztopimo v 1,15 mL piridina in dodamo hkrati 0,20 g (0,96 mmol) etil 4-(amino-(hidroksiimino)-metil) benzoata (**10**). Ob refluksu segrevamo to zmes 3 ure pri temperaturi 120 °C. Gosto sirupasto snov, ki jo dobimo, ko uparimo piridin, raztopimo v 4,58 ml CH₂Cl₂ in speremo z 1,15 mL vode. Organsko fazo speremo še 2-krat s 15 mL NaHCO₃, 2-krat s 15 mL 1 M HCl in 2-krat s 15 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z MgSO₄ in uparimo. Dobimo zmes, ki jo ločimo na koloni (mobilna faza: kloroform; stacionarna faza: silikagel).

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 41,5 % (0,13 g)

Rf: 0,56 (MF: heksan/etilacetat : 3/2, detekcija: ninhidrin)

T_{tališča}: 165-168 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1,44 (t, 3H, J= 6,0 Hz, -CH₂-CH₃), 4,46 (q, 2H, J= 6,0 Hz, -CH₂-CH₃), 7,25 (s, 1H, indol-H), 7,30 (s, 1H, indol-H), 7,50 (s, 2H, indol-H), 7,78 (s, 1H, indol-H), 8,25 (s, 4H, Ar-H), 11,50 (s, 1H, indol-NH)

IR (cm⁻¹): 3358, 3055, 2986, 2927, 2901, 1702, 1627, 1582, 1573, 1561, 1528, 1477, 1435, 1415, 1364, 1341, 1309, 1271, 1249, 1231, 1193, 1189, 1161, 1133, 1108, 1086,

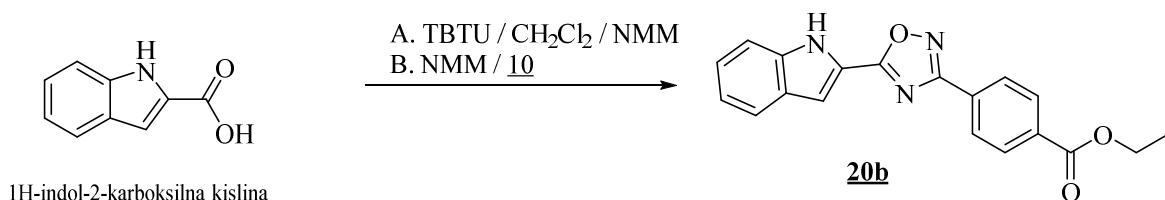
1021, 1000, 964, 932, 882, 867, 856, 817, 784, 757, 738, 709, 687, 642, 611, 585, 565, 551, 539, 513

MS (ESI): 334,1 ($M+H$)⁺, **Mr (izračunana):** 333

HR-MS: 334,1185 (izračunana: 334,1192)

4.21. SINTEZA ETIL 4-(5-(1H-INDOL-2-IL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (20b)

Reakcija:



Postopek:

V bučko zatehtamo 0,36 g (2,25 mmol) indol-2-karboksilne kislina in 0,70 g (2,25 mmol) TBTU in ju raztopimo v 10 mL diklorometana ter dodamo 0,55 mL (5,00 mmol) NMM. Po eni uri mešanja dodamo še 0,28 mL (2,50 mmol) NMM in 0,31 g (1,50 mmol) etil 4-(amino-(hidroksiimino)-metil) benzoata (10) ter segrevamo pri temperaturi 50 °C. Po končani reakciji topilo odparimo, spojino 21 izoborimo iz diklorometana in jo posušimo v sušilniku pri 50 °C.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 53,9 % (0,27 g)

Rf: 0,24 (MF: heksan/etilacetat : 3/2, detekcija: ninhidrin)

T_{tališča}: 159 - 162 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): 1,36 (t, 3H, *J*= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 4,37 (q, 2H, *J*= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 7,10 – 7,13 (m, 1H, 1Ar-H), 7,28 – 7,33 (m, 2H, 2Ar-H), 7,48 – 7,51 (m,

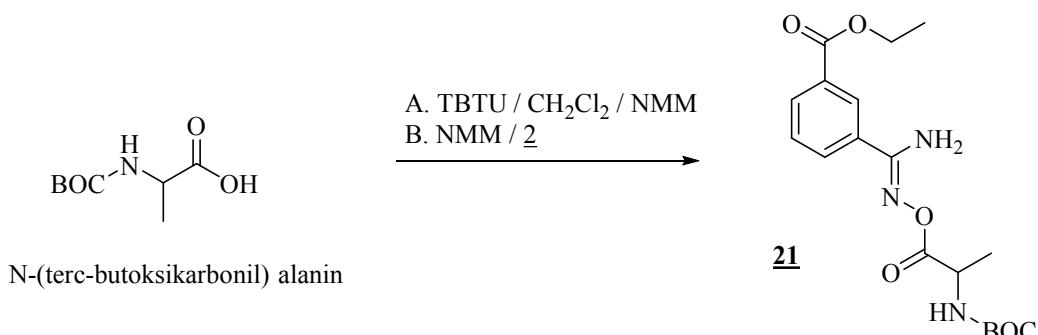
1H, 1Ar-H), 7,69 – 7,71 (m, 1H, 1Ar-H), 7,94 – 7,96 (m, 2H, Ar-H), 8,07 – 8,09 (m, 2H, 2Ar-H), 12,00 (s, 1H, indol-NH)

IR (KBr, cm⁻¹): 3456, 3377, 1721, 1697, 1624, 1561, 1525, 1473, 1406, 1371, 1342, 1291, 1225, 1184, 1147, 1099, 1049, 1020, 976, 941, 911, 879, 869, 847, 821, 780, 762, 743, 706, 611, 582, 559, 532

MS (ESI): 332,11 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 333

4.22. SINTEZA ETIL 3-(N'-(TERC-BUTOXIKARBONIL)ALANIL)OKSI KARBAMIMIDOIL) BENZOATA (21)

Reakcija:



Postopek:

V bučko zatehatamo 7,46 g (39,66 mmol) N-(terc-butoxysikarbonil) alanina (BOC-Ala) in 12,73 g (39,66 mmol) TBTU, ju raztopimo v 150 mL diklorometana in dodamo 9,69 mL (88,14 mmol) NMM. Po eni uri mešanja dodamo še 4,85 mL (44,07 mmol) NMM in 5,50 g (26,44 mmol) etil 3-(amino-(hidroksiimino)-metil) benzoata (**2**) ter segrevamo pri temperaturi 50 °C. Po končani reakciji topilo odparimo, spojino **21** izoborimo iz diklorometana in jo posušimo v sušilniku pri 50 °C.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 35,3 % (3,53 g)

Rf: 0,30 (MF: heksan/etilacetat : 3/2, orositveni reagent: ninhidrin)

T_{tališča:} 115-117 °C

¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm]= 1,41 (t, 3H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 1,48 (s, 9H, -CH₃), 1,52 (d, 3H, J= 7,2 Hz, Ala-CH₃), 4,42 (q, 2H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 5,13 (d, 1H, J= 7,1 Hz, Ala-CH-), 5,47 (rs, 1H, -NH-CH-), 7,51 – 7,55 (m, 1H, 1Ar-H), 7,97 – 7,99 (m, 1H, 1Ar-H), 8,17 – 8,19 (m, 1H, 1Ar-H), 8,34 (s, 1H, 1Ar-H)

