

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

JASNA GRAH

**SINTEZA DERIVATOV 3-AMINOBENZONITRILA S POTENCIALNIM
PROTIBAKTERIJSKIM DELOVANJEM**

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2014

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



JASNA GRAH

**SINTEZA DERIVATOV 3-AMINOBENZONITRILA S POTENCIJALNIM
PROTIBAKTERIJSKIM DELOVANJEM**

**SYNTHESIS OF 3-AMINOBENZONITRILE DERIVATIVES WITH POTENTIAL
ANTIBACTERIAL ACTIVITY**

MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2014

Eksperimentalni del magistrske naloge sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani in na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

ZAHVALA

Iskreno se zahvaljujem mentorici prof. dr. Mariji Sollner Dolenc, mag. farm. za strokovno pomoč, za vzpodbudne besede in za ves vložen trud. Najlepša hvala tudi vsem ostalim članom Katedre za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani, da so mi pomagali pri eksperimentalnem delu, še posebej pa bi se zahvalila ge. Damjani Zalar. Hvala tudi mojim domačim, da so mi stali ob strani skozi študij in verjeli vame.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod vodstvom mentorice prof. dr. Marije Sollner Dolenc, mag. farm.

Ljubljana, 2014

Jasna Grah

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Stanko Srčič

Član magistrske komisije: doc. dr. Simon Žakelj

KAZALO VSEBINE

1. UVOD.....	1
1. 1. Bakterije	1
1. 1. 1. Zgradba bakterijske celice	2
1. 2. Definicija pojmov antibiotik in kemoterapeutik.....	3
1. 3. Kemijska zgradba DNA v bakterijah.....	3
1. 4. Podvojevanje ali replikacija DNA pri bakterijah	4
1. 5. DNA topoizomeraze.....	5
1. 5. 1 DNA giraza.....	6
1. 5. 1. 1. Zgradba DNA giraze	6
1. 6. Inhibitorji topoizomeraz tipa IIA.....	7
1. 6. 1. Inhibitorji podenote B DNA giraze	7
1. 6. 1. 1. Aminokumarini in njihovi analogi	7
1. 6. 1. 2. Ciklotialidini	10
1. 6. 2. Inhibitorji, ki nimajo definiranega načina vezave na topoizomeraze tipa IIA	11
1. 6. 3 Inhibitorji, ki se vežejo na katalitsko jedro topoizomeraz tipa IIA	12
2. NAMEN DELA	17
2. 1. Reakcijska shema	19
3. MATERIALI IN METODE	21
3. 1. Materiali	21
3.2. Metode	21
3. 2. 1 Kromatografske metode	21
3. 2. 2. Spektroskopske metode	22
3.2.3 Določanje tališča.....	22
4. EKSPERIMENTALNI DEL	23
4.1. Sinteza <i>N</i> -(3-cianofenil)acetamida (1).....	23
4.2. Sinteza <i>N</i> -(3-(<i>N'</i> -hidroksikarbamimidoil)fenil)acetamida (2).....	24

4.3. Sinteza etil 3-(((3-acetamidofenil)(amino)metilen)amino)oksi)-3-oksopropranoata (3i)	25
4.4. Sinteza etil 2-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) acetata (3).....	27
4.5 Sinteza 3-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) propanojske kisline (4).....	28
4.6 Sinteza hidroklorida 3-(3-(3-aminofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) propanojske kisline (5)	29
4.7 Sinteza 3-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)anilina (6).....	31
4.8. Poskus sinteze <i>N</i> -(3-cianofenil)- <i>1H</i> -indol-2-karboksamida (7)	32
4.9 Sinteza <i>N</i> -(3-cianofenil)- <i>1H</i> -indol-2-karboksamida (7).....	33
4.10 Sinteza <i>N</i> -(3-(<i>N'</i> -hidroksikarbamimidoil)fenil)- <i>1H</i> -indol-2-karboksamida (8)	35
4.11. Sinteza 4,5-dibromo- <i>N</i> -(3-cianofenil)- <i>1H</i> -pirol-2-karboksamida (10)	36
4.12 Sinteza 4,5-dibromo- <i>N</i> -(3-(<i>N'</i> -hidroksikarbamimidoil)fenil)- <i>1H</i> -pirol-2-karboksamida (11)	37
4.13 Poskus sinteze 3-(3-(3-(<i>1H</i> -indol-2-karboksamido)fenil)-1,2,4-oksadiazol-5 il) propanojske kisline (12)	39
4.14. Sinteza 3-(3-(3-(<i>1H</i> -indol-2-karboksamido)fenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) propanojske kisline (13)	40
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	42
5.1. Uvedba acetamidne zaščite v 3-aminobenzonitril	42
5.2. Tvorba amidoksimov 2, 8 in 11	42
5.3. Tvorba 3,5-disubstituiranih-1,2,4-oksadiazolov 3, 4 in 13	44
5.4. Poskus sinteze amida 7 preko kislinskega klorida.....	46
5.5. Tvorba amidov 7, 10 in 12 z 2,4,6-trikloro-1,3,5-triazinom	47
5.6. Hidroliza amidne vezi – sinteza spojin 5 in 6.....	48
6. SKLEPI.....	51
7. LITERATURA	53

I. POVZETEK

Poznamo različne mikroorganizme, kot so bakterije, arheje, glive, praživali in alge, mnoge izmed njih pa lahko povzročajo različne zdravstvene težave tudi ljudem. Veliko skrb povzročajo bakterijske okužbe, saj postajajo bakterije vedno bolj odporne na protimikrobne učinkovine. Zato je pomembno in smiselno razvijati nova zdravila za okužbe z bakterijami. Najpogostejsa zdravila za bakterijske okužbe so antibiotiki in kemoterapevtiki. Protibakterijska zdravila delujejo na več tarč, na sintezo celične stene, na sintezo beljakovin, na esencialne metabolne poti, na zunanjo celično membrano in seveda na sintezo nukleinskih kislin. Ena izmed zelo pomembnih tarč novih protibakterijskih učinkovin v zadnjih letih je DNA giraza. DNA giraza je bakterijski encim, ki spada med topoizomeraze tipa IIA. Odkrita je bila leta 1976 v *E. coli*, njena posebnost je sposobnost negativnega dodatnega zvitja dvojne vijačnice. Negativno dodatno zvitje DNA pomeni, da je DNA dodatno zvita v nasprotni smeri zavojev dvojne vijačnice. Giraza sodeluje pri začetku DNA replikacije in odstranjuje pozitivno dodatno zvitje verig nukleinskih kislin. DNA giraza ima heterotetramerno strukturo. Sestavljen je iz dveh različnih podenot Gyr A in Gyr B.

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali derivate 3-aminobenzonitrila s potencialnim inhibitornim delovanjem na B podenoto DNA giraze, ki je odgovorna za vezavo in hidrolizo ATP molekule. V prvem sklopu smo najprej v 3-aminobenzonitril uvedli acetamidno skupino (*N*-(3-cianofenil)acetamid (**1**)), ki je služila kot zaščitna skupina za aminsko skupino. Iz tako pripravljenega nitrila smo nato s pomočjo hidroksilamonijevega klorida tvorili amidoksim *N*-(3-(*N'*-hidroksikarbamimidooil)fenil)acetamid (**2**) in iz tega s pomočjo derivatov karboksilnih kislin (sukcinanhidrid in etilmalonil klorid) sintetizirali 3,5-disubstituirane 1,2,4-oksadiazole: etil 2-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)acetat (**3**) in 3-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) propanojsko kislino (**4**). Odstranitev acetamidne zaščitne skupine je pri spojnici (**3**) potekala v neželeno smer, tako da smo izolirali 3-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)anilin (**6**).

To je bil tudi vzrok, da smo želeli preizkusiti drugo sintezno pot za pripravo končnih spojin. Tako smo skušali najprej acilirati 3-aminobenzonitril z ustrezno kislino (indol-2-karboksilno kislino in 4,5-dibromopirol-2-karboksilno kislino). Dokazali smo, da je ta pot glede izkoristkov in enostavnosti izolacije produktov optimalnejša od prvotno izbrane. Ugotovili smo tudi, da je optimalni sklopitveni reagent za tvorbo amidov *N*-(3-cianofenil)-

1H-indol-2-karboksamida (**7**) in *4,5-dibromo-N-(3-cianofenil)-1H-pirol-2-karboksamida* (**10**) *2,4,6-trikloro-1,3,5-triazin* (TCT).

Iz pripravljene spojine **7** smo nato tvorili amidoksim *N-(3-(N'-hidroksikarbamimidoil)fenil)-1H-indol-2-karboksamid* (**8**), ki smo ga ciklizirali v 1,2,4-oksadiazol: *3-(3-(3-(1*H*-indol-2-karboksamido)fenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) propanojsko kislino* (**13**). Iz pripravljene spojine **10** pa smo tvorili amidoksim *4,5-dibromo-N-(3-(N'-hidroksikarbamimidoil)fenil)-1H-pirol-2-karboksamid* (**11**).

Spojine **3**, **4** in **13** so bile testirane na inhibicijo DNA giraze, pri čemer smo ugotovili, da ima spojina 4 minimalno inhibicijo pri 100 µM koncentraciji.

II. ABSTRACT

In our world exist different types of microorganisms, among them bacteria, archaea, fungi, protozoa and algae, many of which are also cause of different health problems in human population. These days, bacterial infections are cause for huge concern, because bacteria are becoming more and more resistant to antimicrobial drugs. That's why the research and development of new antibacterial drugs is so meaningful and important. Most widely used drugs for bacterial infections are antibiotics and chemotherapeutics. Antibacterial agents are acting on several targets, which are synthesis of cell wall, essential metabolic pathways, outer cell membrane and of course the synthesis of nucleic acids. Lately DNA gyrase has been a very important target for new antibacterial substances. DNA gyrase is a bacterial enzyme from topoisomerase IIA family. It has been discovered in year 1976 in *E. coli* and its speciality is negative supercoiling of DNA double helix. Gyrase is involved at the beginning of DNA replication, when it removes positive supercoils of nucleic acid strands. The structure of DNA gyrase is a heterotetramer. It's composed of two different subunits, Gyr A and Gyr B.

In frame of this masters thesis we synthesized derivatives of 3-aminobenzonitril that could potentially inhibit B subunit of DNA gyrase, which is responsible for binding and hydrolysis of ATP molecule. In first set of syntheses we introduced acetamide group into 3-aminobenzonitrile (*N*-(3-cyanophenyl)acetamide (**1**)), which was then used as protecting group for amine functional group. From so prepared nitrile we then with help of hydroxylammonium chloride synthesized amidoxime *N*-(3-(*N'*-hydroxycarbamidoyle)phenyl)acetamide (**2**), from which 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazole ethyl 2-(3-(3-acetamidophenyl)-1,2,4-oxadiazole-5-yl) acetate (**3**) and 3-(3-(3-acetamidophenyl)-1,2,4-oxadiazole-5-yl) propanoic acid (**4**) were synthesized with help of carboxylic acid derivatives (succinic anhydride and ethylmalonyl chloride). Removal of acetamide protecting group in compound (**3**) didn't proceed the way we wanted it to and we isolated 3-(5-methyl-1,2,4-oxadiazole-3-yl)aniline (**6**).

That's why we wanted to try out another synthetic pathway to get our final compounds. First we tried to acylate 3-aminobenzonitrile with adequate acid(indole-2-carboxylic acid and 4,5-dibromopyrrole-2-carboxylic acid). We found out that 2,4,6-trichloro-1,3,5-triazine (TCT) is optimal coupling reagent for synthesis of amides *N*-(3-cyanophenyl)-1*H*-indole-2-carboxamide (**7**) and 4,5-dibromo-*N*-(3-cyanophenyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**10**). From compound **7** we then formed amidoxime *N*-(*N'*

hydroxycarbamimidoyle)phenyl)-1*H*-indole-2-carboxamide (**8**), which we then cyclised into 1,2,4-oxadiazole: 3-(3-(3-(1*H*-indole-2-carboxamido)phenyl)-1,2,4-oxadiazole-5-yl) propanoic acid (**13**). From compound **10** we then formed amidoxime 4,5-dibromo-*N*-(3-(*N'*-hydroxycarbamimidoyle)phenyl)-1*H*-pyrrole-2-carboxamide (**11**). We then tested compounds **3**, **4** and **13** on their inhibition of DNA gyrase. We found out that compound **4** exhibits minimal inhibition at concentration of 100 µM.

III. SEZNAM OKRAJŠAV

ATP	adenozin trifosfat
b.v.	brezvodni
CDCl ₃	devteriran kloroform
CHN	elementna analiza
d	dublet
DMF	N,N-dimetilformamid
DMSO-d ₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EA	elementna analiza
HR-MS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
FT IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitvena konstanta
KF	kalijev fluorid
m	multiplet
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
Mr	relativna molekulska masa
MS	masna spektroskopija
NMM	N-metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
q	kvartet
Rf	retencijski faktor
rs	razširjen singlet
s	singlet
T	temperatura
t	triplet
TCT	2,4,6-trikloro-1,3,5-triazin
TEA	trietilamin
THF	tetrahidrofuran

TLC	tankoplastna kromatografija
δ	kemijski premik

1. UVOD

Mikroorganizmi se nahajajo vsepošvodi, tako v zemlji, vodi in zraku kot tudi na in v človeškem organizmu (1, 2). Med mikroorganizme uvrščamo bakterije, arheje, glice, praživali in alge. Bakterije spadajo med prokariontske organizme, medtem ko arheje, glice, praživali in alge spadajo med evkariontske organizme (3).

Bakterije so lahko za človeka koristne, lahko pa povzročajo bolezni (2). Za preprečevanje in zdravljenje bakterijskih infekcij pri ljudeh in živalih se uporablja protimikrobne učinkovine. Uporaba teh lahko povzroči odpornost bakterij nanje. V zadnjih letih se je bakterijska odpornost na protimikrobne učinkovine povečala po vsem svetu (4). Čim večja je uporaba protibakterijskih učinkovin, večja je tudi odpornost. Velikokrat zdravniki predpišejo protibakterijska zdravila, ko to sploh ni potrebno (npr. pri virusnih okužbah). Pri virusnih okužbah protibakterijske učinkovine ne učinkujejo. Če zdravimo virusne okužbe npr. z antibiotiki, naredimo več škode kot koristi, saj naredimo stroške običajno za zavarovalnico, škodujemo bolniku, ki jemlje npr. antibiotike (neželeni učinki zdravila, uničevanje črevesne flore) in tudi povečamo možnost za razrast bakterij, ki so na antibiotik neobčutljive (2).

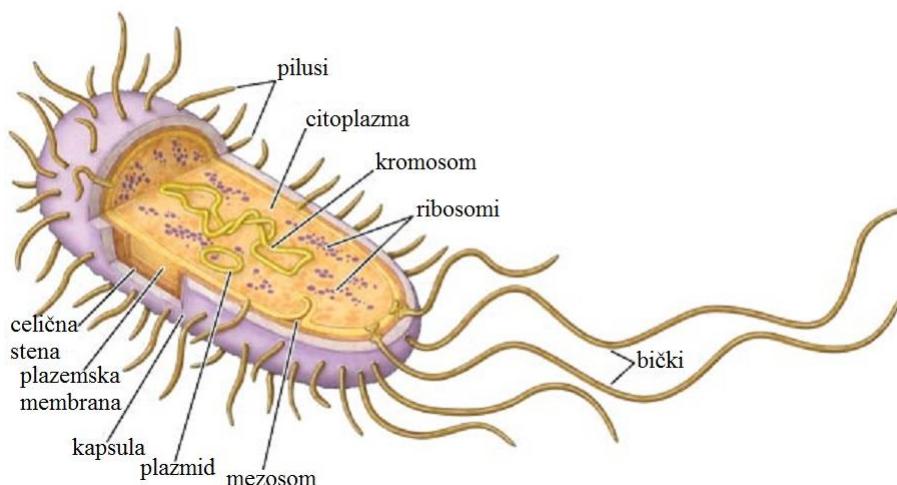
V zadnjih dveh desetletjih se je močno povečala bakterijska rezistenca na obstoječa zdravila. Mnogi patogeni sevi so postali odporni na skoraj vse glavne razrede protibakterijskih učinkovin. To predstavlja pomembno in vedno večjo nevarnost za javno zdravje. Od leta 2000 je FDA (ang. Food and Drug Administration) odobrila samo dve protibakterijski učinkovini (daptomicin in linezolid), ki delujeta preko novih mehanizmov, sta pa obe neučinkoviti proti infekcijam povzročenih z Gram negativnimi bakterijami. Zato je nujna potreba po novih protibakterijskih zdravilih (5).

1. 1. Bakterije

Bakterija meri v dolžino od $0,3 \mu\text{m}$ do $20 \mu\text{m}$, medtem ko je premer večine bakterij okrog $1 \mu\text{m}$. Glede na barvanje po Gramu razdelimo bakterije na po Gramu pozitivne in na po Gramu negativne. Bakterije se različno obarvajo po Gramu zaradi različne zgradbe celičnih sten. Po Gramu pozitivne bakterije se obarvajo modrovijoličasto, medtem ko se po Gramu negativne bakterije obarvajo rdeče. Celična stena oblikuje bakterijsko celico. Po obliku ločimo kroglaste (kokci) in paličaste (bacili) ter spiralne bakterije (spirohete) (6).