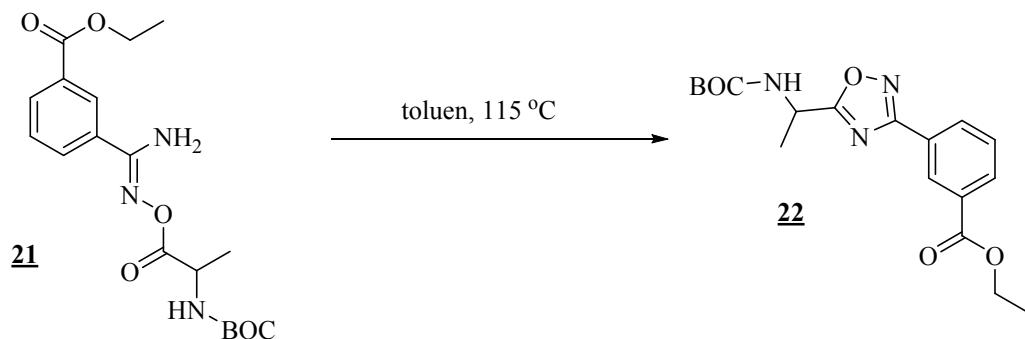
IR (KBr, cm⁻¹): 3488, 3348, 2980, 2938, 1748, 1716, 1689, 1620, 1574, 1522, 1444, 1393, 1366, 1345, 1318, 1295, 1248, 1157, 1108, 1072, 1051, 1029, 923, 880, 855, 826, 783, 761, 709, 693, 638

Elementna za C ₁₈ H ₂₅ N ₃ O ₆ :	izračunana	ugotovljena
%C	56,99	57,03
%H	6,60	6,87
%N	11,08	11,05

MS (ESI): 380,2 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 379

4.23. SINTEZA ETIL 3-(5-((TERC-BUTOXIKARBONIL)AMINO)ETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA (22)

Reakcija:



Postopek:

2,00 g (5,28 mmol) etil 3-((N'-(((terc-butoksikarbonil)alanil)oksi)karbamimidooil) benzoata (**21**) raztopimo v 40 mL toluena in prepihamo z argonom. Zmes segrevamo ob refluksu na 115 °C, dokler s tankoplastno kromatografijo ne zaznamo izhodne spojine (2 dni).

Rezultati:

Izgled: beli kristali

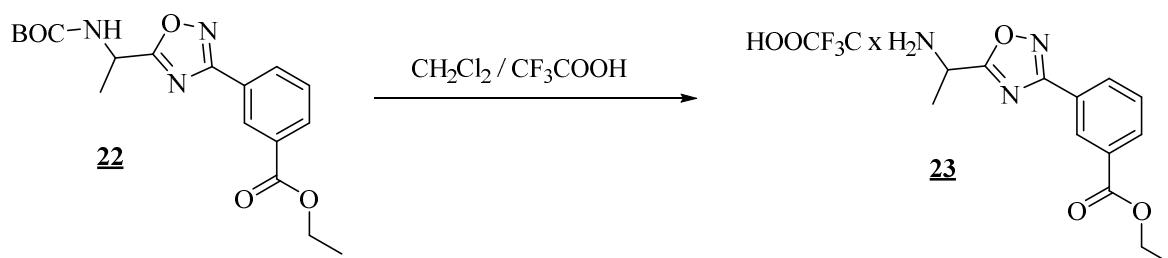
Izkoristek: 75,2 % (1,43 g)

Rf: 0,69 (MF: heksan/etilacetat : 3/2, detekcija: ninhidrin)

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1,45 (t, 3H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 1,50 (s, 9H, 3CH₃), 1,67 (d, 3H, J= 6,9 Hz, Ala-CH₃), 4,45 (q, 2H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 5,21 (rs, 2H, Ala-CH-, Ala-NH-), 7,57 – 7,61 (m, 1H, 1Ar-H), 8,21 – 8,23 (m, 1H, 1Ar-H), 8,27 – 8,29 (m, 1H, 1Ar-H), 8,76 (s, 1H, 1Ar-H)

4.24. SINTEZA ETIL 3-(5-(AMINOETIL)-1,2,4-OKSADIAZOL-3-IL) BENZOATA v obliki soli s TRIFLUOROOOCETNO KISLINO (23)

Reakcija:



Postopek:

V bučko smo natehtali 1,43 g (3,96 mmol) etil 3-(5-((terc-butoksikarbonil)amino)ethyl-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoata (**22**), jo raztopili v 50 mL diklorometana ter ohladili na ledeni kopeli. Nato smo dodali 2,50 mL trifluoroocetne kisline in pustili mešati na sobni temperaturi 3 ure. Zmes odparimo pod znižanim tlakom in prelijemo z etrom ter to ponovimo 3-krat.

Rezultati:

Izgled: beli kristali

Izkoristek: 89,6 % (1,33 g)

Rf: 0,04 (MF: kloroform/metanol : 9/1, detekcija: ninhidrin)

T_{tališča}: 126-128 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1,41 (t, 3H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 1,92 (d, 3H, J= 7,1 Hz, Ala-CH₃) 4,39 (q, 2H, J= 7,0 Hz, -CH₂-CH₃), 4,98 (q, 1H, J= 7,0 Hz, Ala-CH-), 7,50 – 7,54 (m, 1H, 1Ar-H), 7,62 – 8,06 (rs, 3H, -NH₃⁺), 8,14 – 8,18 (m, 2H, 2Ar-H), 8,59 (s, 1H, 1Ar-H)

IR (cm⁻¹): 3477, 3380, 2880, 2698, 2143, 1783, 1673, 1635, 1572, 1525, 1472, 1446, 1373, 1330, 1303, 1273, 1233, 1192, 1138, 1104, 1080, 1033, 1015, 917, 882, 840, 798, 759, 741, 713, 680, 659

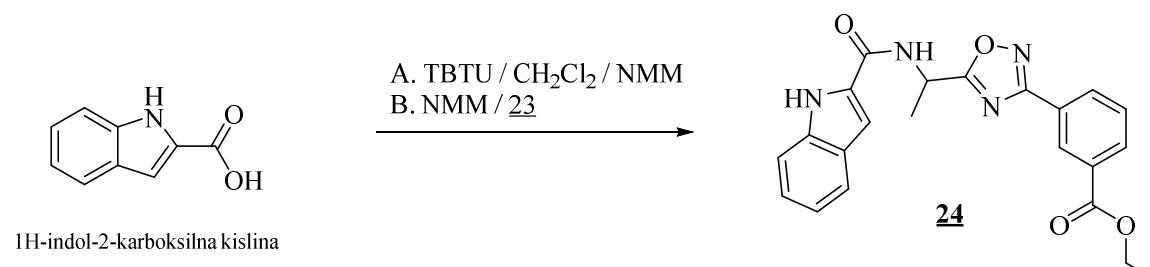
Elementna za C ₁₃ H ₁₅ N ₃ O ₃ .CF ₃ COOH x 1H ₂ O:	izračunana	izmerjena
%C	45,80	46,08
%H	4,58	5,05
%N	10,68	10,23

MS (ESI): 262,1 ((M+H)⁺ -CF₃COOH), **Mr (izračunana):** 261 (M -CF₃COOH)

HR-MS: 262,1189 ((M+H)⁺ -CF₃COOH), (izračunana: 262,1192)

4.25. Sinteza etil 3-((1H-indol-2-karboksamido)etil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoat (24)

Reakcija:



Postopek:

V bučko zatehtamo 770 mg (4,79 mmol) indol-2-karboksilne kisline in 1,54 g (4,79 mmol) TBTU, ju raztopimo v 60 mL diklorometana in dodamo 1,17 mL (10,66 mmol) NMM. Po eni uri mešanja dodamo še 1,17 mL (10,66 mmol) NMM in 1,20 g (3,20 mmol) etil 3-(aminoetyl)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoata v obliki soli s trifluoroocetno kislino (**23**) ter

segrevamo pri temperaturi 50 °C. Po končani reakciji topilo odparimo, spojino **24** izoborimo iz diklorometana in jo posušimo v sušilniku pri 50 °C.

Rezultati:

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 74,4 % (960 mg)

Rf: 0,75 (MF: kloroform/metanol : 9/1, detekcija: ninhidrin)

T_{tališča}: 88-90 °C

¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm]= 1,34 (t, 3H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 1,73 (d, 3H, J= 7,1 Hz, Ala-CH₃), 4,37 (q, 2H, J= 7,1 Hz, -CH₂-CH₃), 5,50 – 5,57 (m, 1H, Ala-CH-), 7,04 – 7,09 (m, 1H, 1Ar-H), 7,19 – 7,23 (m, 1H, 1Ar-H), 7,28 (s, 1H, 1Ar-H), 7,43 – 7,45 (m, 1H, 1Ar-H), 7,65 – 7,67 (m, 1H, 1Ar-H), 7,73 – 7,77 (m, 1H, 1Ar-H), 8,16 – 8,19 (m, 1H, 1Ar-H), 8,27 – 8,29 (m, 1H, 1Ar-H), 8,56 (s, 1H, Ar-H), 9,28 (d, 1H, J= 7,3 Hz, -NH-CH₂-), 11,68 (s, 1H, indol-NH)

IR (cm⁻¹): 3262, 2982, 1773, 1703, 1638, 1538, 1446, 1416, 1368, 1340, 1294, 1249, 1162, 1135, 1095, 1019, 917, 859, 816, 773, 743, 711, 682, 616

Elementna za C₂₂H₂₀N₄O₄:	izračunana	izmerjena
%C	65,35	64,02
%H	4,95	4,78
%N	13,86	13,82

MS (ESI): 405,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 404

HR-MS: 405,1566 (izračunana: 405,1549)

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

Iz dveh izhodnih spojin, 3- in 4-ciano benzojske kisline smo sintetizirali spojine **7**, **8**, **16**, **18** in **24**, za katere smo predvidevali, da bi se lahko vezale na podenoto B DNA-giraze. Smiselnost sinteze teh spojin smo že na začetku potrdili z uporabo računalniškega programa FlexX (LeadIT 2.1.3 (BioSolveIT)), s katerim smo sidrali spojine v vezavno mesto na podenoti B DNA-giraze in z njim pridobili rezultate, na podlagi katerih smo se odločili za sintezo spojin obravnavanih v diplomske nalogi.

V nadaljevanju bomo opisali sintezne postopke, ki smo jih uporabili za več stopenjsko sintezo načrtovanih spojin. Izpostavili bomo mehanizme, preko katerih predvidevamo, da so spojine reagirale v želene spojine, pristope optimizacije reakcij in nepredvidene poteke reakcij.

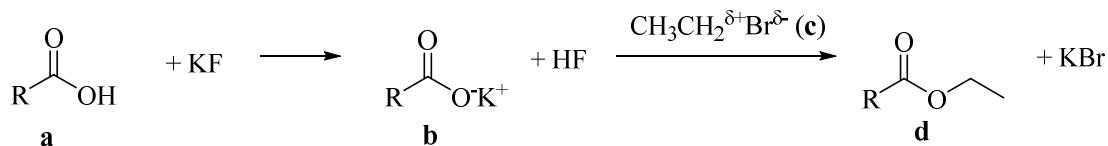
5.1. Tvorba etilnega estra 3- in 4-ciano benzojske kisline (**1** in **9**)

Priprave estrov smo se lotili na začetku zato, ker imata končni spojini prisotno karboksilno skupino, ki jo predstavlja benzoilni fragment, prisoten v izhodnih dveh spojinah 3 in 4-cianobenzojske kisline. Ker tekom večstopenjske sinteze lahko ta karboksilna skupina reagira, smo jo morali predhodno zaščititi. Etilne in metilne estre pogosto uporabljamo kot zaščitne skupine karboksilne skupine, saj so stabilni v kislih pogojih, pa tudi v pogojih prisotnosti nukleofilov. Uporabimo lahko tudi zaščito karboksilne skupine v obliki amidov in hidrazidov, vendar so te spojine bolj stabilne in se zato bolj poredko uporabljajo. Za odstranitev zaščitnih skupin v obliki estrov najpogosteje uporabljamo hidrolizo, bodisi alkalno bodisi kislo (32). V glavnem karboksilno skupino zaščitimo v primerih, ko želimo preprečiti reakcijo kislega protona z bazičnimi reagenti ali pa ko želimo preprečiti interakcijo nukleofila s karbonilno skupino karboksilne skupine. Takšne pogoje pa smo imeli tudi sami v predlagani shemi reakcij za pripravo končnih spojin. Odločili smo se za zaščito karboksilne skupine v obliki etilnega estra.

Pri pripravi estrov imamo na izbiro več sinteznih postopkov. Najpogosteje se poslužujemo kislinsko katalizirane reakcije med ustrezeno kislino in alkoholom. Estre lahko pripravimo tudi iz reaktivnih kislinskih halogenidov ali anhidridov ter ustreznega alkohola ali s preestrenjem. V vseh zadnjih omenjenih reakcijah gre za nukleofilno substitucijo, kjer nastopa kislina ali njen derivat kot elektrofil, alkohol pa kot nukleofil (33).

Za sintezo etilnih estrov 3- in 4-ciano benzojske kisline smo se v diplomskem delu odločili za drugačen pristop sinteze, saj smo s KF najprej povečali nukleofilnost

karboksilne kisline (**b**) in po dodatu elektrofila EtBr (**c**) prav tako preko nukleofilne substitucije pripravili želena estra (**d**, slika 12).

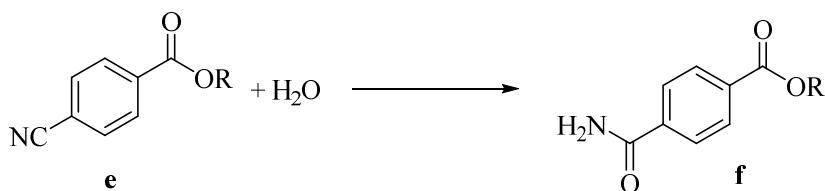


Slika 12: Mehanizem nukleofilne substitucije estrov

Gre za zelo enostavno metodo, saj vse reagente le pomešamo med sabo. Reakcija poteka pri sobni temperaturi. Pri tem postopku dobimo tudi dobre izkoristke (85,7 % pri spojni **1** in 67,7 % pri spojni **2**). Pri izolaciji spojin uporabljamo ekstrakcijo iz vodne faze, pri čemer moramo biti pozorni, da je čas stika vode s spojino čim krajsi. V strukturi želenih estrov se namreč nahaja tudi skupina CN, ki lahko hidrolizira do karboksamida.