1. 1. 1. Zgradba bakterijske celice

Bakterijska celica je znotraj napolnjena s citoplazmo, ki jo zunaj obdaja selektivno prepustna citoplazemska membrana. Citoplazemska membrana obdaja bakterijska celična stena. Nekatere bakterije imajo zunaj še dodatni ovoj, t. i. bakterijsko kapsulo, ki jih ščiti pred neugodnim okoljem. Bakterijska celica nima jedra, zato DNA leži prosto v citoplazmi. Molekula DNA bakterij je običajno krožna molekula. Bakterijska celica lahko vsebuje še manjše, krožne molekule DNA (plazmide). Bakterijska celica nima membranskih organelov in tudi ribosomi so manjši kot pri evkariontih. Nekatere bakterije imajo tudi bičke, ki omogočajo, da se bakterija giblje. Pilusi služijo, da se bakterija pritrdi na površino. Obstajajo tudi spolni pilusi, ki bakteriji omogočajo izmenjavo DNA med bakterijami (6).



Slika 1: Zgradba bakterijske celice (7)

Bakterijske spore so oblika bakterij, v katere preidejo določene bakterije v neugodnih razmerah. Bakterijske spore so izredno odporne na neugodne vplive in so metabolno neaktivne (6).

Ko zbolimo za bakterijskimi infekcijami, se poslužujemo različnih protibakterijskih zdravil. Večina znanstvenikov razlikuje dve skupini protimikrobnih učinkovin, ki se uporabljajo pri zdravljenju bakterijskih bolezni:

- antibiotike in
- kemoterapeutike.

Obstajajo pa tudi polsintezni derivati antibiotikov, kjer osnovno spojino sintetizirajo mikroorganizmi, ki jo kasneje modificirajo s kemijskimi pristopi in tako dosežejo želene lastnosti protibakterijske učinkovine (8).

1. 2. Definicija pojmov antibiotik in kemoterapevtik

Antibiotiki so zdravila za zdravljenje bakterijskih infekcij (9). Antibiotiki so spojine biološkega izvora, torej jih tvorijo organizmi, kot so glice, bakterije, lišaji ali višje rastline. Med antibiotike štejemo tudi njihove polysintezne derivate.

Kemoterapevtiki pa so sinteznega izvora in jih pridobimo s kemijsko sintezo.

Ime antibiotik se pogosto uporablja širše za vsa zdravila za zdravljenje bakterijskih infekcij, tudi za kemoterapevtike in tudi za antimikotike (10).

Antibiotiki lahko delujejo baktericidno (ubijejo bakterijo) ali pa bakteriostatično (zavrejo rast bakterij) (8).

Glede na spekter delovanja delimo antibiotike na:

- antibiotike širokega spektra delovanja (ti antibiotiki uničijo ali zavirajo po Gramu pozitivne in po Gramu negativne bakterije) ter na
- antibiotike ozkega spektra delovanja (ti delujejo samo proti ali po Gramu pozitivnim ali po Gramu negativnim bakterijam) in na
- antibiotike z omejenim spektrom delovanja (delujejo proti enemu organizmu oz. bolezni) (8).

Antibiotiki delujejo na pet glavnih bakterijskih tarč:

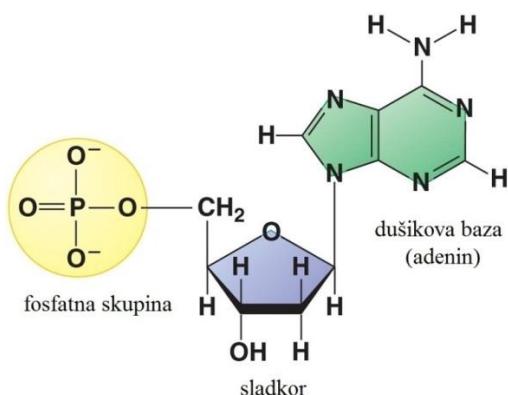
- 1) sintezo celične stene
- 2) sintezo beljakovin
- 3) podvajanje ali replikacijo DNA
- 4) esencialne metabolne poti
- 5) zunanjo celično membrano (8).

DNA giraza je tarča protibakterijskih učinkovin in je pomembna pri podvojevanju DNA, zato bomo v nadaljevanju predstavili kemijsko zgradbo ter način podvojevanja DNA v bakterijah.

1. 3. Kemijska zgradba DNA v bakterijah

DNA je zgrajena iz monomernih enot-nukleotidov. Nukleotidi pa so sestavljeni iz treh enot:

- iz dušikove baze purina ali pirimidina
- iz sladkorja 2-deoksiriboze
- iz ene, dveh ali treh fosfatnih skupin (12).



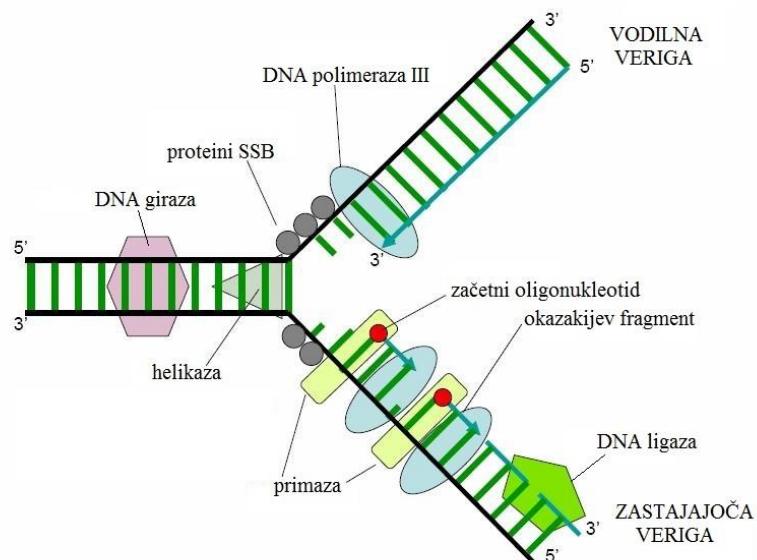
Slika 2: Zgradba nukleotida deoksiadenozin-5'-monofosfat ali 5'-dAMP (11)

DNA vsebuje purinski dušikovi bazi adenin in gvanin ter pirimidinski dušikovi bazi timin in citozin. Nukleotidi so povezani s 3',5'-fosfodiestersko povezavo, kjer se 5'-fosfatna skupina enega nukleotida poveže s 3'-hidroksilno skupino sosednjega nukleotida. Deoksiriboze in fosfatne skupine sestavljajo kovalentno ogrodje DNA, ki je nespremenljivi del zgradbe. DNA ima še spremenljivi del zgradbe in sicer ga sestavljajo dušikove baze, ki so s kovalentnim ogrodjem povezane z N-glikozidnimi vezmi. Dušikove baze so med seboj povezane z vodikovimi vezmi. Adenin se povezuje s timinom ter gvanin s citozinom. Te povezave baz omogočajo, da ima DNA strukturo dvojne vijačnice (je sestavljena iz dveh komplementarnih polinukleotidnih verig, ki sta zaviti ena okoli druge) (12).

1. 4. Podvojevanje ali replikacija DNA pri bakterijah

Da se lahko DNA podvoji, se morata verigi DNA razpreti. S tem ko se verigi DNA razpreta, nastaneta dve enojni verigi, ki sta matrici za nadaljnjo sintezo DNA. Določena mesta, kjer se začne podvojevanje DNA, imenujemo izhodišča replikacije ali iniciacijska mesta. Za podvojevanje DNA je potrebno več encimov in vsak ima svojo specifično vlogo pri podvajjanju DNA. Prvi encim, imenovan helikaza, se veže na iniciacijsko mesto in katalizira ločitev dveh verig DNA, s tem da prekine vodikove vezi med dušikovimi bazami. Drug encim, ki pomaga pri odviju verig DNA, je DNA giraza. DNA giraza katalizira uvajanje dodatnega zvitja in s tem zmanjša napetost verig. O tem encimu bomo povedali malo več kasneje. Ko se verigi DNA razpreta, nastopijo svojo vlogo proteini SSB (proteini, ki se vežejo na razklenjeno DNA) in s tem preprečijo ponovno združitev verig DNA. Naslednja stopnja je sinteza DNA, pri kateri sodeluje naslednji encim DNA polimeraza III, ki pa za svoje delovanje potrebuje začetni oligonukleotid, to je kratki del RNA (od 4 do 10 nukleotidov), ki je komplementaren matrici DNA. Encim primaza

katalizira sintezo začetnega oligonukleotida in s tem pomaga DNA polimerazi III, da lahko začne sintezo verige. Sinteza verig DNA poteka v smeri od 5' proti 3' koncu. Imamo dve verigi, vodilno in zaostajajočo verigo. Podaljševanje vodilne verige poteka v smeri replikacijskih vilic, medtem ko poteka sinteza zastajajoče verige v obratni smeri. Funkcija DNA polimeraze I je, da katalizira zamenjavo začetnih oligonukleotidov z deoksiribonukleotidi. Funkcija naslednjega encima, ki prispeva k sintezi DNA pa je DNA ligaza, ki katalizira sintezo fosfodiesterske vezi med Okazakijevimi fragmenti. Ti fragmenti se imenujejo po japonskem znanstveniku Okazakiju, ki je pri preučevanju podvajanja DNA odkril te kratke fragmente DNA (od 1000 do 2000 nukleotidov) (12). Okazakijevi fragmenti nastanejo s pomočjo oligonukleotidnih začetnikov (ang. RNA primer). Le te pa sintetizirajo, kot smo že omenili, encimi primaze. Na oligonukleotidne začetnike pa DNA polimeraza III dodaja deoksiribonukleotide (13).



Slika 3: Podvojevanje ali replikacija DNA pri bakterijah (14)

1. 5. DNA topoizomeraze

DNA topoizomeraze so encimi v celicah, ki vzdržujejo ustrezni nivo dodatnega zvitja DNA in odpravljajo vozle ter zanke iz genetskega materiala. DNA topoizomeraze uravnavajo topološke lastnosti DNA, tako da ustvarijo začasne prekinitve v ogrodju DNA. Obstajata dva razreda topoizomeraz, ki se razlikujeta po številu DNA verig, ki ju cepita med njunim katalitičnim ciklom. Tako poznamo topoizomeraze tipa I in topoizomeraze tipa II. Topoizomeraze tipa I ustvarjajo začasne prekinitve ene verige dvovijačne DNA,

medtem ko topoizomeraze tipa II ustvarjajo začasne prekinitve obeh dvovijačnih DNA verig hkrati. Ezbakterije vsebujejo dve različni vrsti topoizomeraz tipa II in sicer DNA girazo in topoizomerazo IV. Obe spadata v poddružino tipa IIA. Poleg teh dveh encimov veliko arhej vsebuje tretji encim tipa II, topoizomerazo VI. Topoizomeraza VI spada v poddružino IIB. DNA pod torzijsko napetostjo imenujemo dodatno zvita DNA (15).

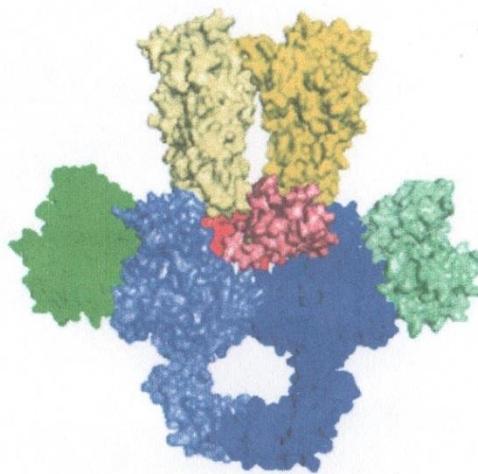
1. 5. 1 DNA giraza

DNA giraza spada med najbolj preiskane tarče v protibakterijski terapiji (16). DNA giraza je bakterijski encim, ki je bil odkrit leta 1976 v *E. coli* (15,16). DNA giraza je bila prva opisana topoizomeraza tipa II in edina, ki je obdržala svoje zgodovinsko ime. V nasprotju z vsemi ostalimi topoizomerazami tipa II je DNA giraza edini encim sposoben negativnega dodatnega zvitja dvojne vijačnice. DNA giraza igra odločilno vlogo pri začetku DNA replikacije in odstranjuje pozitivno dodatno zvitje, ki se kopiji v začetku replikacijskih vilic in transkripcijskih kompleksih (15).

Bakterijska DNA giraza in bakterijska topoizomeraza IV sta zgrajeni zelo podobno (glej sliko 4). Topoizomeraza IV je zgrajena iz dveh Par C in dveh Par E podenot (17). Mi se bomo osredotočili predvsem na zgradbo DNA giraze.

1. 5. 1. 1. Zgradba DNA giraze

Aktivna DNA giraza ima heterotetramerno strukturo. Sestavljena je iz dveh različnih podenot Gyr A in Gyr B. Podenota A (Gyr A) DNA giraze je sestavljena iz N-terminalne »breakage-reunion« domene (na sliki 4 prikazano z modro barvo) in CTD domene (»carboxy-terminal domain«) (na sliki 4 prikazano z zeleno barvo). Podenota B (Gyr B) DNA giraze pa je sestavljena iz ATP-azne domene (na sliki 4 prikazane z rumeno barvo) in iz TOPRIM domene (na sliki prikazane z rdečo barvo) (17).



Slika 4: Model splošne zgradbe topoizomeraž tipa IIA (DNA giraze in topoizomeraze IV) (17)

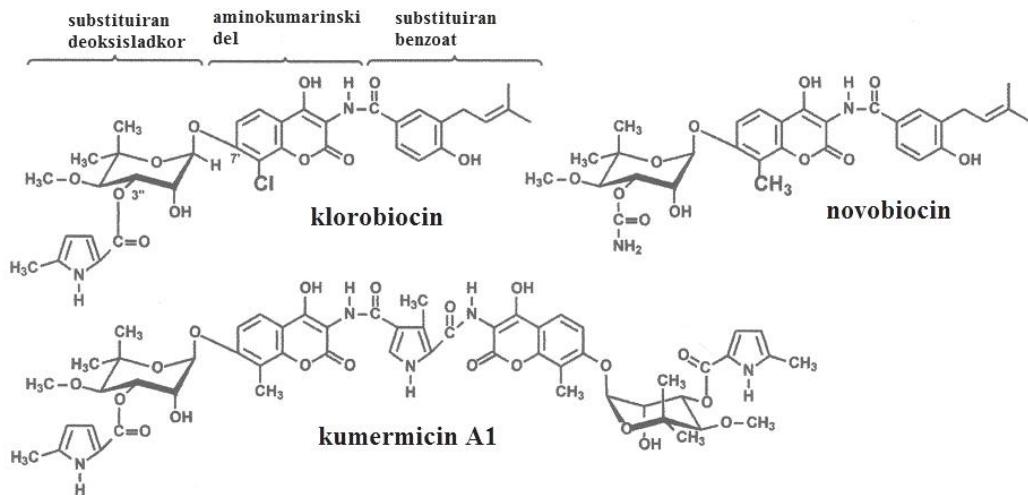
Mesto za cepitev in ponovno združitev dvovijačne DNA se nahaja v katalitskem jedru kompleksa, ki je sestavljen iz »breakage reunion« domene in TOPRIM domene. Energijo, ki je potrebna za konformacijske spremembe DNA, proizvede ATP-azna domena s hidrolizo ATP. »Breakage-reunion« domena podenote A DNA giraze ima srčasto (ang. heart-shaped) razporeditev z dvema dimernima vmesnikoma. CTD ima spiralno šest listnato β -vetrnično strukturo (ang. spiral six-bladed β pinwheel structure) in vezavno mesto za ATP vsebuje Bergerat/GHKL globel. Ta zadnji strukturni element je prisoten v ATP-aznih domenah družin encimov, kot so DNA giraze, »heat shock protein 90 (HSP90), histidinske kinaze in Mut L in ni povezan z drugimi standardnimi ATP vezavnimi mesti. TOPRIM podenota vsebuje vezavno mesto za magnezijeve ione in interagira z »breakage-reunion« domeno podenote A DNA giraze in tvori katalitsko jedro, ki je ključno za vezavo DNA (17).

1. 6. Inhibitorji topoizomeraž tipa IIA

1. 6. 1. Inhibitorji podenote B DNA giraze

1. 6. 1. 1. Aminokumarini in njihovi analogi

Novobiocin, kumermicin A₁ in klorobiocin spadajo v razred antibiotikov, ki jih proizvaja rod *Streptomyces* (17).



Slika 5: Strukturne formule klorobiocina, novobiocina in kumermicina A1 (16)

Študije mehanizma antibakterijskega delovanja novobiocina in kumermicina A1 so pokazale, da inhibira DNA girazo in topoizomerazo IV tako, da se vežeta na ATP-azno domeno Gyr B podenote ali Par E podenote (17).

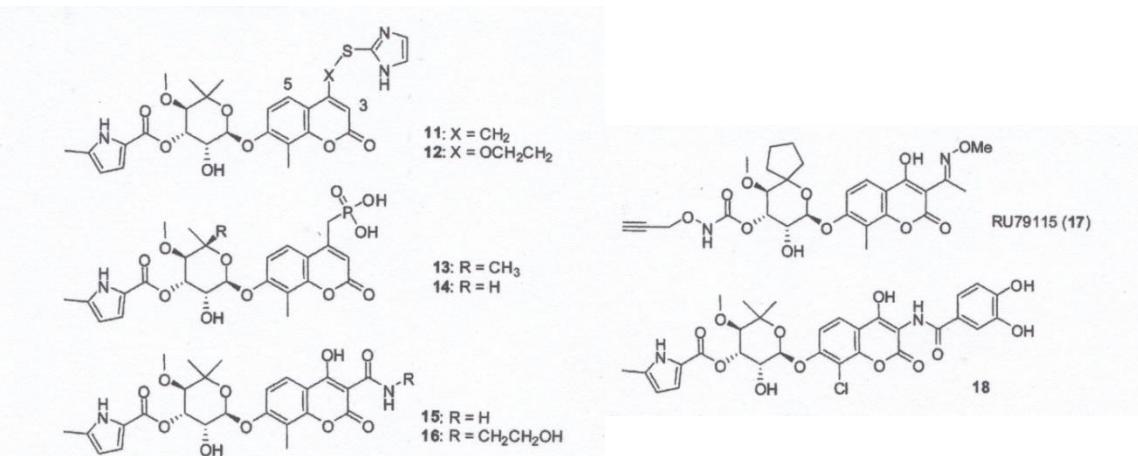
Novobiocin, kumermicin A1 in klorobiocin so si po strukturi zelo podobni (16).

Strukturi klorobiocina in novobiocina se razlikujeta le v tem, da je pri novobiocinu namesto klorovega atoma metilna skupina in še v tem, da ima novobiocin karbamatno skupino namesto pirolne skupine (17). Klorobiocin ima zaradi metilne skupine na pirolnem delu močnejšo afiniteto do DNA giraze od novobiocina (18).

Antibiotik novobiocin je bil na tržišču le določen čas, nato so ga zaradi njegovih neželenih učinkov, interakcij z drugimi zdravili, slabe topnosti ter toksičnosti za evkarionte umaknili iz uporabe. Za kumermicin A1 so ugotovili, da nima učinka *in vivo* (17).

Kljub tem pomanjkljivostim so želeli na osnovi povezave med strukturo in delovanjem te skupine učinkovin razviti terapevtsko uporabne učinkovine. Analize so pokazale, da polaren in slabo topen amid na mestu 3 kumarinskega skeleta osnovnih aminokumarinov ni zelo pomemben, lahko ga odstranimo odvisno od substituentov na mestu 4. Pri umeščanju klorobiocina v ATP vezavno mesto ima hidroksibenzoat izopentenilna skupina le majhno vlogo. Spojini 13 in 14, ki sta prikazana na sliki 6, sta se izkazala kot inhibitorja. Tudi reverzni amidi so se izkazali kot zelo aktivni, (derivata 15 in 16 na sliki 6). Derivata 15 in 16 sta bila učinkovita tudi pri sevih, ki so bili odporni na novobiocin (17). Zamenjava novobioze z ramnozo je vodila do manj učinkovitih analogov (19). Ključno vlogo ima tudi metoksi substituent novobioze. Derivat 17, ki je prikazan na sliki 6, ni zaviral giraze.

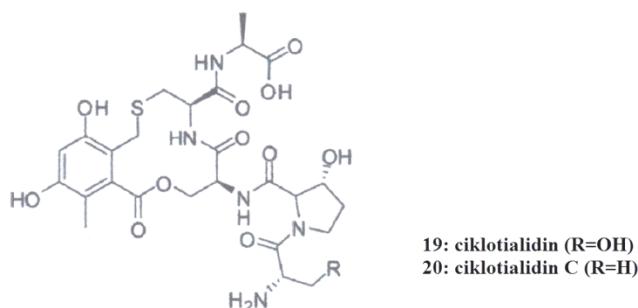
Derivat 18 (slika 6), ki vsebuje 3,4-dihidroksibenzamidno skupino pa je izkazal močno inhibicijo DNA giraze in tudi dobro stopnjo protibakterijskega delovanja. Na žalost je ta 3,4-dihidroksibenzamidna skupina podvržena glukuronidaciji, kar privede do hitrega izločanja *in vivo* (17).



Slika 6: Slika prikazuje derivate osnovnih oz. klasičnih aminokumarinov (17)

1. 6. 1. 2. Ciklotialidini

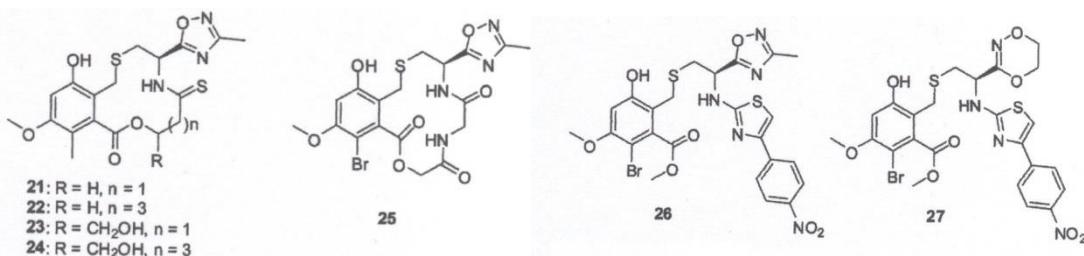
Ciklotialidin (slika 7) je v naravi prisoten antibiotik, ki so ga odkrili med rešetanjem za potencialne inhibitorje DNA giraze v fermentacijski brozgi *Streptomyces* NR0484 FERM-BP-1982. Izolirali so tudi zelo podoben analog ciklotialidin C (slika 7). Prav tako pa so poročali tudi o derivatih brez metilne skupine na resorcinolnem obroču in derivatih, ki so vsebovali glutaminsko kislino namesto serina v ciklotialidinu (17).



Slika 7: Strukturi ciklotialidina in ciklotialidina C (17)

Ciklotialidin (19 na sliki 7) nima učinka na bakterije, ki imajo nepoškodovano celično steno, verjetno zaradi nezadostnega prehajanja v citoplazemske membrane (20).

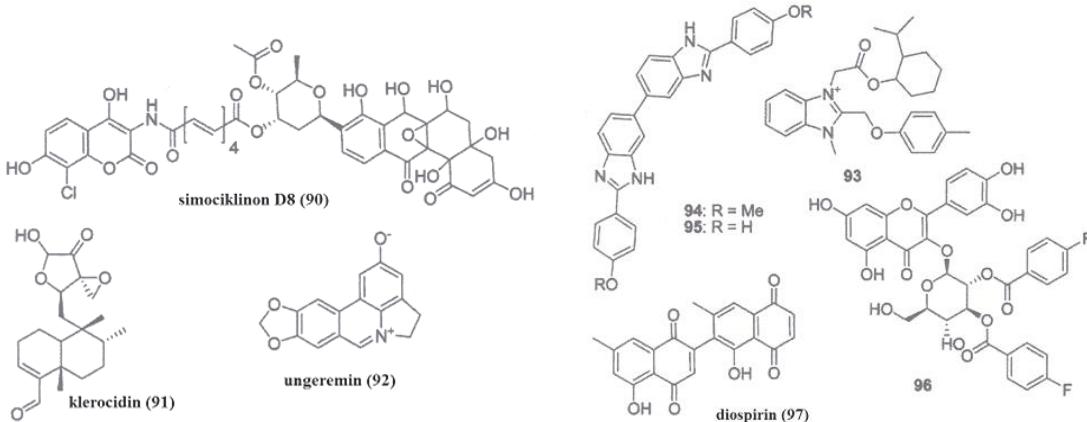
Zaradi dejstva, da ciklotialidin ne inhibira evkariontskih topoizomeraz in zaradi spodbudnega *in vitro* delovanja prvih njegovih analogov, so se odločili za obsežne raziskave povezav med strukturo in delovanjem. Ugotovili so, da peptidna stranska veriga v makrociklu te spojine ni ugodna za protibakterijski učinek. Strukturne spremembe so privedle do analogov 21-24 (slika 8), ki vsebujejo pomembne fenolne skupine, lipofilne tioamid in oksadiazolni fragment. Analoga 21 in 22 (slika 8) sta sicer izkazovala dobro protibakterijsko delovanje, vendar sta bila neučinkovita *in vivo*, za razliko od analogov 23 in 24 (slika 8), ki sta bila manj učinkovita *in vitro*, vendar pa sta se izkazala *in vivo*. Spojina 25 (slika 8) je laktam-laktonski derivat, ki vsebuje lipofilni brom in nima tioamidne skupine v primerjavi z analogi 21-24. Ta spojina se je izkazala *in vivo* kot najbolj učinkovita. Glukuronidacija fenolne skupine vodi do hitrega izločanja *in vivo*, kar je slabost te serije inhibitorjev. Ker lipofilni brom spojine 25 (slika 8) vpliva na kislost fenolne skupine, je možno, da je ta sprememba vplivala na zmanjšan obseg glukuronidacije. Spojini 26 in 27 (slika 8) sta se izkazali tudi kot *in vitro* aktivni, vendar pa ta dva lipofilna analoga izkazujeta le majhne učinke *in vivo* (17).

**Slika 8: Derivati ciklotialidina (17)**

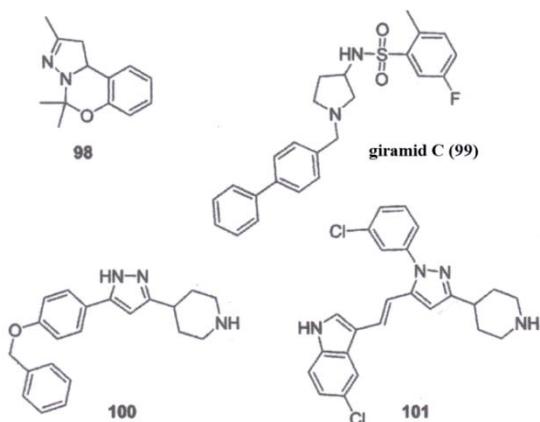
Vse učinkovine, ki so inhibitorji podenote B DNA giraze se vežejo tako, da zasedejo mesto molekuli ATP v ATP vezavnem mestu in s tem preprečijo vezavo te molekule. Ker se molekula ATP ne veže, se ne tvori energija, potrebna za delovanje DNA giraze (17).

1. 6. 2. Inhibitorji, ki nimajo definiranega načina vezave na topoizomeraze tipa IIA

Simociklinon D8 (90) (slika 9) je še eden naravno prisoten inhibitor DNA giraze, ki vsebuje kumarinsko skupino. Simociklinon D8 ni selektivno učinkovit proti bakterijam, saj inhibira tudi humani topoizomerazi I in II. Za spojino 91 (slika 9), ki inhibira sesalčjo topoizomerazo II, so poročali, da inhibira tudi DNA girazo. Izkazalo se je, da je ta spojina alkilant. Ungeremin (92) (slika 9) je prav tako naravno prisotna spojina, ki inhibira tako bakterijske kot humane topoizomeraze. Njegova struktura spominja na benzo[c]fenantridinske alkaloide. Za pozitivno nabit benzimidazol 93, ki ima precej močno protibakterijsko delovanje, se je izkazalo, da šibko inhibira obe topoizomerazi tipa IIA. Dimerni 4-metoksifenilbenzimidazolni derivat (94) (slika 9), kakor tudi njegovi 4-amino analogi, inhibirajo bakterijsko DNA girazo. 3-O-glikozidi, kot je 96, inhibirajo DNA girazo in imajo protibakterijske lastnosti. Spojina 96 (slika 9) ima v svoji strukturi kvercetin. Tudi polifenolni biskinoni kot je diospirin (97) inhibirajo bakterijsko DNA girazo.

**Slika 9: Strukturne formule spojin od 90 do 97 (17)**

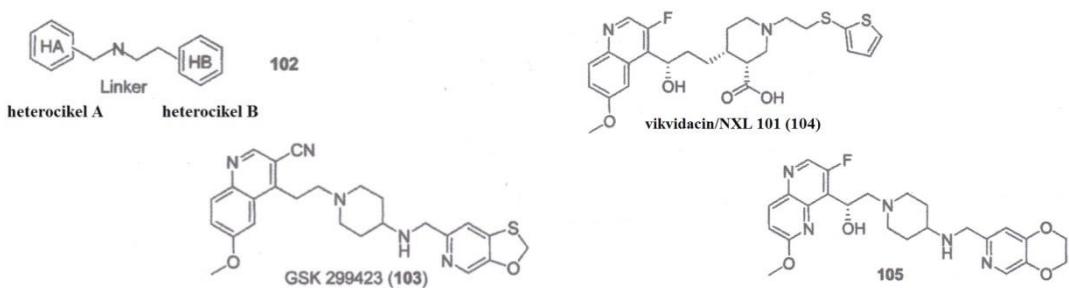
Acetonski adukt 98 (slika 10) precej izstopa zaradi svojih protibakterijskih lastnosti. Spojina 99 (slika 10), ki je predstavnik serije N-benzil-3-sulfonamidopirolidinov, inhibira DNA girazo v *E. coli* in ne izkazuje navzkrižne rezistence s fluorokinoloni. Pirazolni derivat, spojina 100, je prav tako inhibitor DNA giraze. Bolj učinkovit N-arylni analog je spojina 101. Ta spojina deluje tudi na humano topoizomerazo II, ne deluje pa na topoizomerazo tipa I.



Slika 10: Strukturne formule spojin od 98-101 (17)

1. 6. 3 Inhibitorji, ki se vežejo na katalitsko jedro topoizomeraz tipa IIA

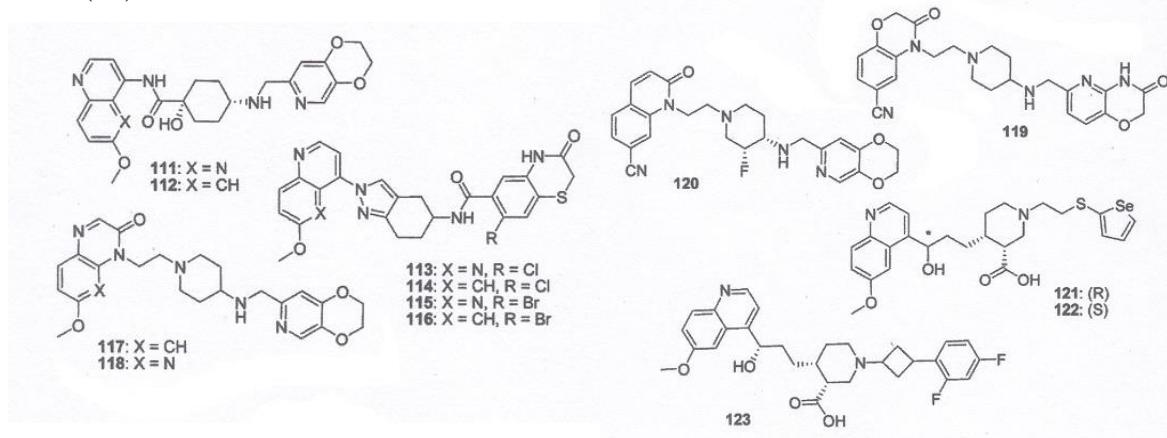
Leta 1999 je bil odkrit nov tip inhibitorjev, ki hkrati inhibirajo DNA girazo in topoizomeraze IV. Ti inhibitorji so izkazovali protibakterijsko delovanje proti sevom, odpornim na fluorokinolone. Kot je prikazano na sliki 11, je »splošna« struktura (102) tega razreda inhibitorjev sestavljena iz dveh heterociklov, ki so povezani z osrednjim delom, alifatskim »linkerjem«, ki običajno vsebuje bazični dušik, pogosto je ta linker aminopiperidin. Dve najbolj znani spojini te družine sta trenutno spojina 103 in 104. Spojina 104 je bila v klinični študiji prve faze, vendar so morali študijo kljub ugodnim podatkom predkliničnih raziskav prekiniti zaradi podaljšanja QTc intervala. Tudi spojina 105 (slika 11), ki je hidroksi analog spojine 103, je izkazovala inhibicijo hERG kanalčka. Res pa je, da ima ta spojina (105) (slika 11) obetavne farmakokinetične lastnosti in je učinkovita *in vivo* (17).