5.2. Tvorba amidoksimov (**2** in **10**)

Tudi pri tvorbi amidoksimov imamo na voljo več različnih sinteznih postopkov. Odločili smo se za najpogosteje uporabljen postopek, in sicer za nukleofilno adicijo hidroksilamina na ciano skupino. Ker smo pri reakciji uporabili hidroksilamonijev klorid kot izhodni reagent, smo ga morali najprej prevesti v prosto bazo, pri čemer smo uporabili bazo trietylamin v prebitku (5 %) glede na hidroksilamonijev klorid. Hidroksilamin najdemo v obliki klorida, ker je v tej obliki bolj stabilen in se ga zato lažje shranjuje. Sicer bi lahko namesto trietylamina uporabili tudi natrijev karbonat, vendar bi v reakciji s HCl nastala voda, ki bi v reakcijski zmesi lahko povzročila hidrolizo nitrilne skupine (**e**). To pa bi vodilo v tvorbo stranskega produkta prikazanega na sliki 13 (**f**) (34).



Slika 13: Reakcija hidrolize nitrilne skupine

Čim bolj brezvodne pogoje smo poskušali zagotoviti tudi z uporabo brezvodnega etanola kot topila in s sušenjem hidroksilamonijevega klorida pred uporabo v sušilniku.

Reakcijo smo izvedli pri temperaturi 50 °C in je v obeh primerih potekla v 4-ih urah. Po končani reakciji smo uparili topilo pod znižanim tlakom in zaostanek raztopili v etilacetatu ter sprali z vodo in nasičeno raztopino NaCl. V organski fazi smo dobili produkt, ki smo ga nato izolirali in še dodatno spirali z etrom, da smo odstranili nezreagirano izhodno spojino. V obeh primerih smo dobili dobre izkoristke (81,2 % pri spojini **2** in 84,3 % pri spojini **10**), zato reakcije nismo dodatno optimizirali.

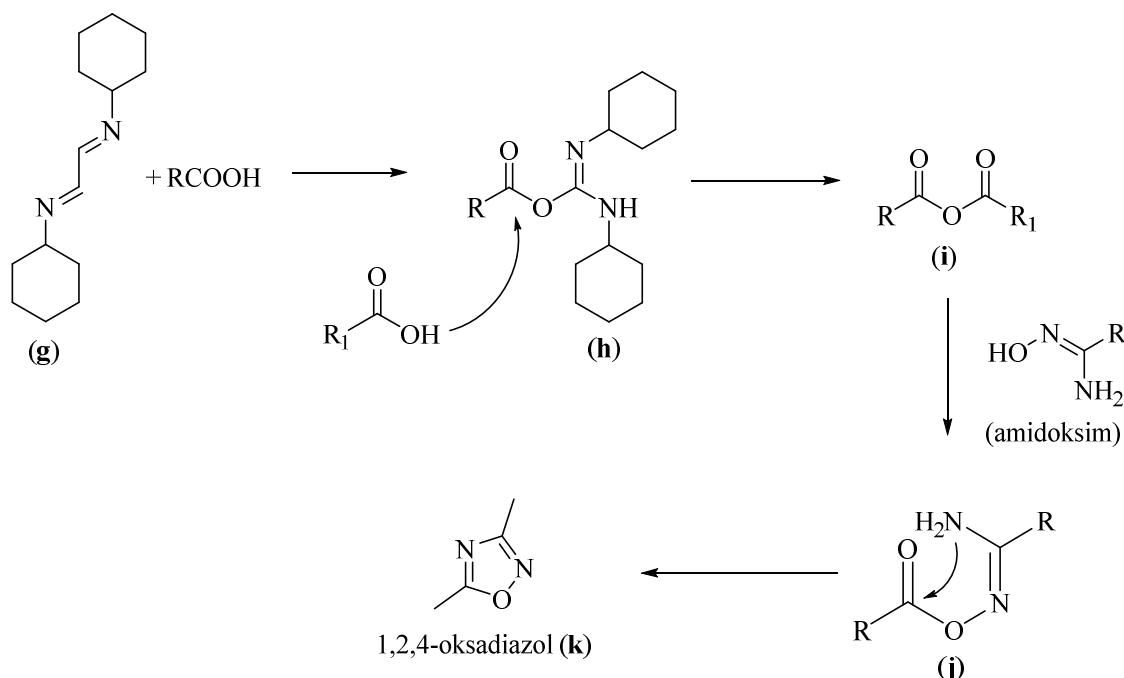
5.3. Tvorba 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov z uporabo DCC (19**, **20a**) ter z uporabo TB TU (**20b**)**

Za sintezo 1,2,4-oksadiazolskih obročev poznamo več različnih postopkov. Uporabimo lahko 1,3-dipolarno cikloadicijo nitrilovih oksidov na nitrile ali pa ciklizacijo iz amidoksimov in aldehidov. Najpogosteje uporabljeni metoda pa je ciklizacija iz amidoksimov in karbonilnih reagentov kot so npr. aktivirane kisline, kislinski kloridi, estri ipd (35).

Tudi mi smo se odločili za najpogostejši tip tvorbe 1,2,4-oksadiazolskega obroča, pri čemer smo uporabili postopek z dicikoheksil sečnino DCC (slika 14), ki je omogočila aktivacijo kislinskega reagenta za olajšano nukleofilno substitucijo z OH-skupino amidoksim. Reakcija je večstopenjska.

S to metodo smo sintetizirali tako spojino **19**, kot tudi **20a**. Natančen mehanizem za pripravo spojine **19** je opisan v nadaljevanju in prikazan na sliki 14.

V prvi stopnji smo aktivirali karboksilno skupino Boc-Gly z DCC (**g**) v obliki aktivnega estra. Ker izhajamo iz dveh ekvivalentov Boc-Gly, dodamo pa samo en ekvivalent DCC, po aktivaciji karboksilne skupine (**h**) drug ekvivalent Boc-Gly reagira preko karboksilne skupine z aktiviranim estrom Boc-Gly in predpostavljam, da nastane mešan anhidrid (**i**). V tretji stopnji je po dodatku amidoksim nato poteklo O-aciliranje (**j**). Sledi ciklizacija (nukleofilna substitucija) preko proste aminske skupine amidoksimskega dela molekule (**k**).



Slika 14: Tvorba 1,2,4-oksadiazolskega obroča (k) s pomočjo DCC (g)

Po tem postopku smo sintetizirali spojino **19**. Izkoristek priprave spojine **19** ni bil optimalen (7,5 %). Po enakem postopku smo pripravili tudi spojino **20a**, kjer smo izhajali iz indol-2-karboksilne kisline namesto BOC-Gly, kot je to v primeru spojine **19**. Tu smo se bolj natančno držali navodila, da ob vmesni izolaciji nastalega anhidrida ob uparevanju topila vodne kopeli ne segrejemo preko 40 °C, in smo izkoristek izboljšali na 36,8 %. Ob predpostavki, da celokupno potečjo 4 reakcije, je ta izkoristek sprejemljiv.

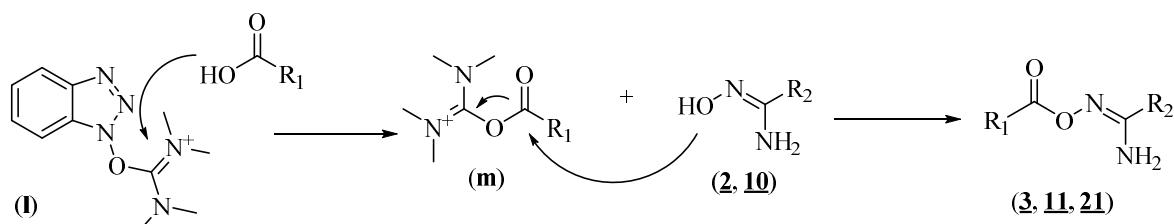
Ker pa smo želeli izkoristek kljub vsemu še izboljšati na vsaj okoli 50 %, smo poskusili še s postopkom, pri katerem smo uporabili peptidni sklopitveni reagent TBTU (podrobnejše opisan v točki 5.4.) in tako sintetizirali spojino **20b** z izkoristkom 53,5 %.

5.4. Tvorba O-aciliranih produktov z BOC-Gly (**3**, **11**) in BOC-Ala (**21**) s peptidnim sklopitvenim reagentom TBTU

Za sintezni postopek s peptidnim sklopitvenim reagentom TBTU smo se odločili, ker zaradi slabšega izkoristka (pod 50 %) nismo bili zadovoljni s predhodno uporabljenim sinteznim postopkom, kjer smo uporabili dicikloheksil sečnino DCC (ta postopek je bolje opisan zgoraj v točki 5.3). Tako kot pri DCC smo tudi s TBTU želeli doseči tvorbo 1,2,4-oksadiazolskih obročev iz amidoksimov **2** in **10**. Vendar reakcija ni potekla čisto po naših

načrtih, saj ni prišlo do tvorbe 1,2,4-oksadiazolskega obroča, ampak le do O-aciliranih produktov (**3**, **11** in **21**) (slika 15).

Najprej smo aktivirali karboksilno skupino BOC-Gly (BOC-Ala) (**m**) s peptidnim sklopitvenim reagentom TBTU (**I**). Potem hidrosilna skupina amidoksima (**2**, **10**) kot nukleofil reagira s karbonilno skupino. Nato v reakcijsko zmes dodamo amidoksim (**2**, **10**) in dobimo O-acilirane produkte **3**, **11** in **21**.



Slika 15: Mehanizem tvorbe O-aciliranih produktov (3, 11, 21) s pomočjo TBTU (I)

Pri tej reakciji smo dobili dobra izkoristka pri O-aciliranih produktih z BOC-Gly (94,5 % pri **3**; 78,6 % pri **11**). Pri spojini **21**, kjer smo uporabili BOC-Ala namesto BOC-Gly pa smo dobili slabši izkoristek (35,3 %) in tudi sama reakcija je potekala dalj časa. To bi lahko pripisali stericni oviranosti zaradi dodatne metilne skupine, ki jo vsebuje alanin in dejstvu, da smo reakcijsko zmes pustili na sobni temperaturi, namesto da bi segrevali pri temperaturi 50 °C.

5.5. Tvorba 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov (**4**, **12**, **22**) s segrevanjem v toluenu

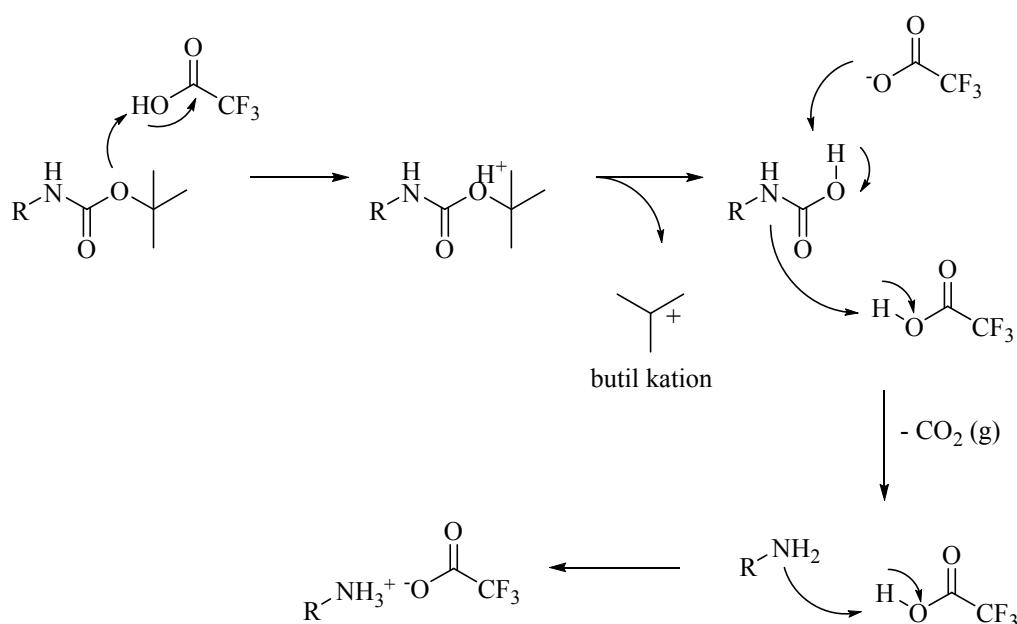
Za ta način tvorbe 1,2,4-oksadiazolov smo se odločili, ker predhodno nismo iz amidoksimov **2** in **10** dobili spojin z 1,2,4-oksadiazolskim obročem, ampak smo dobili le O-acilirane produkte **3**, **11** in **21**. Sam postopek je zelo enostaven, saj posamezne spojine raztopimo v toluenu in segrevamo pri 115 °C. Gre za termično aktivacijo ciklizacije. Paziti moramo le, da zagotovimo brezvodne pogoje. To dosežemo s prepihovanjem z argonom ter s segrevanjem ob vrenju. Tako smo dobili spojine **4**, **12** in **22** z 1,2,4-oksadiazolskim obročem.

Pri vseh treh spojinah smo dobili zelo dobre izkoristke (nad 80 %). Razlikovali so se le reakcijski časi. Spojini **4** in **12** (ki sta imela vezan BOC-Gly in se razlikujeta le v mestu substitucije benzoata) sta imeli reakcijska časa podobna, in sicer 5-6 ur. Pri spojini **22** (ki je

imela vezan BOC-Ala) pa smo potrebovali tri dni, čemur bi lahko pripisali zasluge sterični oviranosti zaradi dodatne metilne skupine, ki jo ima alanin v primerjavi z glicinom.

5.6. Odstranitev BOC zaščite (5, 13 in 23)

Tvorbi disubstituiranih derivatov 1,2,4-oksadiazola (4, 12, 23) je sledila reakcija odstranitve t-butiloksikarbonilne skupine, ki smo jo uporabili kot zaščitno skupino oben aminokislin. Poznamo več postopkov odščite terc-butilnih etrov. Uporabimo lahko Hbr/AcOH pri sobni temperaturi, eter prepihan s $\text{HCl}_{(\text{g})}$, tetrahidrofuran prepihan s $\text{HCl}_{(\text{g})}$. Mi smo za dosego tega uporabili kislo hidrolizo s trifluoroocetno kislino, ki nam je hkrati služila kot topilo (slika 16).