Slika 11: Strukturne formule spojin od 102 do 105 (17)

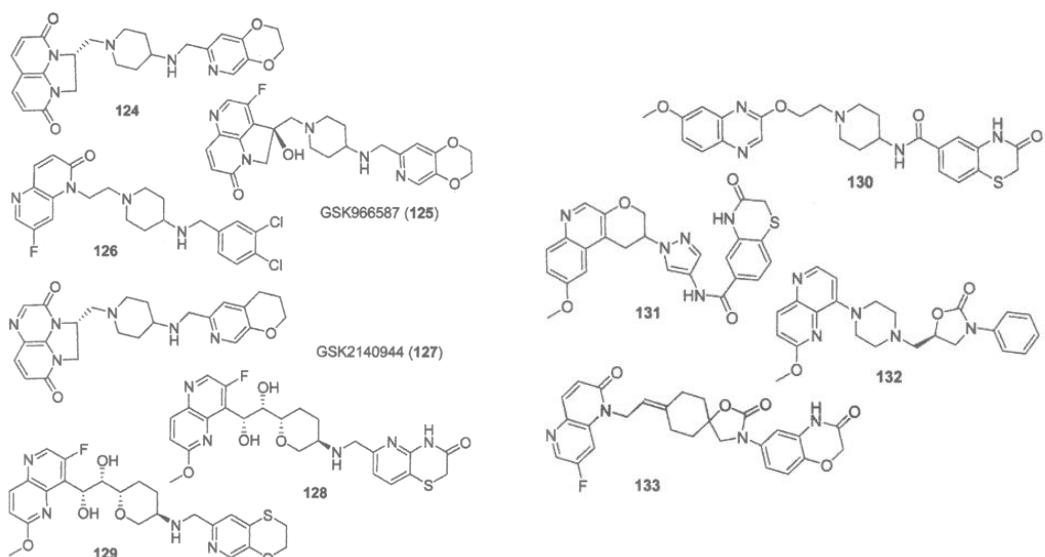
Spojina 111 (slika 12) ima dober protibakterijski profil, vendar pa močno inhibira hERG kanalčke v srcu. Po drugi strani je deazo analog 112 dosti slabša protibakterijska učinkovina, vendar $10 \times$ manj inhibira hERG kanalčke. Bazični aminopiperidin je možen vzrok za inhibicijo hERG kanalčkov, zato je druga raziskovalna skupina kot »linker« uporabila tetrahidro-2H-indazol, ki ga vsebujejo spojine od 113 do 116 (slika 12). Te spojine so izkazovale močne protibakterijske učinke tako proti navadnim kot tudi proti na več zdravil odpornim Gram + bakterijam in nekaterim Gram - bakterijam. Zanimivo je, da očitno bazični dušik ni nujen, saj če primerjamo spojine med seboj, so amidi v tej seriji bolj učinkoviti proti DNA girazi kot pa aminski analogi. Ravno nasproten učinek se je včasih pokazal pri inhibiciji topoizomeraze IV, torej so amini bili bolj učinkoviti proti topoizomerazi IV, kot pa pripadajoči amidi. V primerjavi z nesubstituiranimi amidi je uvedba lipofilnega klorovega ali bromovega atoma na benzotiazinonski obroč izboljšala protibakterijski učinek amidov 113 do 116. Poleg tega je bil viden rahel padec protibakterijskega učinka pri deazo analogih 114 in 116 v primerjavi z analogoma 113 in 115, ki vsebujeta dušik. Nikjer ni omenjeno, da bi ti analogi zavirali hERG kanalčke. Razen tetrahidro-2H-indazola so bili kot zamenjava aminopiperidinskega »linkerja«, uporabljeni tudi piridin, tetrahidronaftalen, dihidrooksazol-2-on, triazol, trans-dekahidroizokinolin in cikloheksanski obročni sistemi, pa tudi ogromno sorodnih aminiranih cikloalkilnih sistemov, ki so opisani v približno 50 patentih. Odkrili so, da je ciano derivat 119 iz serije aminopiperidinov, ki vsebuje benzoksazinon na mestu obroča A, optimalen za doseganje ravnovesja med hERG inhibicijo in protibakterijskim delovanjem. Dodatne kemijske preiskave so vodile do optično aktivnega fluoro derivata 120, ki ima ohranljeno ciano skupino na A obroču. Zaradi uvedbe elektron privlačnega fluora na piperidinski obroč v spojini 120 se je močno zmanjšal učinek na hERG, hkrati pa so se ohranile dobre protibakterijske lastnosti *in vivo*, kakor tudi obetavna farmakokinetika in izboljšan QT profil. Wiles in sodelavci so ponovno preučili strukturo spojine 104 (slika 11)

in pripravil selenove analoge, kot sta R-diastereoizomer 121 (slika 12) oziroma ustrezen S derivat 122 (slika 12). Spojina 122 je izkazovala zmanjšan učinek na hERG v primerjavi s spojino 121. Eno izmed novejših poročil opisuje serijo ciklobutil vsebujočih analogov, kot je spojina 123 (slika 12), za katere se je izkazalo, da le šibko inhibirajo topoizomerazo IV v *S. Aureusu*, v primerjavi z DNA girazo. Na žalost vsi analogi izkazujejo učinek na hERG kanal (17).



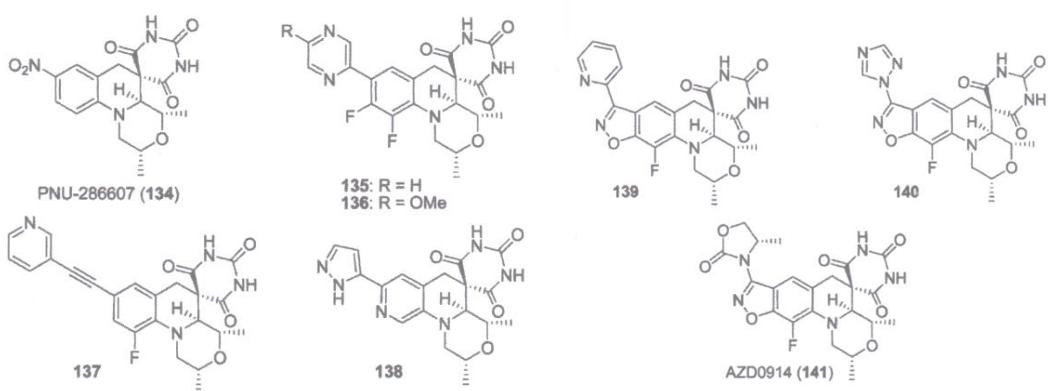
Slika 12: Strukturne formule spojin od 111 do 123 (17)

Predmet raziskav so bile tudi protimikrobakterijske lastnosti imidazo[1,2,3-ij][1,8]-naftiridinskega derivata 124 (slika 13). Pred kratkim so poročali o obsežnih podatkih predkliničnih študij za spojino 125 (slika 13). Opažena je bila *in vivo* učinkovitost v modelu miši z okužbo dihalnih poti s *S. aureus*, prav tako pa tudi zelo nizka raven učinka na hERG kanal. Vendar spojina ni nikoli prišla do kliničnih študij zaradi toksikološke študije, ki je na psih ugotovila lezije v jetrih. Tudi spojina 126 (slika 13) inhibira hERG kanal. Pred kratkim so našli analog 127 (slika 13), ki ima nizek učinek na hERG kanalčke, je pa trenutno predmet kliničnih raziskav prve faze. Kot zamenjavo za aminopiperidinski »linker« so uporabili aminotetrahidropiran in nastali so novi inhibitorji, ki hkrati inhibirajo DNA girazo in topoizomerazo IV. Taka dva inhibitorja sta spojina 128 in 129 (oba na sliki 13). Spojina 128 (slika 13) je širokospektralna protibakterijska učinkovina, vendar inhibira hERG kalijeve kanalčke. Medtem ko njen analog 129 (slika 13), ki se razlikuje samo v heterociklu B, izkazuje manjši učinek na hERG. Spojina 129 ima prav tako ugodne parametre predkliničnih farmakokinetičnih raziskav in izkazuje *in vivo* učinkovitost. Na sliki 13 so prikazani še nekateri analogi spojine 125 (17).



Slika 13: Strukturne formule spojin od 124 do 133 (17)

Ugotovili so tudi, da je spojina 134 (slika 14) po peroralni aplikaciji v modelu miši s sistemsko infekcijo učinkovita in da je inhibitor bakterijske DNA giraze. Zanimivo je, da ni bila opažena navzkrižna rezistenca s kinoloni, niti kakršenkoli učinek na humano topoizomerazo II. Novejše raziskave te serije inhibitorjev so privedle do protibakterijskih učinkovin 135 in 136 (slika 14), ki vsebujeta dodatni pirazinski obroč, oziroma v primeru 137 (slika 14) etinilpiridin, v primeru 138 (slika 14) pirazol, v primerih 139 do 141 (slika 14) pa izoksalolni obroč (17).



Slika 14: Strukturne formule spojin od 134 do 141 (17)

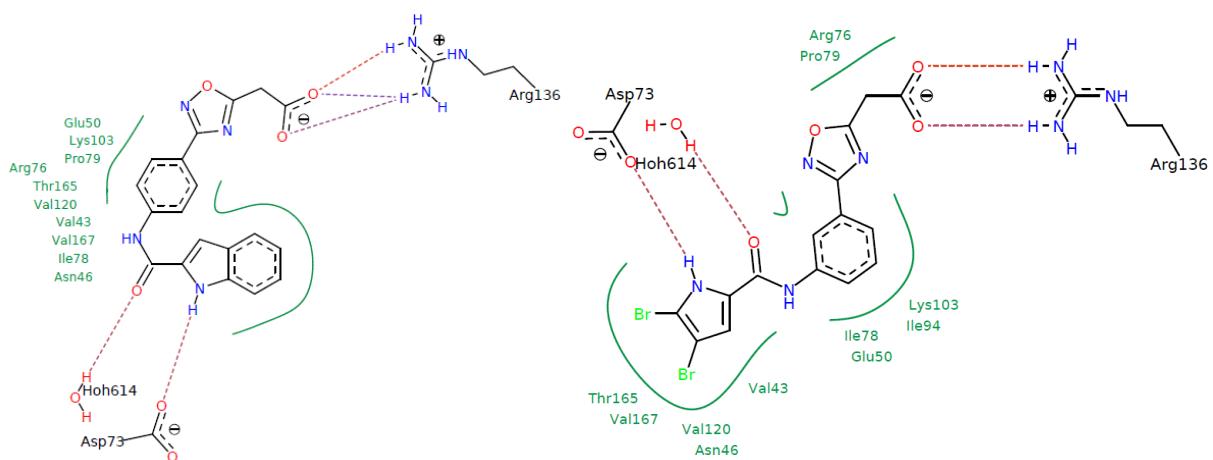
Čeprav je bilo sintetiziranih veliko različnih spojin, ki so *in vitro* izkazovale inhibitorni učinek na girazo, pa povezava med strukturo in delovanjem za posamezno mesto interakcije z girazo še ni popolnoma določena. Pogosto se pri novo sintetiziranih spojinah srečujemo z neželenimi učinki na srce in metabolično transformacijo v glukuronide, zaradi

katerih se spojine hitreje izločajo iz telesa in je posledično manjša učinkovitost protibakterijske učinkovine.

2. NAMEN DELA

V okviru magistrskega dela bomo sintetizirali potencialne zaviralce giraze DNA podenote B in sicer bomo izhajali iz spojine 3-aminobenzonitrila.

S pomočjo računalniškega programa FlexX (LeadIT 2.1.3 (BioSolveIT)) in na podlagi že poznane povezave med strukturo in delovanjem spojin z vezavo na B podenoto DNA giraze smo opravili sidranje derivatov 3- in 4-aminobenzonitrila v predpostavljeni vezavno mesto DNA giraze in na podlagi teh rezultatov smo se odločili za sintezo spojin, kjer smo kot osnovno izhodno spojino izbrali 3-aminobenzonitril.



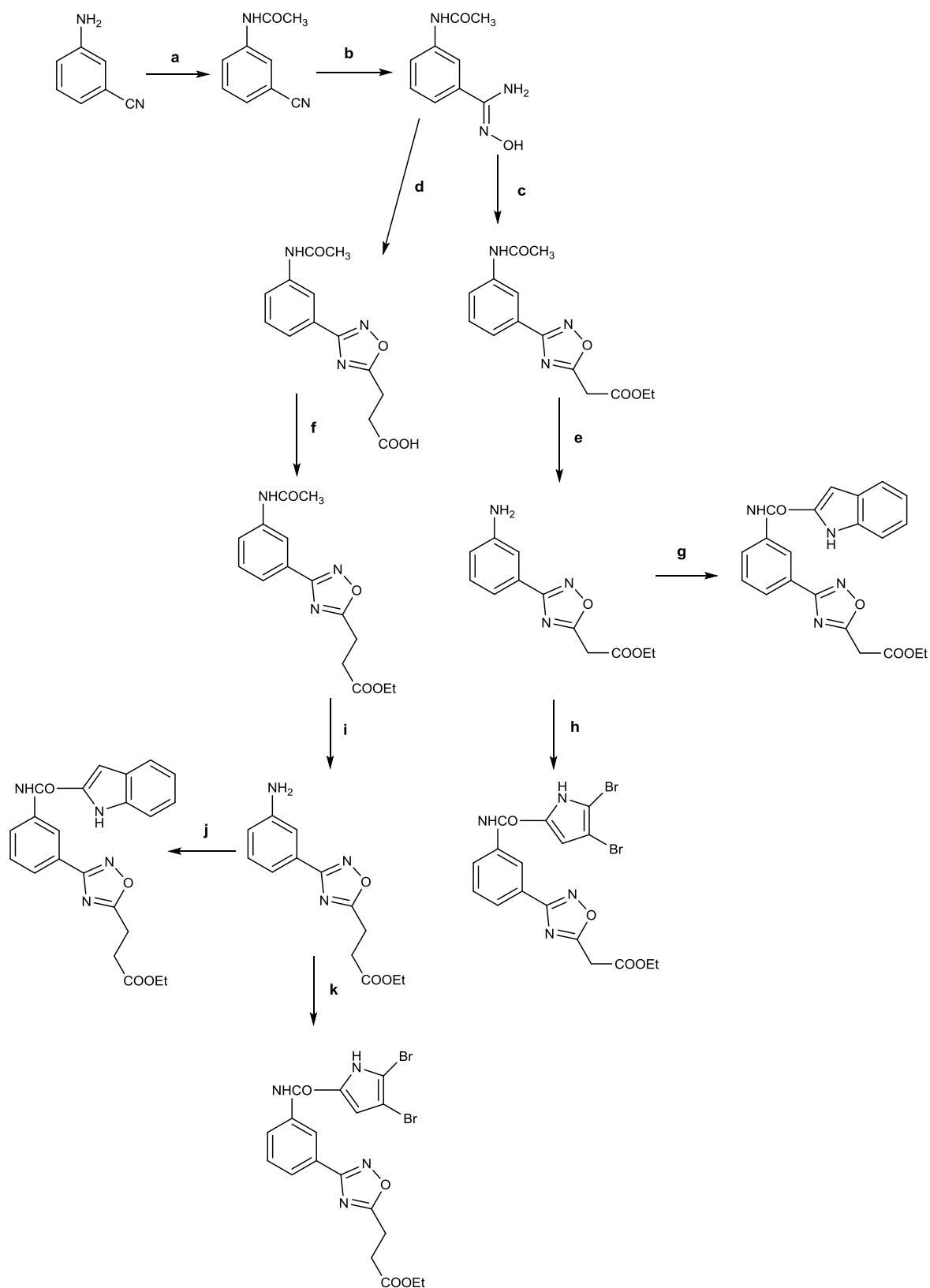
Slika 15: Leva stran: Sidranje spojine, ki jo bomo tvorili s pomočjo indol-2-karboksilne kisline, v vezavno mesto DNA giraze podenote B. Desna stran: Sidranje spojine, ki jo bomo tvorili s pomočjo 4,5-dibromopirol-2-karboksilne kisline, v vezavno mesto DNA giraze podenote B.

Najprej bomo iz 3-aminobenzonitrila s pomočjo acetilirnega sredstva, acetanhidrida pripravili *N*-(3-cianofenil)acetamid. Iz te spojine bomo tvorili amidoksim *N*-(3-(*N*'-hidroksikarbamimidoil)fenil)acetamid. V nadaljevanju bomo iz sintetiziranega amidoksima z ustreznima postopkoma pripravili 3,5-disubstituirana-1,2,4-oksadiazola, etil 2-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)acetat in 3-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) propanojsko kislino. Sledila bo odstranitev acetamidne zaščite na spojini etil 2-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)acetat, tako da jo bomo segrevali v 4 M HCl in THF ob temperaturi vrenja. Pri tem dobimo spojino etil 2-(3-(3-aminofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)acetat. Iz te spojine bomo tvorili amida etil 2-(3-(3-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)fenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)acetat in etil 2-(3-(3-(1*H*-indol-2-karboksamido)fenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) acetat. Na spojini 3-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) propanojski kislini pa bomo zaestrili kislinsko skupino v obliki

etilnega estra. Tako dobljeni spojini etil 3-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)propanoat bomo v nadaljnje odstranili acetamidno zaščito in pri tem dobili etil 3-(3-aminofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il)propanoat, iz katerega bomo pripravili amida etil 3-(3-(3-(1*H*-indol-2-karboksamido)fenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) propanoat in etil 3-(3-(3-(4,5-dibromo-1*H*-pirol-2-karboksamido)fenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) propanoat.

Vsem sintetiziranim spojinam bomo poskušali potrditi njihovo strukturo z NMR, IR in MS spektrometrijo, čistoto pa z elementno analizo in določitvijo intervala temperature tališča. Nekatere intermediate in končne spojine bomo ovrednotili s testiranjem na inhibicijo DNA giraze in s tem potrdili njihovo protibakterijsko aktivnost.

2. 1. Reakcijska shema



a: acetanhidrid / metanol b.v.

b: NH₂OH × HCl, TEA b.v. / etanol b.v.

c: TEA b.v., etil malonil klorid / diklorometan b.v., toluen b.v.

d: sukcinanhidrid, piridin, KF / DMF b.v.

e: 4 M HCl / THF

f: NaOH, EtBr

g: TCT, NMM, indol-2-karboksilna kislina / diklorometan b. v.

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

i: 4 M HCl / THF

j: TCT, NMM, indol-2-karboksilna kislina / diklorometan b. v.

k: TCT, NMM, 4,5-dibromopirol-2-karboksilna kislina / diklorometan b.v.

3. MATERIALI IN METODE

3. 1. Materiali

Reagenti

V laboratoriju smo pri eksperimentalnem delu uporabljali reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Fluka, Merck, Sigma Aldrich in Acros organics. En reagent (4,5-dibromo-pirol-2-karboksilna kislina) pa je bil sintetiziran na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani. Vsi reagenti so imeli najmanj 95 % čistoto.

Poimenovanje in risanje spojin

Za poimenovanje spojin in risanje strukturnih formul smo uporabljali program ChemBioDraw Ultra 13.0, proizvajalca Perkin Elmer.

3.2. Metode

3. 2. 1 Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC)

Tankoplastno kromatografijo smo uporabljali za spremljanje poteka reakcij, izolacij in kolonskih kromatografij. Za tankoplastno kromatografijo smo uporabljali plošče DC Fertigplatten Kieselgel 60 F₂₅₄, z 0,22 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu velikosti 20×20 cm, ki ga proizvaja podjetje Merck. Spojine na kromatografskih ploščah smo detektirali z UV svetilko z valovno dolžino 254 nm in orositvenima reagentoma ninhidrinom in bromkrezol zelenim. Z ninhidrinom smo detektirali amine, z bromkrezolzelenim pa kisline.

Kolonska kromatografija

Spojine smo očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabljali smo steklene kolone različnih velikosti. Kot stacionarno fazo smo uporabljali Silikagel 60 (Kieselgel 60), s premerom delcev 0,040-0,063 mm (flash silikagel), proizvajalca Merck. Kot mobilno fazo smo uporabljali različna topila.