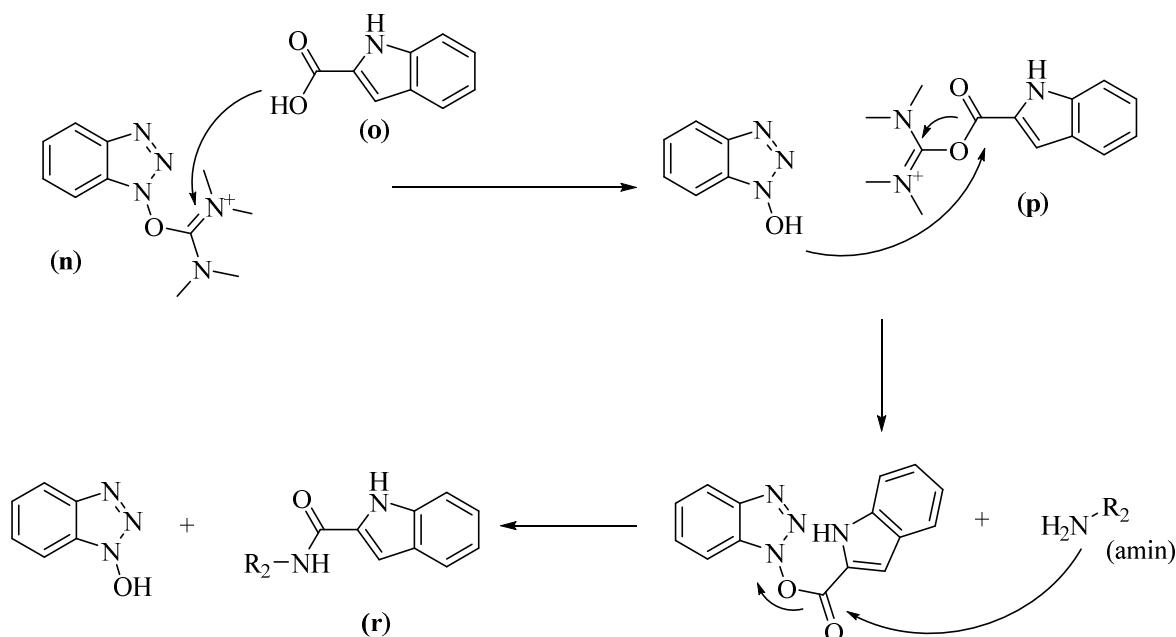
Slika 16: Mehanizem odstanitve BOC zaščite

Reakcijski čas je bil pri derivatu 4-ciano benzojske kisline krajši kot pri derivatu 3-ciano benzojske kisline. Pri obeh izomerih pa so reakcije potekle z dokaj visokimi izkoristki in brez stranskih produktov. Po uparitvi topila smo dobili trdne produkte v obliki soli s trifluoroocetno kislino: 5, 13 in 23, ki smo jih morali večkrat spirati z etrom, da smo odstranili prebitno trifluoroocetno kislino.

Boljše izkoristke smo dobili pri spojnini 13, ki je imela predhodno vezan BOC-Gly (79,9 %) in spojnini, ki je imela predhodno vezan BOC-Ala 23 (82,4 %). Slabši izkoristek pa je bil pri spojnini 5, ki je imela prav tako kot spojina 13 predhodno vezan BOC-Gly (69 %), kjer je potekala reakcija tudi najdlje, več kot en dan.

5.7. Substitucija aminov (**5, 13, 23**) z indol-2-karboksilno kislino (**6, 14, 24**)

Zopet smo uporabili sintezni postopek s peptidnim sklopitvenim reagentom TBTU in tvorili amidno vez (slika 17). Gre za isti mehanizem kot pri tvorbi O-aciliranih produktov s TBTU (točka 5.4). Tu smo želeli acilirati amine v obliki trifluoracetata (**5, 13, 23**) z indol-2-karboksilno kislino (**o**). Pri tvorbi teh amidov smo si pomagali s sklopitvenim reagentom TBTU (**n**), ki je omogočil aktivacijo kisline v bolj elektrofilno spojino (**p**), zato je nukleofilna substitucija do amidov (**r**) lažje potekla.



Slika 17: Mehanizem tvorbe amidne vezi s TBTU

Pri spojnini **14**, kjer je oksadiazolski obroč vezan na para mesto fenilnega obroča, je reakcija potekla v petih urah in ni bilo potrebno čiščenje na koloni. Dobili smo zelo dober izkoristek, in sicer 76,3 %.

Reakcija je pri spojnini **6** (tu je oksadiazolski obroč vezan na meta mesto fenilnega obroča) potekla podobno hitro kot pri **14**, vendar je bilo več stranskih produktov, kar je privedlo do slabšega izkoristka, saj je bilo potrebno še čiščenje na koloni. Izkoristek je bil tako slabši, le 13,3 %.

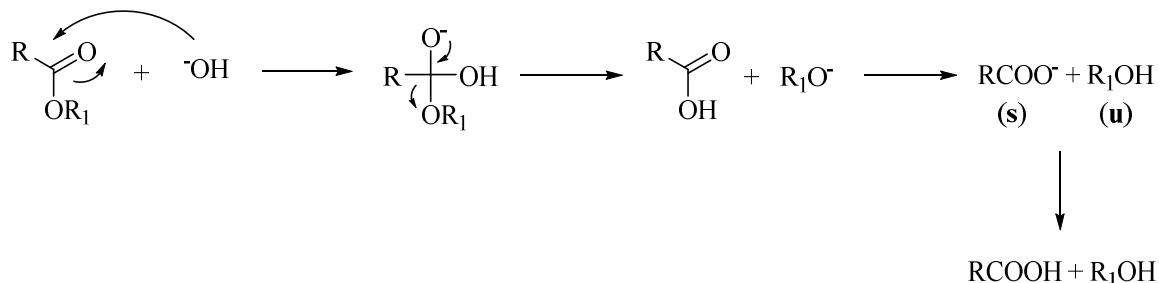
Spojina **24**, ki ima oksadiazol vezan na meta mestu fenilnega obroča in smo predhodno imeli vezan BOC-Ala je bil izkoristek primerljiv s tistem pri **14**. Dobili smo 74,3 % izkoristek, čeprav smo tudi tu izvedli čiščenje s kolonsko kromatografijo.

Kljub čiščenju na koloni pri spojnini **24** lahko potrdimo samo strukturo te spojine ne pa tudi njene čistote.

5.8. Hidroliza esterske skupine (7, 8, 15, 16, 17 in 18)

Hidroliza je kemijska reakcija, pri kateri se določena spojina razcepi z vodo. S kislino oziroma bazo katalizirane hidrolitične reakcije so značilne tudi za estre in amide. Do hidrolize pride, ko nukleofil (npr. voda ali hidroksilni ion) reagira z ogljikom v karbonilni skupini estra ali amida. V kislem okolju se karbonilna skupina protonira, kar oljaša nukleofilni napad. Produkt hidrolize estrov in amidov je kislina ter amin pri amidih oziroma alkohol pri estrih (36).

Uporabili smo najpogosteje uporabljeni metodo hidrolize, ki je alkalna hidroliza z uporabo natrijevega hidroksida v etanolu. Uporabili smo tri ekvivalente NaOH v brezvodnem etanolu. Glede na mehanizem reakcije, ki je prikazan na spodnji sliki 18, nastaja pri reakciji natrijeva sol izhodnega estra (**s**), hkrati pa tudi etanol (**u**).



Slika 18: Mehanizem hidrolize esterske vezi

V tej reakcijski stopnji smo opazili pomembno razliko med derivatom 3-ciano benzojske kisline in 4-ciano benzojske kisline. Sol smo namreč lahko izolirali le pri hidrolizi spojine **14**, saj je pri tem po izolaciji sol (natrijev 4-(5-(((1H-indol-2-karboksamido)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoata **15**) izpadla in smo jo lahko odfiltrirali, medtem ko je pri hidrolizi spojine **6** sol sicer nastajala, vendar se ni izoborila v taki obliki, da bi jo lahko izolirali, saj je bila oborina bolj mazljive strukture. Pri dobljeni natrijevi soli (**15**) smo dobili tudi zadovoljiv izkoristek, 45,7 %, vendar pa je tu še prisotno nekaj vode (NMR spekter). To nakazuje na to, da je spojina higroskopna.