Mobilne faze, ki smo jih uporabljali pri kolonski in tankoplastni kromatografiji:

MF 1: kloroform/metanol = 9/1

MF 2: kloroform/metanol = 20/1

MF 3: kloroform/metanol = 5/1

MF 4: acetonitril/voda = 3/1

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

MF 6: kloroform/metanol = 3/1

3. 2. 2. Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR)

NMR spektri so bili posneti na spektrometru Bruker UltraShieldTM Plus pri 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Uporabljali smo devterirani topili DMSO-d₆ in CDCl₃. Za računalniško obdelavo spektrov smo uporabili program MestRec 4.8.6. proizvajalca Mestrelab Research.

Infrardeča spektroskopija (FTIR)

IR spektri so bili posneti na spektrometru 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 spektrometru 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.

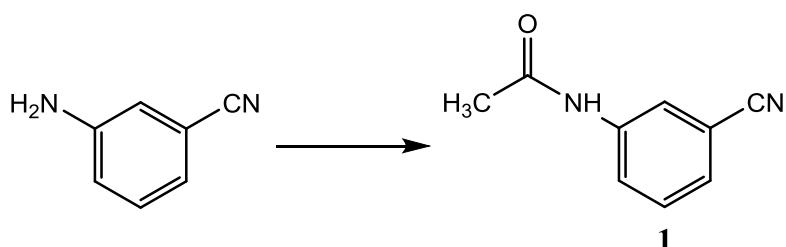
3.2.3 Določanje tališča

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

4. EKSPERIMENTALNI DEL

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

Reakcija



Postopek

V brezvodni metanol (30 mL) dodamo ob mešanju pri sobni temperaturi 3-aminobenzonitril (40 mmol, 4,73 g). Nato počasi dokapavamo (10 minut) acetanhidrid (42 mmol, 4 mL). Po 30 minutah od začetka dokapavanja acetanhidrida zmes uparimo in prelijemo z vodo (40 mL), ki smo ji dodali malo ledu. Izpadlo oborino odfiltriramo s presesavanjem ter posušimo.

Rezultati

Izgled: rjavkasti svetleči kristali

Izkoristek: 96,8 % (6,21 g)

Rf: 0,49 (MF1: kloroform/metanol = 9/1)

Tališče: 129 - 133 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3448, 3303, 3270, 3210, 3142, 3123, 3092, 2364, 2344, 2227, 1668, 1616, 1587, 1558, 1475, 1449, 1427, 1366, 1327, 1294, 1262, 1168, 1148, 1044, 1022, 998, 964, 896, 795, 755, 738, 681, 625, 531, 475

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 2,09 (s, 3H, CH₃CO); 7,48-7,54 (m, 2H, 2 H Ar); 7,77 (d, 1H, J=7,5 Hz, 1H Ar); 8,09 (s, 1H, 1H Ar); 10,29 (s, 1H, NH)

MS (ESI): 161,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 160,2

HR-MS: 161,0712 (izračunano: 161,0715)

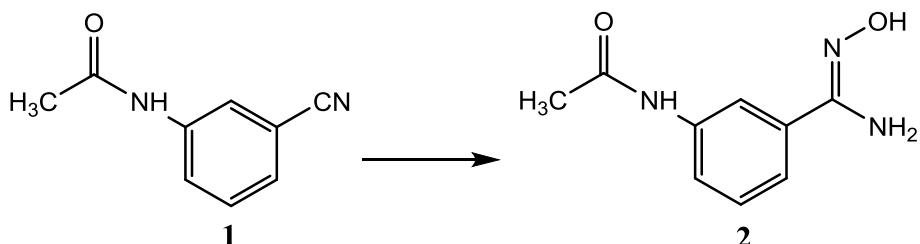
Elementna sestava: C₉H₈N₂O

Elementna analiza:

Izračunano	Ugotovljeno
%C 67,49	%C 67,38
%H 5,03	%H 4,86
%N 17,49	%N 17,63

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

Reakcija



Postopek

V brezvodni etanol (200 mL) dodamo ob mešanju hidroksilamonijev klorid (1,2 mmol, 2,08 g) in nato še trietilamin (1,2 mmol, 4,2 mL). Mešamo tako dolgo, dokler se vse ne raztopi (cca 14 minut). Nato dodamo spojino **1** (1mmol, 4 g) in segrevamo pri temperaturi vrenja (100°C). Ker reakcija poteka počasi dodamo po 23 in 47 urah še 0,42 g hidroksilamonijevega klorida in 840 µL trietilamina (20 % od začetne količine obeh). Po 72 urah končamo reakcijo in reakcijsko zmes uparimo. Nato dodamo zmes ledu in vode (150 mL) ter nastalo oborino odfiltriramo s presesavanjem in speremo z malo ledene vode ter posušimo.

Rezultati

Izgled: kristali nežno rozaste barve

Izkoristek: 65,2 % (3,15 g)

Rf: 0,23 (MF1: kloroform/metanol = 9/1)

Tališče: 80 – 83 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3489, 3386, 3266, 3110, 2363, 2344, 1668, 1649, 1618, 1588, 1566, 1428, 1388, 1322, 1296, 1270, 1098, 1084, 1021, 998, 960, 926, 890, 803, 754, 706, 674, 591, 541, 439

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 2,04 (s, 3H, CH₃CO); 5,74 (s, 2H, NH₂-); 7,25-7,33 (m, 2H, 2HAr); 7,59-7,64 (m, 1H, 1HAr; 7,89 (s, 1H, 1HAr); 9,63 (s, 1H, OH); 9,98 (s, 1H, NH)

MS (ESI): 194,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** = 193,2

HR-MS: 194,0930 (izračunano: 194,0930)

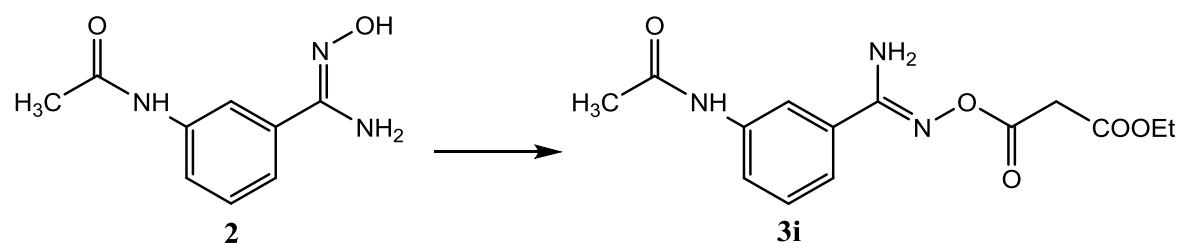
Elementna sestava: C₉H₁₁N₃O₂

Elementna analiza za C₉H₁₁N₃O₂.H₂O:

Izračunano	Ugotovljeno	Δ (%)	Preračunane vrednosti ob upoštevanju vode	Δ (%)
%C 55,95	%C 51,35	4,6	51,17	0,18
%H 5,74	%H 5,84	0,1	6,22	0,38
%N 21,75	%N 19,79	1,96	19,90	0,11

4.3. Sinteza etil 3-(((3-acetamidofenil)(amino)metilen)amino)oksi)-3-oksopropranoata (3i)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (35 mL) raztopimo spojino **2** (4 mmol, 1,5 g) in ohladimo na 0 °C ter nato dodamo trietilamin (8 mmol, 2,2 mL). Nato počasi (10 minut) dokapavamo etilmalonil klorid (8 mmol, 2 mL). Ob mešanju pustimo zmes, da se segreje na sobno temperaturo. Po končani reakciji (po 30 minutah od začetka dokapavanja etilmalonil klorida) topilo odstranimo z odparevanjem ter nato ostanek raztopimo v diklorometanu (30 mL) in organsko fazo speremo z vodo (3×20 mL) ter z nasičeno vodno raztopino NaCl (20 mL). Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄. Odfiltriramo Na₂SO₄. Skupaj z Na₂SO₄ se izobori spojina **3i**, zato suspendiramo filtrirni ostanek v vodi in filtriramo s presesavanjem. Dobljen zaostanek posušimo.

Rezultati

Izgled: kristali bele barve

Izkoristek: 37,3 % (0,89 g)

Rf: 0,40 (MF 1 = kloroform/metanol: 9/1)

Tališče: 135-137 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3480, 3349, 2980, 2939, 2364, 2345, 1760, 1728, 1670, 1654, 1621, 1592, 1560, 1474, 1449, 1406, 1370, 1350, 1282, 1188, 1140, 1031, 950, 882, 801, 767, 717, 638, 613, 512, 473

¹H NMR: (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 1,21 (t, 3H, CH₃CH₂; J=7 Hz); 2,06 (s, 3H, CH₃CO); 3,66 (s, 2H, -CH₂-); 4,14 (q, 2H, CH₂CH₃; J=7 Hz); 6,88 (rs, 2H, -NH₂); 7,33-7,40 (m, 2H, 2HAr); 7,77 (d, 1H, J= 7,8 Hz, 1HAr); 7,89 (s, 1H, 1HAr); 10,11 (s, 1H, NHCO)

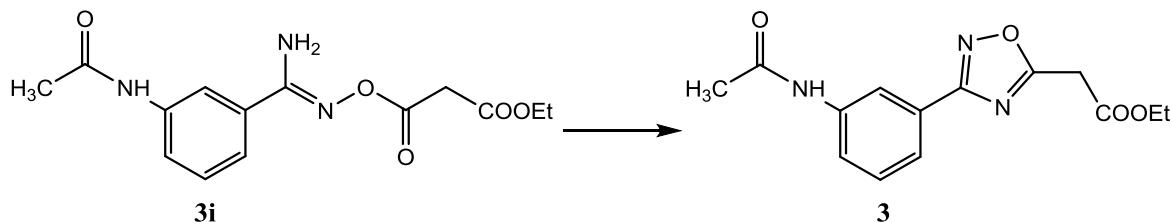
MS (ESI): 308,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunana):** 307,3

HR-MS: 308,1239 (izračunano: 308,1246)

Elementna sestava: C₁₄H₁₇N₃O₅

4.4. Sinteza etil 2-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) acetata (3)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem toluenu (15 mL) suspendiramo spojino **3i** (0,89 g) in mešamo ter segrevamo pri 80 °C. Po 22 urah k reakcijski zmesi dodamo še 20 mL brezvodnega toluena ter nadaljujemo segrevanje na 120 °C. Nato po 97 urah od začetka reakcije uparimo suspenzijo. Preostanek (rumeno olje) očistimo s kolonsko kromatografijo (MF 2).

Rezultati

Izgled: kristali rumenkaste barve

Izkoristek: 37,6 % (0,32 g)

Rf: 0,66 (MF 3 = kloroform/metanol : 5/1)

Tališče: 100-107 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3473, 3413, 3303, 3118, 2988, 1740, 1670, 1638, 1618, 1559, 1515, 1491, 1449, 1401, 1375, 1334, 1324, 1306, 1287, 1258, 1204, 1163, 1115, 1082, 1033, 1017, 962, 936, 905, 874, 811, 744, 704, 692, 614, 574, 540, 494

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ [ppm] = 1,30 (t, 3H, J=7,2 Hz, CH₂CH₃); 2,19 (s, 3H, CH₃CO); 4,04 (s, 2H, CH₂COO); 4,26 (q, 2H, J=7 Hz, CH₂CH₃); 7,38 (t, 1H, J=8 Hz, 1HAr); 7,76 (d, 1H, J=6 Hz, 1HAr); 7,82 (d, 1H, J=6 Hz, 1HAr); 8,07 (s, 1H, 1HAr); 8,20 (s, 1H, NH-CO)

MS (ESI): 290,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunana)** = 289,3

HR-MS: 290,1136 (izračunano: 290,1141)

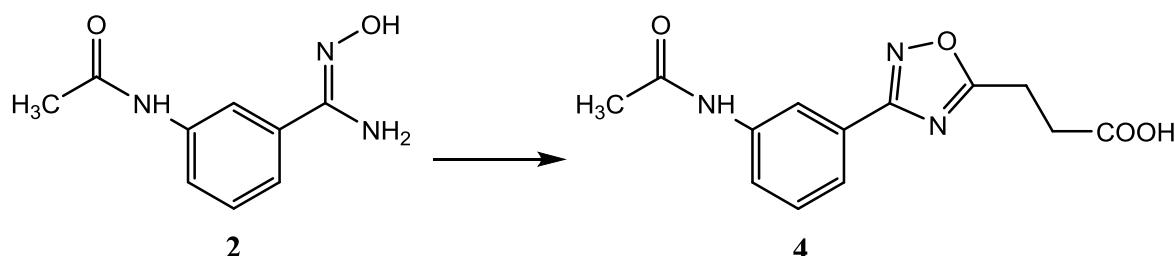
Elementna sestava: C₁₄H₁₅N₃O₄

Elementna analiza:

Izračunano	Ugotovljeno
%C 58,13	%C 58,24
%H 5,23	%H 4,90
%N 14,53	%N 14,28

4.5 Sinteza 3-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) propanojske kisline (4)

Reakcija



Postopek

V zmesi brezvodnega dimetilformamida (5 mL) in piridina (3 mL) raztopimo spojino **2** (4 mmol, 0,77 g) in sukcinanhidrid (4 mmol, 0,41 g). Reakcijsko zmes segrevamo pri 100 °C tri ure, nato dodamo kalijev fluorid (0,1 g) in zmes segrevamo pri isti temperaturi še eno uro in pol. Reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo, dodamo vodo (20 mL) in raztopino nakisamo s 4 M HCl do pH 3. Izpadlo oborino odfiltriramo s presesavanjem in posušimo.

Rezultati

Izgled: beli svetleči kristali

Izkoristek: 59,1 % (0,65 g)

Rf: 0,58 (MF 4 = acetonitril / voda 3:1)

Tališče: 198-201 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3329, 2930, 2688, 2607, 2543, 2370, 2346, 1710, 1654, 1648, 1615, 1560, 1517, 1491, 1466, 1437, 1404, 1364, 1326, 1310, 1287, 1264, 1209, 1114, 1085, 1022, 1003, 986, 964, 925, 904, 864, 816, 746, 712, 690, 654, 636, 612, 568, 543, 508, 486, 458, 418

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 2,04 (s, 3H, CH₃CO); 2,85 (t, 2H, J=6,8 Hz, CH₂CH₂-); 3,20 (t, 2H, J=6,8 Hz, CH₂-CH₂-); 7,48 (t, 1H, J=8 Hz, 1HAr); 5,66 (d, 1H, J= 8,2 Hz, 1HAr); 7,77 (d, 1H, J= 8 Hz, 1HAr); 8,29 (s, 1H, 1HAr); 10,20 (s, 1H, NH); 12,48 (s, 1H, COOH)

MS (ESI): 274,1 [M-H]⁻, **Mr (izračunana):** 275,3

HR-MS: 274,0822 (izračunano: 274,0828)

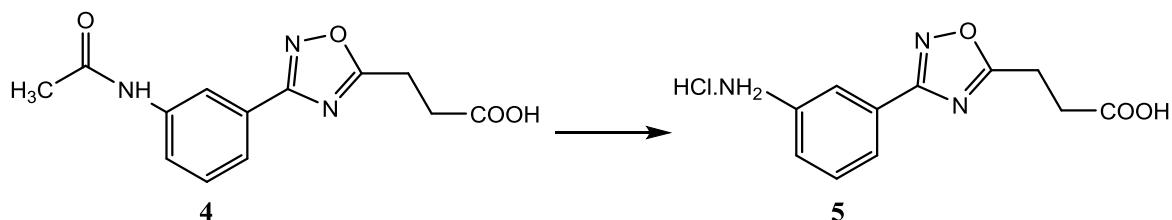
Elementna sestava: C₁₃H₁₃N₃O₄

Elementna analiza:

Izračunano	Ugotovljeno
%C 56,72	%C 56,56
%H 4,76	%H 4,32
%N 15,27	%N 15,41

4.6 Sinteza hidroklorida 3-(3-(3-aminofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) propanojske kisline (5)

Reakcija



Postopek

Spojino 4 (1,60 mmol, 0,44 g) suspendiramo v 4 M HCl (1,60 mmol, 2 mL) ter THF (10 mL) in segrevamo pri temperaturi vrenja (80 °C). Po 73 urah končamo reakcijo in

reakcijsko zmes uparimo. Ostanek po uparitvi suspendiramo v dietiletru ter odfiltriramo s presesavanjem. Filtrirni ostanek na nuči posušimo.

Rezultati

Izgled: kristali bež barve

Izkoristek: 92,8% (0,40 g)

Rf: 0,59 (MF 4: acetonitril/voda = 3/1)

Tališče: 170-175°C

IR (KBr, cm⁻¹): 3431, 2930, 2574, 2363, 2345, 1707, 1629, 1592, 1578, 1526, 1508, 1489, 1458, 1420, 1366, 1274, 1202, 1172, 1114, 1094, 920, 852, 835, 794, 741, 686, 638, 546, 487, 440

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 2,85 (t, 2H, J=6,8 Hz, CH₂); 3,21 (t, 2H, J=6,8 Hz, CH₂); 3,7-4,2 (rs, 3H, NH₃⁺); 7,3-7,4 (m, 1H, 1HAr); 7,52 (t, 1H, 1HAr); 7,70-7,80 (m, 2H, 2HAr)

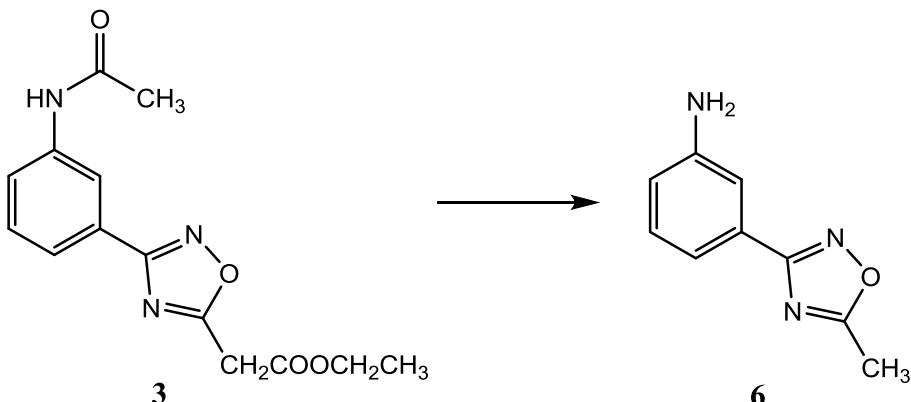
MS (ESI): 232,1 [M-HCl]⁻, **Mr (izračunana)** = 269,7

HR-MS: 232,0725 (izračunano: 232,0722)

Elementna sestava: C₁₁H₁₂ClN₃O₃

4.7 Sinteza 3-(5-metil-1,2,4-oksadiazol-3-il)anilina (6)

Reakcija



Postopek

Spojino **3** (0,15 g) suspendiramo v 4 M HCl (2,5 mmol, 630 µL) in THF (2 mL) ter segrevamo pri temperaturi vrenja (80 °C). Po pol ure od začetka reakcije dodamo še 2 mL THF. Nato po 26 urah odparimo THF ter dodamo vodo (2 mL), nato dodamo po kapljicah 10 M NaOH (cca. 1 mL). Suspenzijo odfiltriramo s presesavanjem in filtrirni ostanek posušimo.