Dobljene soli smo nato z nakisanjem prevedli v kislini (**7** in **16**) in sicer tako, da smo dodali nekaj vode in nato po kapljicah dodajali 4 M HCl, da smo nakisali reakcijsko zmes do pH 2. Proton iz HCl je zamenjal Na⁺ in tvoril karboksilno kislino. V reakcijski zmesi smo zato dobili še NaCl. Nato smo izvedli ekstrakcijo z etilacetatom. V organsko fazo je prehajala kislina, ki je predstavljala končne spojine, ki smo jih želeli sintetizirati (**7**, **16**). Sledilo je še

odparevanje topila. V primeru meta izomera **6** smo morali opraviti še čiščenje na koloni. Uporabili smo enak postopek čiščenja kot že opisano v točki **5.7**.

Boljši izkoristek smo dobili pri para izomeru (spojina **16**), ki je bil 88,9 %; pri meta izomeru pa je bil nekoliko nižji in je znašal 64,9 %, kar je verjetno posledica čiščenja s kolonsko kromatografijo.

Po istem postopku, ki smo ga opisali zgoraj, smo sintetizirali tudi spojine **18** (derivat 4-ciano benzojske kisline) in **8** (derivat 3-ciano benzojske kisline) iz spojin **12** in **4**. Tudi tu pri derivatu 3-ciano benzojske kisline nismo mogli izolirati natrijeve soli. Izkoristek pri končnih kislinah pa je bil v tem primeru boljši pri derivatu 3-ciano benzojske kisline, kjer smo dobili 94,6 % izkoristek, pri derivatu 4-ciano benzojske kisline pa le 68,7 %.

6. SKLEPI

V okviru diplomskega dela smo sintetizirali naslednje deriveate 3- in 4-ciano benzojske kisline s potencialnim protimikrobnim delovanjem:

- 3-(5-(((terc-butoksikarbonil)amino)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzojsko kislino (**8**),
- 4-(5-(((terc-butoksikarbonil)amino)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzojsko kislino (**18**),
- 3-(5-(((1H-indol-2-karboksamido)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzojsko kislino (**7**),
- 4-(5-(((1H-indol-2-karboksamido)metil)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzojsko kislino (**16**),
- 3-(5-(1-(1H-indol-2-karboksamido)ethyl)-1,2,4-oksadiazol-3-il) benzoat (**24**).

Za zaščito karboksilne skupine smo uporabili enostavno metodo esterifikacije, ki poteka pri sobni temperaturi. Gre za etiliranje cianobenzojske kisline, s katerim zaščitimo kislinski del molekule v obliki estra. Tako smo pridobili spojini **1** in **9**.

Pri tvorbi amidoksimov **2** in **10** smo se odločili za najpogosteje uporabljen postopek z bazo trietilaminom v 5 % prebitku.

V nadaljevanju smo iz amidoksimov **2** in **10** z uporabo sinteznega postopka s peptidnim sklopitvenim reagentom TBTU želeli pridobiti spojine z 1,2,4-oksadiazolskim obročem, vendar smo dobili le O-acilirane produkte **3**, **11** in **21** z dobrimi izkoristki. Pri tem postopku smo izvedli O-acilacijo ustreznih amidoksimov pri čemer smo uporabili BOC-Gly (dobimo spojini **3** in **11**) ter BOC-Ala (dobimo spojino **21**). Opazili smo razliko v izkoristkih, in sicer je bil pri spojini **21** slabši izkoristek (35,3 %), kar je predvsem posledica sterične oviranosti zaradi dodatne metilne skupine pri alaninu. Pri spojini **3** smo dobili 94,5 % in pri spojini **11** 78,6 %.

Ta postopek smo modificirali tako, da smo namesto izobarjanja iz diklorometana izvedli spiranje z vodo in to nato odfiltrirali z odsesavanjem ter sušili v sušilniku pri 50 °C.

O-acilirane produkte **3**, **11** in **21** smo nato raztopili v toluenu in segrevali pri 115 °C. Zagotovili smo brezvodne pogoje s segrevanjem ob refluksu in prepihovanjem z argonom.

Na ta način smo dobili spojine z 1,2,4-oksadiazolskim obročem **4**, **12** in **22**. Dobili smo dobre izkoristke (okoli 88 %). Daljši čas reakcije in slabši izkoristek (35 %) je bil le pri spojini **22**, zaradi že omenjene sterične oviranosti.

Da bi lahko nadaljevali z reakcijami na aminski skupini, smo morali najprej izvesti odščito BOC zaščitne skupine. To smo naredili tako, da smo oksadiazole **4**, **12** in **22** raztopili v diklorometanu in dodali prebitek trifluoroocetne kisline in pustili mešati. Reakcija je potekala dalj časa (1 dan). Po odparitvi topila smo morali zaostanek tudi večkrat spirati z etrom, da smo odstranili prebitno trifluoroocetno kislino. Dobili smo soli **5**, **13** in **23** z dobrimi izkoristki (70 – 85 %).

V naslednjem koraku smo želeli na aminsko skupino vezati 1H-indolski obroč in tako tvoriti amidno vez. Za dosego tega smo zopet uporabili peptidni skloplitveni reagent TBTU. Ta sintezni postopek je dal dobre izkoristke pri spojinah **14** in **24** (74 – 76 %). Pri spojni **6** pa je prišlo do tvorbe več stranskih produktov in posledično do slabšega izkoristka (13,3 %). V zaključku smo modificirali postopek tako, da smo namesto izobarjanja v diklorometanu spirali z vodo in odfiltrirali z odsesavanjem ter sušili pri 50 °C v sušilniku. DCC metoda se je izkazala za slabšo možnost aktivacije karboksilne skupine.

Sintezno pot smo končali z alkalno hidrolizo in tako dobili končni kislini **7** in **16**. Pri para izomeru pa smo uspeli iz spojine **14** izolirati vmesno natrijevo sol **15**.

Testiranje inhibicije DNA-giraze je bilo izvedeno s spojinami **4**, **6**, **7**, **12**, **14** in **16**. Nobena izmed naštetih spojin ni izkazovala inhibicije pri nižji koncentraciji od 100 µM.

7. LITERATURA

1. <http://www.microbiologyonline.org.uk/about-microbiology/introducing-microbes/bacteria>, (dostopano september 2015)
2. http://en.wikipedia.org/wiki/Alexander_Fleming, (dostopano september 2015)
3. Guillemot D: Antibiotic use in humans and bacterial resistance. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2: 494–498
4. Brown ED, Wright GD: New targets and screening approaches in antimicrobial drug discovery. *Chem Rev*, 2005, 105 (2): 759-74
5. Reece RJ, Maxwell A: DNA Gyrase: Structure and Function. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 1991, 26 (3/4): 335-375
6. Shen LL, Kohlbrenner WE, Weigl D, Baranowski J: Mechanism of Quinolone Inhibition of DNA gyrase. *J Biol Chem*, 1989, Vol.264; 5: 2973-2978
7. Collin F, Karkare S, Maxwell A: Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol and Biotechnol*, 2011, 92: 479-497
8. Mayer C, Janin YL: Non-quinolone Inhibitors of Bacterial Type IIA Topoisomerases: A Feat of Bioisosterism. *Chem Rev*, 2014, 114 (4): 2313-2342
9. Oblak M, Kotnik M, Solmajer T: Discovery and Development of ATPase Inhibitors of DNA Gyrase as Antibacterial Agents. *Curr Med Chem*, 2007, 14, 2033-2047
10. 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) fходанine inhibitors of DNA gyrase B. *Bioorg Med Chem*, 2012, 20(8): 2572-2580
11. Schoeffler AJ, Berger JM: DNA topoisomerases: harnessing and constraining energy to govern chromosome topology. *Q Rev Biophys*, 2008, 41(1): 41-101
12. Collin F, Karkare S, Maxwell A: Exploiting bacterial DNA gyrase as a drug target: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2011, 92: 479-497
13. Stanger FV, Dehio C, Schirmer T: Structure of the N-Terminal Gyrase B Fragment in Complex with ADP-Pi Reveals Rigid-Body Motion Induced by ATP Hydrolysis. *PLoS One*, 2014, 9(9): e107289
14. Heide L: The aminocoumarins: biosynthesis and biology. *Nat Prod Rep*, 2009, 26(10): 1241-1250
15. Gellert M, O'Dea MH, Itoh T, Tomizawa J: Novobiocin and coumermycin inhibit DNA supercoiling catalyzed by DNA gyrase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1976, 73 (12): 4474-4478

16. Flatman RH, Eustaquio A, Li SM, Heide L, Maxwell A: Structure-Activity Relationships of Aminocoumarin-Type Gyrase and Topoisomerase IV Inhibitors obtained by Combinatorial Biosynthesis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006, 50(4): 1136-42
17. Trefzer A, Pelzer S, Schimana J, Stockert S, Bihlmaier C, Fiedler HP, Welzel K, Vente A, Bechthold A: Biosynthetic gene cluster of simocyclone, a natural multihybrid antibiotic. *Antimicrob Agents Chemother*, 2002, 46(5): 1174-1182
18. Sadiq AA, Patel MR, Jacobson BA, Escobedo M, Ellis K, Oppegard LM, Hiasa H, Kratzke RA: Anti-proliferative effects of simocyclinone D8 (SD8), a novel catalytic inhibitor of topoisomerase II. *Invest New Drugs*, 2009, 28(1): 20-25
19. Sissi C, Vazquez E, Chemello A, Mitchenall LA, Maxwell A, Palumbo M: Mapping simocyclinone D8 interaction with DNA gyrase: evidence for a new binding site on GyrB. *Antimicrob Agents Chemother*, 2010, 54(1): 213-220
20. Edwards MJ, Flatman RH, Mitchenall LA, Stevenson CE, Le TBK, Fiedler HP, McKay AR, Clarke TA, Buttner MJ, Lawson DM, Maxwell A: A crystal structure of the bifunctional antibiotic, simocyclinone D8, bound to DNA gyrase. *Science*, 2009, 326: 1415-1418
21. Tari LW, Li X, Trzoss M, Bensen DC, Chen Z, Lam T, Zhang J, Lee SJ, Hough G, Phillipson D, Akers-Rodriguez S, Cunningham ML, Kwan BP, Nelson KJ, Castellano A, Locke JB, Brown-Driver V, Murphy TM, Ong VS, Pillar CM, Shinabarger DL, Nix J, Lightstone FC, Wong SE, Nguyen TB, Shaw KJ: Tricyclic GyrB/ParE (TriBE) Inhibitors: A new Class Of Broad-Spectrum Dual-Targeting Antibacterial Agents. *PLoS One*, 2013, 8(12): e84409
22. Basarab GS, Manchester JI, Bist S, Boriack-Sjodin PA, Dangel B, Illingworth R, Sherer BA, Sriram S, Uria-Nickelsen M, Eakin AE: Fragment-to-hit-to-lead discovery of a novel pyridylurea scaffold of ATP competitive dual targeting type II topoisomerase inhibiting antibacterial agents. *J Med Chem*, 2013, 56: 8712-8735
23. Uria-Nickelsen M, Neckermann G, Sriram S, Andrews B, Manchester JI, Carcanague D, Stokes S, Hull KG: Novel topoisomerase inhibitors: microbiological characterisation and in vivo efficacy of pyrimidines. *Int J Antimicrob Agents*, 2013, 41(4): 363-71
24. Grossman TH, Bartels DJ, Mullin S, Gross CH, Parsons JD, Liao Y, Grillot A, Stamos D, Olson ER, Charifson PS, Mani N: Dual targeting of GyrB and ParE by a

- novel aminobenzimidazole class of antibacterial compounds. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007, 51: 657-666
25. Singh SB, Goetz MA, Smith SK, Zink DL, Polishook J, Onishi R, Salowe S, Wiltsie J, Allocco J, Sigmund J et. al.: Kibdelomycin A, a congener of kibdelomycin, derivatives and their antibacterial activities. *Bioorg Med Chem Lett*, 2012, 22: 7127-7130
26. Lu J, Patel S, Sharma N, Soisson SM, Kishii R, Takei M, Fukuda Y, Lumb KJ, Singh SB: Structures of Kibdelomycin bound to *Staphylococcus aureus* GyrB and ParE showed a Novel U-Shaped binding Mode. *ACS Chem Biol*, 2014, 9(9): 2023-2031
27. Miesel L, Hecht DW, Osmolski JR, Gerding D, Flattery A, Li F, Lan J, Lipari P, Polishook JD, Liang L et. al.: Kibdelomycin is a potent and selective agent against toxigenic clostridium difficile. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58: 2387-2392
28. Lu J, Patel S, Sharma N, Soisson SM, Kishii R, Takei M, Fukuda Y, Lumb KJ, Singh SB: Structures of Kibdelomycin Bound to *Staphylococcus aureus* GyrB and ParE Showed a Novel U-Shaped Binding Mode. *ACS Chem Biol*, 2014, 9 (9), 2023-2031
29. Shirude PS, Madhavapeddi P, Tucker JA, Murugan K, Patil V, Basavarajappa H, Raichurkar AV, Humnabadkar V, Hussein S, Sharma S et. al.: Aminopyrazinamides: novel and specific GyrB inhibitors that kill replicating and nonreplicating *Mycobacterium tuberculosis*. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 519-523
30. Hameed SP, Solapure S, Mukherjee K, Nandi V, Waterson D, Shandil R, Balganesh M, Sambandamurthy VK, Raichurkar AK, Deshpande A et. al.: Optimization of pyrrolamides as mycobacterial GyrB ATPase inhibitors: structure-activity relationship and in vivo efficacy in a mouse model of tuberculosis. *Antimicrob Agents Chemother*, 2014, 58: 61-70
31. http://www.inspiralis.com/files/e_coli_gyrase_plate_kit.pdf, (dostopano marec 2016)
32. Sollner Dolenc M, Pečar S: Vaje iz farmacevtske kemije III, 85-87
33. Greene TW, Wuts PGM: Protective groups in organic synthesis, Second Edition, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1991
34. Eloy F, Lenaers R: The Chemistry of Amidoximes and Related Compounds. *Chem Rev*, 1962, 62(2), 155-162

35. Kočevan M, Polanc S, Sollner Dolenc M, Tišler M, Verček B: Simple procedure for the synthesis of the pyridinecarbohydroximoyl chlorides and bromides. *Synth Commun*, 1988, 18(12), 1427-1432
36. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Hidroliza>, (dostopano avgust 2015)