Rezultati

Izgled: rumenkasti prašek

Izkoristek: 55,0 % (0,05 g)

Rf: 0,78 (MF 5: butanol/ ocetna kislina/ voda = 5/1/4)

Tališče: 85-90 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3405, 3333, 3217, 3024, 2365, 1685, 1630, 1614, 1596, 1576, 1525, 1489, 1467, 1436, 1386, 1356, 1316, 1277, 1260, 1172, 1106, 1042, 996, 906, 872, 802, 745, 714, 689, 660, 573, 537, 448

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 2,64 (s, 3H, CH₃); 5,30-5,50 (rs, 2H, NH₂); 6,35 (m; 1H, 1HAr); 7,10-7,2 (m, 2H, 2HAr); 7,22-7,24 (m, 1H, 1HAr)

MS (ESI): 176,1 ($M+H$)⁺, **Mr (izračunana)** = 175,2

HR-MS: 176,0821 (izračunano: 176,0824)

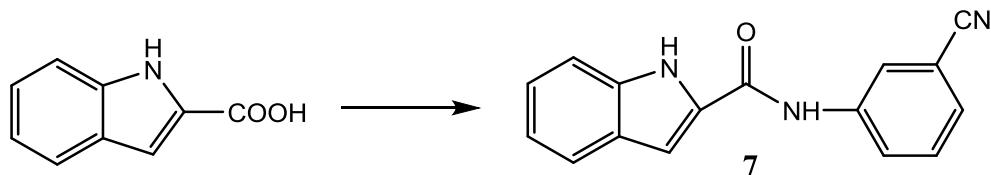
Elementna sestava: C₉H₉N₃O

Elementna analiza:

Izračunano	Ugotovljeno
%C 61,70	%C 61,65
%H 5,18	%H 4,91
%N 23,99	%N 23,53

4.8. Poskus sinteze *N*-(3-cianofenil)-1*H*-indol-2-karboksamida (7)

Reakcija



Postopek

Indol-2-karboksilno kislino (3 mmol, 0,48 g) raztopimo v brezvodnem diklorometanu (15 mL) ter dodamo dve kapljici brezvodnega DMF-a in ohladimo na 0 °C. Nato po kapljicah dodajamo oksalil klorid (3,3 mmol, 280 μL), ki smo ga raztopili v brezvodnem diklorometanu (10 mL). Po koncu dodajanja obrišemo bučko in zmes segrevamo na oljni kopeli 3 ure ob vrenju (40 °C). Ohladimo in dodamo trietilamin (3,9 mmol, 540 μL) ter nato še 3-aminobenzonitril (2,1 mmol, 0,25 g). Zmes mešamo pri sobni temperaturi, dokler reakcija ni končana. Po 21 urah od prvega dodatka trietilamina in 3-aminobenzonitrila dodamo v reakcijsko zmes še enkrat trietilamin (3,9 mmol, 540 μL) in reakcijo zaključimo po 44 urah. Zmes uparimo. Nato prelijemo ostanek po uparitvi z destilirano vodo (15 mL) in nastalo oborino odfiltriramo s presesavanjem ter jo posušimo.

Čiste spojine nismo uspeli izolirati.

Rezultati

Izgled: rjava-rumeni kristali

Izkoristek: 71,7 % (0,40 g)

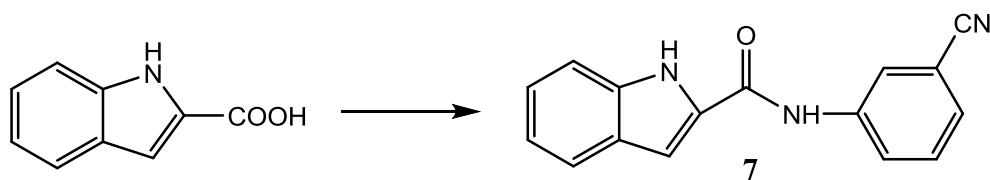
Rf: 0,55 (MF 1: kloroform/metanol = 9/1)

Tališče: nad 300 °C

Elementna sestava: C₁₆H₁₁N₃O

4.9 Sinteza *N*-(3-cianofenil)-1*H*-indol-2-karboksamida (7)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (45 mL) raztopimo 2,4,6-trikloro-1,3,5-triazin (TCT) (3 mmol, 0,55 g), ohladimo na ledeni kopeli (0-5 °C) in dodamo najprej N-metilmorfolin (9 mmol, 990 µL) in nato še indol-2-karboksilno kislino (9 mmol, 1,45 g). Mešamo na ledeni kopeli 2 uri. Nato po približno dveh urah od dodatka indol-2-karboksilne kisline dodamo v reakcijsko zmes 3-aminobenzonitril (9 mmol, 1,06 g). Bučko vzamemo iz ledeni kopeli in pustimo mešati reakcijsko zmes na sobni temperaturi. Reakcijo končamo po 70 urah od dodatka 3-aminobenzonitrla in uparimo reakcijsko zmes do suhega trdnega ostanka, ga prelijemo z destilirano vodo (20 mL) in nastalo oborino odfiltriramo s presesavanjem. Postopek še enkrat ponovimo in filtrat speremo z dietiletrom (15 mL). Ostanek posušimo v sušilniku.

Rezultati

Izgled: rumeni kristali

Izkoristek: 94,1 % (2,21 g)

Rf: 0,74 (MF 3: kloroform/metanol = 5/1)

Tališče: 255-259 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3904, 3854, 3840, 3822, 3808, 3752, 3378, 3317, 3082, 2363, 2345, 2228, 1793, 1773, 1735, 1718, 1684, 1660, 1622, 1588, 1544, 1508, 1476, 1458, 1433, 1421, 1376, 1343, 1329, 1314, 1288, 1239, 1207, 1175, 1142, 1118, 1001, 949, 930, 890, 794, 766, 744, 679, 611, 560, 596, 470, 430

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 7,09 (t, 1H, J=7,5 Hz, 1HAr); 7,24 (t, 1H, J=7,5 Hz, 1HAr); 7,43-7,50 (m, 2H, 2HAr); 7,54-7,61 (m, 2H, 2HAr); 7,71 (d, 1H, J=8 Hz, 1HAr); 8,09 (d, 1H, J=8 Hz, 1HAr); 10,53 (s, 1H, NH-indol); 11,84 (s, 1H, NH-amid)

MS (ESI): 260,1 [M-H]⁻, **Mr (izračunana):** 261,3

HR-MS: 260,0821(izračunano: 260,0824)

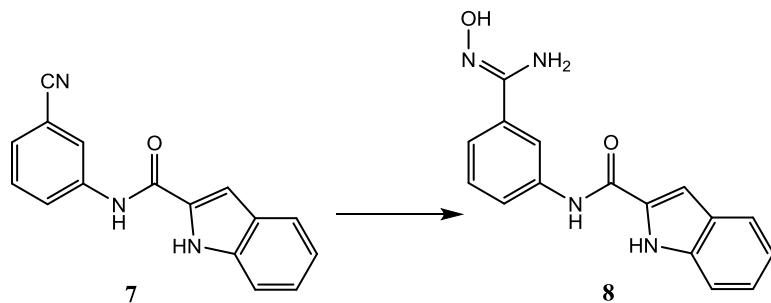
Elementna sestava: C₁₆H₁₁N₃O

Elementna analiza za C₁₆H₁₁N₃O.0,25 H₂O

Izračunano	Ugotovljeno	Δ (%)	Preračunane vrednosti ob upoštevanju vode	Δ (%)
%C 73,55	%C 72,67	0,88	72,29	0,38
%H 4,24	%H 4,07	0,17	4,37	0,3
%N 16,08	%N 15,81	0,27	15,81	0

4.10 Sinteza *N*-(3-(*N'*-hidroksikarbamimidooil)fenil)-1*H*-indol-2-karboksamida (8)

Reakcija



Postopek

V brezvodni etanol (60 mL) dodamo hidroksilamonijev klorid (6,98 mmol, 0,49 g) in nato še trietilamin (6,98 mmol, 975 µL). Zmes mešamo 10 minut. Nato dodamo spojino **9** (5,82 mmol, 1,52 g) in segrevamo pri temperaturi vrenja (90 °C). Po približno 46 urah od začetka segrevanja dodamo v reakcijsko zmes še 0,10 g hidroksilamonijevega klorida in 195 µL trietilamina. Dodatek istih reagentov ponovimo še po 91 urah (0,15 g hidroksilamonijevega klorida in 295 µL trietilamina). Po 116 urah segrevanja uparimo reakcijsko zmes. Ostanek nato prelijemo z zmesjo ledu in vode (80 mL). Nastalo oborino odfiltriramo s presesavanjem, speremo z malo ledene vode in posušimo.

Rezultati

Izgled: svetlo rjavi kristali

Izkoristek: 92,5 % (1,58 g)

Rf: 0,39 (MF 3: kloroform/metanol = 5/1)

Tališče: 210-214 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3905, 3854, 3808, 3276, 1774, 1648, 1587, 1546, 1508, 1490, 1444, 1376, 1342, 1314, 1242, 1199, 1147, 1119, 1001, 935, 895, 794, 747, 702, 621, 583, 499, 472, 433

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 5,80 (s, 2H, NH₂); 7,08 (t, 1H, J=7,8 Hz, 1HAr); 7,23 (t, 1H, J=7,8 Hz, 1HAr); 7,40 (rs, 2H, 2HAr); 7,47 (rs, 2H, 2HAr); 7,69 (d, 1H, J= 5,4 Hz, 1HAr); 7,87 (rs, 1H, 1HAr); 8,09 (s, 1H, 1HAr); 9,66 (s, 1H, OH); 10,29 (s, 1H, NH); 11,74 (s, 1H, NH)

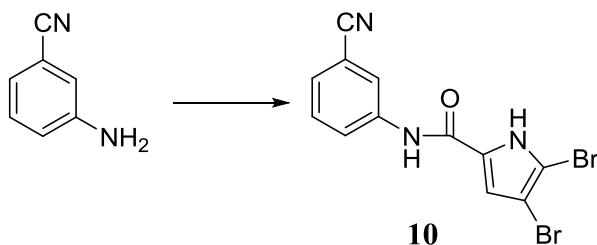
MS (ESI): 295,1 (M+H)⁺, **Mr (izračunana) = 294,3**

HR-MS: 295,1192 (izračunano: 295,1195)

Elementna sestava: C₁₆H₁₄N₄O₂

4.11. Sinteza 4,5-dibromo-N-(3-cianofenil)-1*H*-pirol-2-karboksamida (10)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (30 mL) raztopimo 2,4,6-trikloro-1,3,5-triazin (TCT) (2 mmol, 0,37 g). Ohladimo na ledeni kopeli (0-5 °C) in dodamo N-metilmorfolin (6 mmol, 660 μL) ter nato dodamo še 4,5-dibromopirol-2-karboksilno kislino (6 mmol, 1,61 g). Po treh urah mešanja na ledeni kopeli dodamo v reakcijsko zmes 3-aminobenzonitril (6 mmol, 0,71 g). Nato po približno petih minutah od dodatka 3-aminobenzonitrila vzamemo reakcijsko zmes iz ledene kopeli in jo pustimo mešati na sobni temperaturi. Po 68 urah od dodatka 3-aminobenzonitrila dodamo v reakcijsko zmes še 30 % prvotne količine N-metilmorfolina (200 μL). Mešamo še dve uri in reakcijsko zmes uparimo. Ostanek prelijemo z destilirano vodo (20 mL) in dodamo malo ledu. Vodo oddekatiramo in zaostanek prelijemo z dietiletrom, odfiltriramo s presesavanjem. Zaostanek posušimo.

Rezultati

Izgled: sivi kristali

Izkoristek: 39,2 % (0,87 g)

Rf: 0,71 (MF 3: kloroform/metanol = 5/1)

Tališče: nad 300 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3904, 3854, 3840, 3807, 3752, 3390, 3168, 2957, 2659, 2364, 2345, 2222, 1665, 1589, 1558, 1538, 1478, 1458, 1433, 1398, 1331, 1289, 1256, 1232, 1202, 1178, 986, 972, 947, 890, 850, 809, 789, 760, 746, 678, 615, 570, 547, 470, 439

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 7,26 (s, 1H, 1HAr); 7,50-7,60 (m, 2H, 2HAr); 9,76 (d, 1H, J=5,5 Hz, 1HAr); 8,20 (s, 1H, 1HAr); 10,17 (s, 1H, NH- pirol); 13,04 (s, 1H, NH- amid)

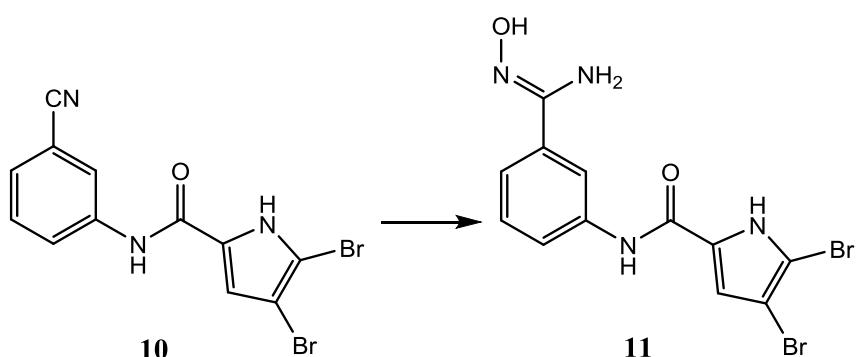
MS (ESI): 367,9 [M-H]⁻, **Mr (izračunana):** 369

HR-MS: 367,8869 (izračunano: 367,8878)

Elementna sestava: C₁₂H₇Br₂N₃O

4.12 Sinteza 4,5-dibromo-N-(3-(N'-hidroksikarbamimidoil)fenil)-1*H*-pirol-2-karboksamida (11)

Reakcija



Postopek

V brezvodni etanol (20 mL) dodamo hidroksilamonijev klorid (2,49 mmol, 0,17 g) in nato še trietilamin (2,49 mmol, 350 µL). Mešamo, dokler se vse spojine ne raztopijo (10 minut). Nato dodamo spojino **10** (2,07 mmol, 0,77 g) in segrevamo pri temperaturi vrenja (90 °C).

Po 49 urah dodamo v reakcijsko zmes še 20 % hidroksilamonijevega klorida (0,04 g) in 20 % trietilamina (70 μ L). Po 72 urah od začetka segrevanja končamo reakcijo in uparimo reakcijsko zmes. Ostanek po uparitvi prelijemo z zmesjo ledu in vode (15 mL). Nastalo oborino odfiltriramo s presesavanjem ter speremo z malo ledene vode. Nato filtrirni ostanek prelijemo z destilirano vodo (10 mL) in zmes mešamo 20 minut. Filtriramo s presesavanjem in filtrirni ostanek posušimo.

Rezultati

Izgled: sivi kristali

Izkoristek: 84,4 % (0,70 g)

Rf: 0,36 (MF 3: kloroform/metanol = 5/1)

Tališče: 247-254 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3905, 3854, 3840, 3822, 3808, 3752, 3393, 3179, 2956, 2864, 2346, 2222, 1718, 1654, 1638, 1590, 1552, 1528, 1508, 1490, 1458, 1436, 1388, 1331, 1241, 1194, 1145, 974, 947, 891, 866, 790, 759, 680, 615, 470, 443

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 5,89 (rs, 2H, NH₂); 7,26 (s, 1H, 1HAr); 7,37 (m, 2H, 2HAr); 7,81 (m, 1H, 1HAr); 9,72 (s, 1H, 1HAr); 9,96 (s, 1H, OH); 12,90 (s, 1H, NH amid)

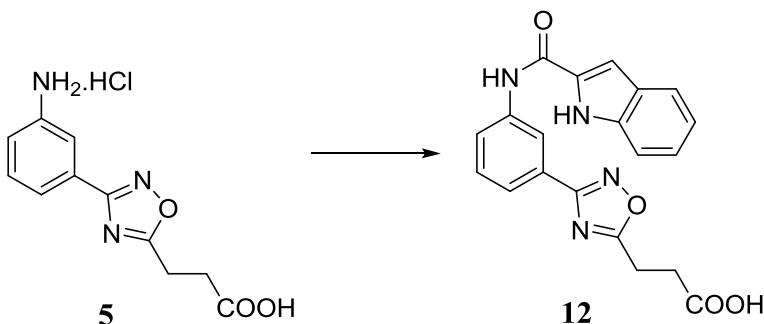
MS (ESI): 400,9 [M+H]⁺, **Mr (izračunana):** 402

HR-MS: 400,9245 (izračunano: 400,9249)

Elementna sestava: C₁₂H₁₀Br₂N₄O₂

4.13 Poskus sinteze 3-(3-(3-(1H-indol-2-karboksamido)fenil)-1,2,4-oksadiazol-5 il) propanojske kislina (12)

Reakcija



Postopek

V brezvodnem diklorometanu (15 mL) raztopimo 2,4,6-trikloro-1,3,5-triazin (0,43 mmol, 0,08 g). To ohladimo na ledeni kopeli (0–5 °C) in dodamo N-metilmorfolin (2,59 mmol, 285 µL) ter nato še indol-2-karboksilno kislino (1,30 mmol, 0,21 g). Vse to pustimo mešati. Na ledeni kopeli mešamo dve uri in nato dodamo v reakcijsko zmes spojino 5 (1,17 mmol, 0,31 g). Bučko vzamemo iz ledeni kopeli ter pustimo mešati reakcijsko zmes na sobni temperaturi. Po 70 urah od dodatka spojine 5 dodamo v reakcijsko zmes še 50 % začetne količine N-metilmorfolina (145 µL). Po 93 urah od dodatka spojine 5 uparimo reakcijsko zmes. Nato uparjeno reakcijsko zmes prelijemo z destilirano vodo (15 mL) in nakisamo s 4M HCl do pH 3. Nastalo oborino odfiltriramo s presesavanjem in jo posušimo ter očistimo s kolonsko kromatografijo (MF 6).

Rezultati

Izgled: svetlo rjavi kristali

Izkoristek: 67,59% (0,294 g)

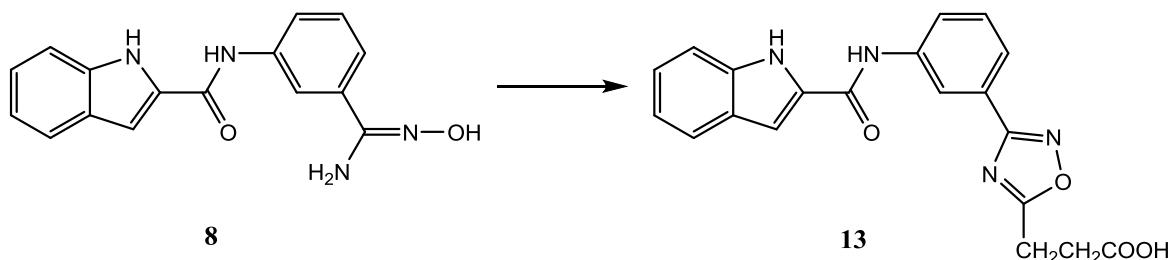
Rf: 0,20 (MF 3: kloroform/metanol = 5/1)

Tališče: 90-95 °C

Elementna sestava: C₂₀H₁₆N₄O₄

4.14. Sinteza 3-(3-(3-(1H-indol-2-karboksamido)fenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) propanojske kisline (13)

Reakcija



Postopek

V brezvodni DMF (10 mL) dodamo piridin (2,6 mL) in nazadnje še spojino **8** (3,40 mmol, 1,00 g) ter sukcinanhidrid (3,40 mmol, 0,34 g). Reakcijsko zmes segrevamo pri 100 °C štiri ure in nato dodamo katalizator KF (0,10 g). Zmes še dalje segrevamo eno uro pri 100 °C, nato pa znižamo temperaturo segrevanja na 80 °C. Pri tej temperaturi segrevamo še 17 ur in nato izklopimo segrevanje in mešamo pri sobni temperaturi še 3 dni. Nato segrevamo pri 80 °C še 2 dni in nato ohladimo ter v reakcijsko zmes dodamo destilirano vodo (19 mL). Raztopino nakisamo do pH 3 s 4 M HCl. Zmes ekstrahiramo z etilacetatom (3×15 mL). Po sušenju z natrijevim sulfatom organsko fazo uparimo in zaostanek očistimo s kolonsko kromatografijo (MF 3).

Rezultati

Izgled: belorumenkasti kristali

Izkoristek: 80,54 % (1,033 g)

Rf: 0,20 (MF 3: kloroform/metanol = 5/1)

Tališče: 210-214 °C

IR (KBr, cm⁻¹): 3854, 3426, 3219, 2366, 2345, 1734, 1713, 1685, 1654, 1601, 1582, 1550, 1522, 1509, 1458, 1418, 1376, 1340, 1317, 1276, 1240, 1211, 1196, 1176, 1148, 1086, 1028, 912, 886, 835, 798, 764, 745, 684, 632, 575, 533, 506, 461, 431

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ [ppm] = 2,80 (t, 2H, J=6,7 Hz, CH₂CH₂); 3,18 (t, 2H, J=6,7 Hz, CH₂CH₂); 7,09 (t, 1H, J=7,8 Hz, 1HAr); 7,23 (t, 1H, J=7,8 Hz, 1HAr); 7,49 (m,

2H, 2HAr); 7,56 (t, 1H, J= 7,8 Hz, 1HAr); 7,68-7,72 (m, 2H, 2HAr); 8,11 (d, 1H, J=6,1 Hz, 1HAr); 8,51 (s, 1H, 1HAr); 10,52 (s, 1H, NH-indol); 11,85 (s, 1H, NH)

MS (ESI): 375,1 [M-H]⁻, **Mr (izračunana):** 376,4

HR-MS: 375,1102 (izračunano: 375,1093)

Elementna sestava: C₂₀H₁₆N₄O₄

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

Iz 3-aminobenzonitrila smo sintetizirali spojine, ki bi se lahko vezale na podenoto B DNA giraze. Z računalniškim programom FlexX (LeadIT 2.1.3 (BioSolveIT)) smo sidrali spojine v vezavno mesto giraze in se na podlagi rezultatov odločili za sintezo spojin.

V nadaljevanju bomo opisali sintezne postopke, ki smo jih izvedli pri eksperimentalnem delu.

5.1. Uvedba acetamidne zaščite v 3-aminobenzonitril

Najprej smo iz 3-aminobenzonitrila sintetizirali amid s pomočjo derivata karboksilnih kislin, acetanhidrida. Amidno skupino smo tvorili zaradi zaščite aminske skupine, ki bi lahko v nadalnjih stopnjah sinteze končnih spojin reagirala in tvorila stranske produkte.

Zaščitne skupine uvajamo v spojine prav z namenom, da se izognemo stranskim produktom, ko pretvorimo funkcionalne skupine, ki naj bi ostale med stopenjsko sintezo spojin nespremenjene, v manj reaktivne (21).

Amini so odlični nukleofili in jih moramo zaščititi, kadar imamo v reakcijski zmesi elektrofile ali kisle reakcijske pogoje (21).

Za reakcije N-acetiliranja pa največkrat uporabljamo acetanhidrid ali pa acetil klorid kot aktivirano obliko ocetne kisline ter ustrezni amin. Izkoristki reakcij so boljši, če tovrstne reakcije izvajamo v brezvodnih pogojih (22).

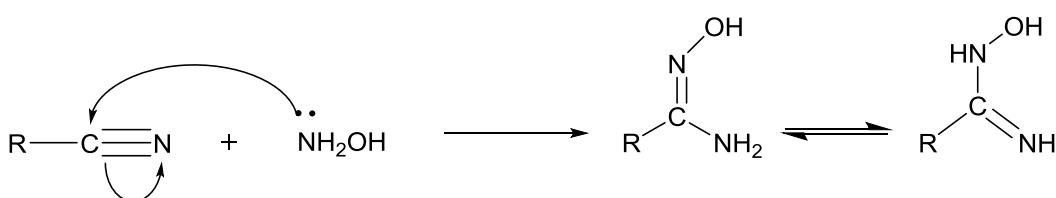
Acetiliranje 3-aminobenzonitrila z acetanhidridom je poteklo hitro (30 minut) z visokimi izkoristki (96,8 %).

5.2. Tvorba amidoksimov 2, 8 in 11

Amidoksimi **2**, **8** in **11** smo pripravili po splošnem postopku za tvorbo amidoksimov iz ustreznega nitrila in hidroksilamonijevega klorida ($\text{NH}_2\text{OH}\times\text{HCl}$) (23).

Amidoksimi lahko pripravimo na različne načine, ena najpogostejših metod za pripravo amidoksimov je priprava iz nitrilov in hidroksilamina (25).

Iz nitrilov smo z nukleofilno adicijo hidroksilamina na polarno heterogeno multiplo vez pripravili amidoksimi, za katere velja, da se lahko nahajajo v dveh tautomernih oblikah (slika 16) (26, 27).



Slika 16: Nastanek amidoksim (24)

V reakcijsko zmes smo dodali trietilamin, da pretvorimo hidroksilamonijev klorid v prosti hidroksilamin, ki reagira kot nukleofil. Kot reagent se uporablja hidroksilamonijev klorid zato, ker je v taki obliki bolj obstojen in s tem primernejši za shranjevanje (27). Namesto baze trietilamina bi lahko uporabili tudi natrijev karbonat, natrijev ali kalijev hidroksid ali natrijev etoksid. Vendar pa pri reakciji med natrijevim karbonatom in HCl nastane voda, ki ni zaželena, ker nitrilna skupina ob prisotnosti vode lahko hidrolizira in nastane karboksamid kot stranski produkt reakcije (27). Da zagotovimo čim bolj brezvodne pogoje, smo kot topilo uporabili brezvodni etanol.

Hidroksilamonijev klorid smo pred samo reakcijo razdrobili s pestilom v terilnici in ga sušili v sušilniku, saj je zelo higroskopen. Tudi s tem postopkom smo skušali zagotoviti čim bolj brezvodne pogoje (26).

V splošnem predpisu za sintezo amidoksimov s hidroksilamonijevim kloridom navajajo reakcijske čase od 3 do 24 ur. Kljub 20 % dodatku hidroksilamonijevega klorida in trietilamina po 23 in 47 urah segrevanja in mešanja reakcija amidoksim **2** tudi po 72 urah ni potekla do konca, saj smo na TLC ploščici še lahko detektirali izhodni acetiliran 3-aminobenzonitril. Ker smo ocenili, da je izhodna spojina prisotna v zelo majhni količini, smo se po tem času odločili za izolacijo. Na kromatogramu smo opazili še dodatno liso, ki je po vsej verjetnosti karboksamidni stranski produkt kljub temu, da smo se trudili vzpostaviti čim bolj brezvodne pogoje. Optimalno bi bilo izvajati to reakcijo v atmosferi argona. Izolacija je bila enostavna, saj je amidoksim **2** izpadel iz zmesi vode in ledu. Oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in tako izolirali čist produkt, izkoristek reakcije pa je bil kljub zgoraj omenjenim težavam primeren (65, 21 %).

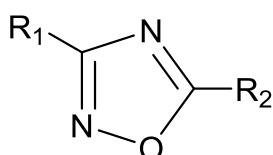
Podobno smo postopali tudi pri sintezi amidoksim **8**. Reakcija je potekla v 116 urah od začetka segrevanja. Kot je pokazala tankoplastna kromatografija, je reakcija potekla do konca, saj na kromatogramu v reakcijski zmesi ni bilo več lise izhodne spojine. Tudi pri sintezi spojine **8** smo po 46 in 90 urah od začetka segrevanja dodali v reakcijsko zmes še po 20 % začetne količine hidroksilamonijevega klorida in trietilamina. Izolacijo

amidoksima **8** smo izvedli na enak način kot pri spojini **2**, izkoristek pa je bil višji kot pri spojini **2** (92,46 %).

Več težav smo imeli pri sintezi amidoksima **11**, saj tudi v tem primeru reakcija ni potekla do konca niti po 72 urah, kljub ponovnemu dodatku hidroksilamonijevega klorida in trietilamina po 49 urah od začetka segrevanja. Prekinili smo segrevanje in skušali izolirati produkt po ustaljenem postopku. Izolirali smo čist amidoksim **11** z dokaj visokim izkoristkom (84,4 %), ki bi ga lahko morda izboljšali z izvajanjem reakcije v argonovi atmosferi in s podaljšanjem časa izvajanja reakcije.

5.3. Tvorba 3,5-disubstituiranih-1,2,4-oksadiazolov **3**, **4** in **13**

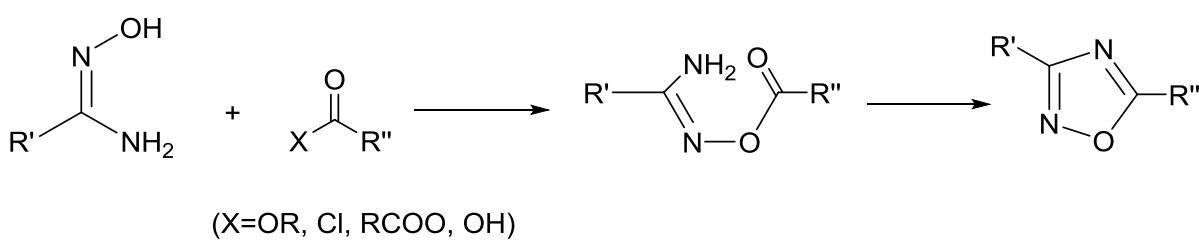
Oksadiazoli so petčlenski heteroaromatski obroči, ki vsebujejo dva ogljikova, dva dušikova in en kisikov atom. V starejši literaturi se pojavljajo oksadiazoli tudi pod imenom furodiazoli (28, 29). Odvisno od položaja dušikovih in kisikovih atomov v obroču so oksadiazoli razvrščeni v štiri različne skupine. Tako poznamo 1,2,3-oksadiazole, 1,2,5-oksadiazole, 1,3,4-oksadiazole in 1,2,4-oksadiazole (28). Med najbolj optimalnimi spojinami, ki so se po naši analizi derivatov 3-aminobenzonitrila umestile v vezavno mesto giraze, so bili tudi derivati 1,2,4-oksadiazolov, ki jih lahko sintetiziramo iz amidoksimov **2**, **8** in **11**. Za pripravo amidoksimov lahko seveda uporabimo več različnih metod (27, 28).



Slika 17: Struktura 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov(28)

Prvo sintezo 1,2,4-oksadiazolov sta leta 1884 izvedla Tiemann in Kruger (30). Poznavanje metod priprave 1,2,4-oksadiazolov je pomembna za farmacevtske kemike, saj se 1,2,4-oksadiazolna skupina pogosto uporablja kot bioizosterna zamenjava za amidno ali estersko skupino in se zato pojavlja tudi v nekaterih zdravilnih učinkovinah (31).

Najbolj pogosto se 1,2,4-oksadiazoli sintetizirajo iz amidoksimov in derivatov karboksilnih kislin v dveh stopnjah (32). Amidoksim reagira z aktiviranim kislinskim derivatom, kot so estri, kislinski kloridi, anhidridi ali ortoestri, pri tem dobimo intermedijat, O-aciliran amidoksim, ki z intramolekularno ciklodehidracijo daje 3,5-disubstituirane 1,2,4-oksadiazole (slika 18) (27, 28, 32, 33).

**Slika 18: Sinteza 3,5-disubstituiranih 1,2,4-oksadiazolov iz amidoksimov (28)**

Ker smo amidoksimske prekurzorje **2**, **8** in **11** za sintezo 3,5- disubstituiranih oksadiazolov **3**, **4** in **13** lahko pripravili z visokimi izkoristki, smo se odločili tudi mi za prej opisan postopek sinteze teh heterociklov.

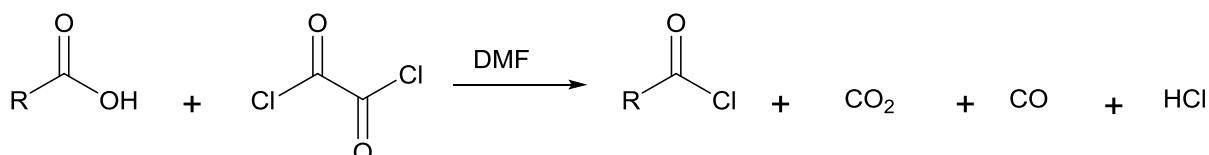
Pri sintezi spojine **3** smo izhajali iz amidoksima **2** in etilmalonil klorida, pri čemer smo amidoksim najprej raztopili v diklorometanu, reakcijsko zmes ohladili na 0 °C in nato začeli z dokapavanjem kislinskega klorida. Po vsem dodatku smo temperaturo dvignili na sobno in mešali še 30 minut. Na ta način smo dobili O-aciliran amidoksim (**3i**). Pri izolaciji smo imeli nekaj težav, saj se je spojina po ekstrakciji in sušenju organske faze s sušilnim sredstvom začela izobarjati. Tako smo skupaj s sušilnim sredstvom odfiltrirali iz organske faze tudi spojino **3i**. Izolirali smo jo tako, da smo zmesi dodali vodo, v kateri se je sušilno sredstvo raztopilo, spojina **3i** pa ne. Po filtraciji z odsesavanjem smo dobili čisto spojino **3i**, le izkoristek ni bil najbolj optimalen (37,3 %). Ciklizacijo spojine **3i** v želen 1,2,4-oksadiazol **3** smo izvedli v toluenu s 37,6 % izkoristkom.

Sintezo 1,2,4-oksadiazola **4** smo izvajali nekoliko drugače, saj smo izbrali drugo topilo (DMF), kot kislinski prekurzor pa smo izbrali sukcinanhidrid, saj smo žeeli na 5-mestu v oksadiazolu uvesti propanoilni substituent. Najprej je iz spojine **2** s sukcinanhidridom nastal O-aciliran intermediat, ki smo ga s pomočjo katalizatorja KF naprej ciklizirali do spojine **4**. Nadaljnja izolacija je sorazmerno enostavna, saj ob dodatku vode in nakisanju izпадa čista spojina **4** in je ni potrebno dodatno čistiti, izkoristek dvostopenjske reakcije pa je zadovoljiv (59,05 %).

Po istem postopku kot spojino **4** smo sintetizirali še spojino **13**. Aktivacijo v O-aciliran intermediat smo izvajali 4 ure in nato dodali KF ter segrevali 1 dan pri temperaturi vrenja, nato pa še mešali pri sobni temperaturi 3 dni. Prilagodili smo tudi izolacijo. Ker spojina po dodatku vode in nakisanju ni izpadla, smo vodno zmes ekstrahirali z etilacetatom, organsko fazo uparili in zaostanek čistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo dosegli dober izkoristek reakcije, ki je bil 80,54 %.

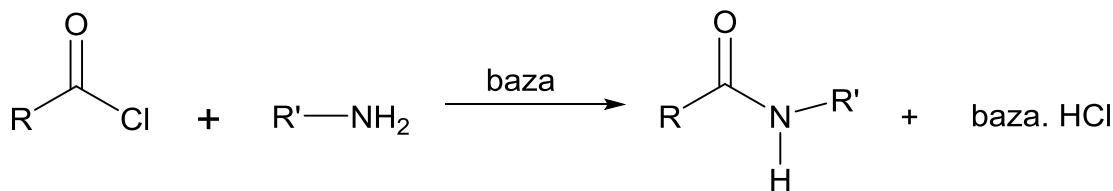
5.4. Poskus sinteze amida 7 preko kislinskega klorida

Amid **7** smo sintetizirali v dveh stopnjah. V prvi stopnji smo iz kisline (indol-2-karboksilne kisline) s pomočjo oksalil klorida sintetizirali kislinski klorid, pri čemer so nastali še stranski produkti ogljikov dioksid, ogljikov monoksid in HCl. Splošni prikaz sinteze je na spodnji sliki 19.



Slika 19: Sinteza kislinskih kloridov iz kislin s pomočjo oksalil klorida (34)

Te reakcije se pogosto pospeši z dodatkom kapljice dimetilformamida (DMF). Poleg oksalil klorida se običajno za sintezo kislinskih kloridov iz kislin uporabljajo tionil klorid (SOCl_2), fosforjev triklorid (PCl_3), fosforil klorid (POCl_3) in fosforjev pentaklorid (PCl_5) (14). V drugem koraku kislinski klorid reagira z aminom (v našem primeru 3-aminobenzonitrilom) in nastane amid **7**. Reakcija splošne sinteze amidov iz kislinskih kloridov je prikazana na spodnji sliki 20.



Slika 20: Sinteza amida iz kislinskega klorida in amina (34)

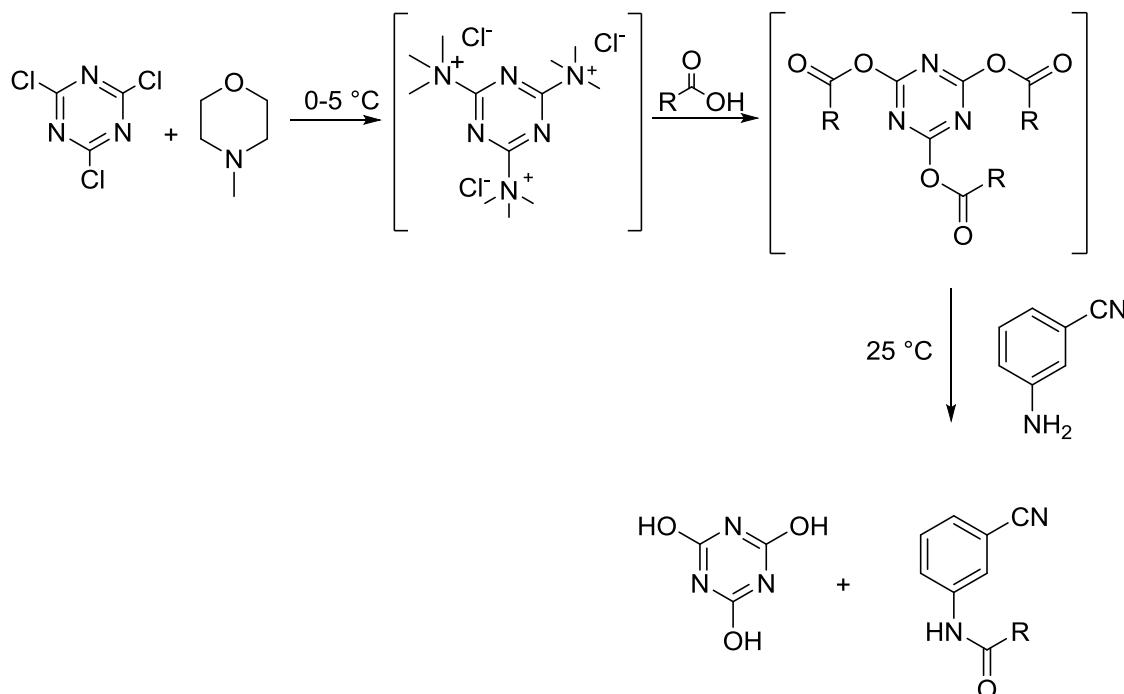
Zaradi nastale HCl moramo dodati v reakcijsko zmes še bazo (v našem primeru dodamo trietilamin), da le-ta zreagira s HCl in s tem preprečimo pretvorbo amina v nereaktivno sol (34).

Sinteza amida **7** nam je uspela, vendar nam ni uspelo očistiti te spojine, saj je bila zelo slabo topna v vseh topilih. Iz kromatograma je bilo razvidno, da je v reakcijski zmesi bila še vedno prisotna izhodna spojina (3-aminobenzonitril). Izkoristek reakcije je bil 71,73 %, vendar je bilo težko oceniti delež želene acilirane spojine.

5.5. Tvorba amidov 7, 10 in 12 z 2,4,6-trikloro-1,3,5-triazinom

Ker nam reakcija tvorbe amida **7** preko kislinskih kloridov ni uspela, smo za sintezo te spojine skušali uporabiti sklopitveni reagent 2,4,6-trikloro-1,3,5-triazin (cianuril klorid, TCT). To je zelo reaktivna organska spojina, ki se pridobiva s trimerizacijo cianogen klorida (35). Splošen mehanizem reakcije aktivacije s TCT je prikazan na sliki 19.

V prvi stopnji smo iz terciarnega amina (NMM) in TCT pripravili ustrezeno kvarterno amonijeve sol. Ta sol izпадa iz organskega topila kot beli kristali. Nato dodamo kislino in indikator, da nastaja aktiviran ester, je izginevanje oborine (kvarterne amonijeve spojine). Ker sta oba intermediata neobstojna pri višjih temperaturah, izvajamo reakcijo pri nizki temperaturi ($0\text{--}5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Po dodatku amina (v našem primeru 3-aminobenzonitril) vzamemo reakcijsko zmes iz ledene kopeli in pustimo mešati na sobni temperaturi (23).



Slika 21: Sinteza amidne vezi z 2,4,6-trikloro-1,3,5-triazinom (23)

Sinteza spojine **7** preko cianuril klorida (TCT) ni potekla čisto do konca, saj smo na TLC ploščici detektirali izhodno spojino (3-aminobenzonitril). Ker lisa na TLC ploščici ni bila zelo intenzivna, smo se po 70 urah od dodatka 3-aminobenzonitrila odločili za izolacijo. Reakcijsko zmes smo uparili in suh trdni ostanek prelili z vodo in filtrirali z odsesavanjem. Kot metoda izolacije je v splošnem postopku navedena ekstrakcija, vendar smo mi izbrali lažjo, prej omenjeno izolacijo, ki se je izkazala kot odlična, saj smo dobili zelo visok izkoristek reakcije (94,09 %).

Pri sintezi spojine **10** smo imeli nekaj več težav. Reakcija tudi po 68 urah ni potekla do konca, zato smo dodali še 30 % NMM. Dve uri po tem dodatku pa je bila reakcija končana, saj na TLC ploščici nismo opazili lise izhodnega 3-aminobenzonitrila, zato smo se odločili za izolacijo. Reakcijsko zmes smo uparili in trdni ostanek prelili z vodo. Zaostanek je bil mazav, zato smo vodni del oddekantirali od zaostanka in le tega prelili z dietiletrom, oddekantirali in spet dodali vodo. Ker je še vedno zaostajal mazav zaostanek želene spojine zaradi njene slabe topnosti, kot tudi nečistot, nismo mogli izolirati.

Tudi sintezo spojine **12** smo izvedli s cianuril kloridom podobno kot pri sintezi spojine **10**. Ocenili smo, da je reakcija po 90 urah potekla do konca. Izolacijo smo izvedli tako, da smo reakcijsko zmes uparili in prelili z vodo. Ker oborina ni nastala, smo zmes nakisali s 4 M HCl na pH 3. Po nakisanju smo dobili oborino, ki smo jo filtrirali z odsesavanjem in pri tem dobili 67, 59 % izkoristek. Spojine nam žal ni uspelo očistiti s kolonsko kromatografijo.

Vseeno pa lahko potrdimo, da je za tvorbo amidov na aminski skupini 3-aminobenzonitrila najustreznejša sinteza s sklopitvenim reagentom cianuril kloridom.

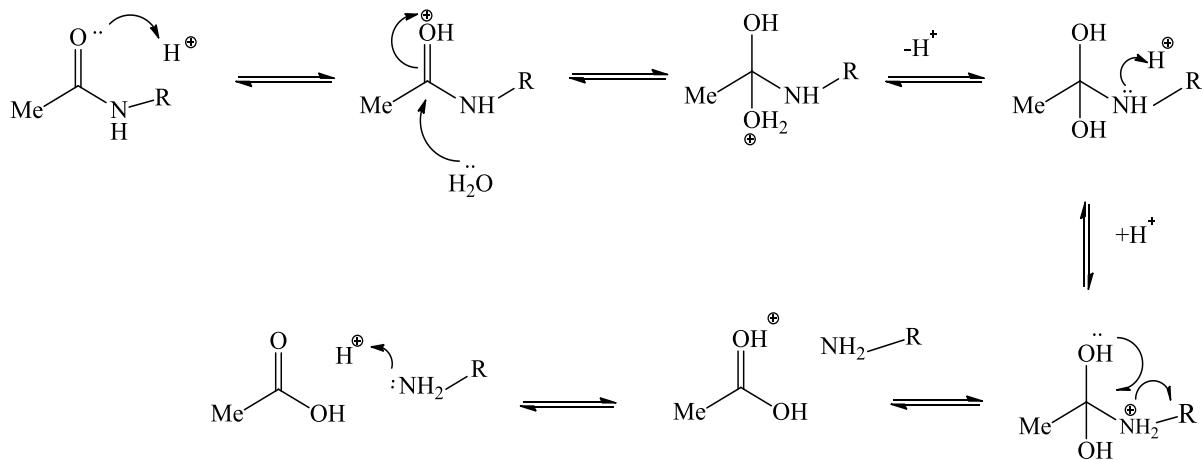
5.6. Hidroliza amidne vezi – sinteza spojin **5** in **6**

Amidi se lahko hidrolizirajo do karboksilnih kislin s kislinami ali z bazami kot katalizatorji. V našem primeru smo uporabili kislinsko katalizirano hidrolizo amidne vezi. Za hidrolizo primarnih, sekundarnih in terciarnih amidov je potrebno segrevanje v močno koncentrirani kislini (36). V našem primeru smo se odločili za 4 M HCl v THF. Bolj ostrih pogojev nismo izbrali, ker smo predvideli, da lahko hidrolizira tudi oksadiazolni obroč.

Pri hidrolizi amidov gre za preprosto nukleofilno substitucijo. Kot topila se lahko uporabijo dioksan, THF, voda ali etanol (26).

V nadaljevanju navajamo mehanizem kisle hidrolize amidov.

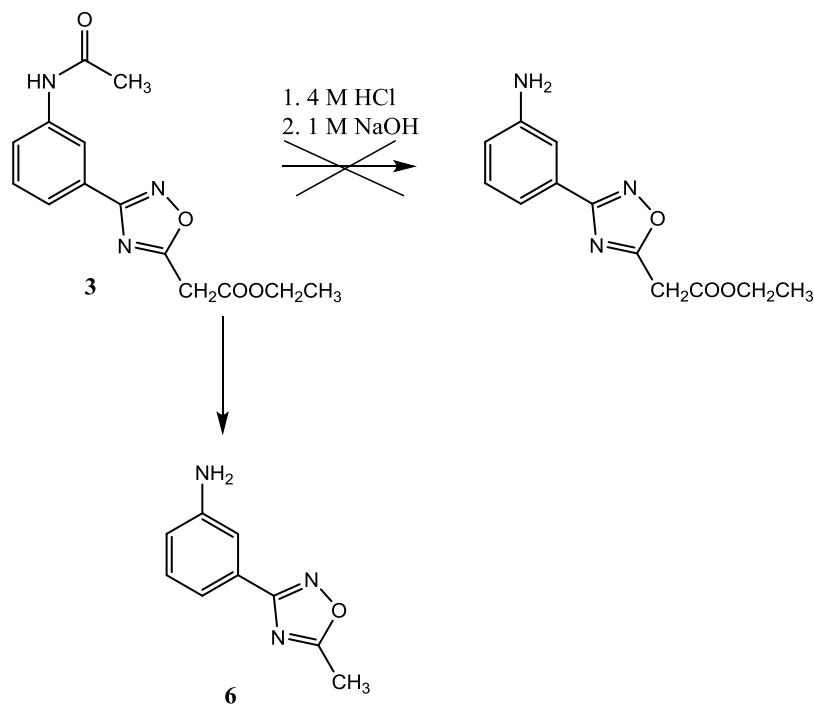
Najprej pride do protoniranja karbonilnega kisika, tvori se konjugirana kislina. Nato sledi napad nukleofila (vode) na protonirano karbonilno skupino v amidu in nastanek tetraedričnega protoniranega intermediata. Izguba protiona v tem tetraedričnem intermediatu omogoči protoniranje na dušiku. Dušikov atom ni več vezan na karbonilno skupino, zato postane dosti bolj bazičen kot kisikovi atomi. Izstopi amin, ki reagira z nastalim protonom in to omogoči regeneracijo karbonilne (karboksilne) skupine (36).



Slika 22: Kisla hidroliza sekundarnega amida (26)

Hidrolizo acetamidne vezi spojine **4** smo izvajali ob vrenju v THF z ekvivalentno količino 4 M HCl 72 ur. Čeprav smo s TLC kromatografijo po tem času še vedno zaznali rahlo liso izhodne spojine, smo reakcijsko zmes najprej uparili, nato pa suspendirali v dietiletru. Izhodna spojina je v etru topna, nastala spojina **5**, ki je sol pa je v etru netopna, zato smo jo zlahka izolirali čisto in z dobrim izkoristkom 92,79 %.

Žal pa hidroliza acetamidne skupine **3** ni potekla v želeno smer (slika 23).



Slika 23: Hidroliza spojine 3 v prosti amin, ki je potekla v nepredvideno smer (spojava 6)

Čeprav smo postopali tako kot pri sintezi spojine **5**, pa so visoka temperatura segrevanja in kisli pogoji povzročili hidrolizo esterske skupine vezane preko metilenske skupine na mestu 5 v oksadiazolnem obroču. Ko v reakcijski zmesi ni bilo več izhodne spojine, smo

reakcijo prekinili, odparili topilo, dodali vodo in naalkalili zmes do pH 10. Izpadla je oborina (spojina **6**). Strukturo spojine **6** smo potrdili z vsemi spektroskopskimi metodami. To je bil tudi vzrok, da smo želeli izvesti sintezo končnih spojin po drugi poti, kjer smo najprej acilirali 3-aminobenzonitril z ustrezno kislino v prisotnosti sklopitvenega reagenta TCT, šele nato pa ciano skupino pretvorili v amidoksim in tega ciklizirali v 3,5-disubstituirane 1,2,4- oksadiazole (**3**, **4** in **13**).

6. SKLEPI

V okviru magistrske naloge smo uspešno sintetizirali naslednje deriveate 3-aminobenzonitrila:

- etil 2-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) acetat (**3**),
- 3-(3-(3-acetamidofenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) propanojsko kislino (**4**) in
- 3-(3-(3-(1H-indol-2-karboksamido)fenil)-1,2,4-oksadiazol-5-il) propanojsko kislino (**13**).

Acetiliranje 3-aminobenzonitrila (spojina **1**) je potekla zelo hitro (30 minut). Tudi izolacija spojine je bila dobro izbrana, saj smo dobili čisto spojino, kar je potrdila tudi elementna analiza spojine **1**. Iz tega lahko sklepamo, da je acetiliranje 3-aminobenzonitrila z acetanhidridom ustrezna metoda za pripravo spojine **1**.

Že uveljavljen postopek za sintezo amidoksimov iz nitrilov in hidroksilamonijevega klorida smo za pripravo spojin **2**, **8** in **11** modificirali tako, da smo podaljšali reakcijski čas, na vsaj 4 dni. Nujno pa je reakcijo izvajati v brezvodnih pogojih.

Oksadiazole **3**, **4** in **13** smo uspešno sintetizirali po dveh različnih postopkih. Oksadiazol **3** smo pripravili s pomočjo etilmalonil klorida, medtem ko smo oksadiazola **4** in **13** pripravili z sukcinanhidridom. Sinteza spojine **3** je potekla v dveh stopnjah. Ugotovili smo, da reakcijski časi navedeni v obeh postopkih niso ustrezni, saj je bilo le te potrebno podaljšati.

Ker nam ni uspelo sintetizirati amida **7** po postopku tvorbe amida preko kislinskega klorida, smo izbrali za sintezo te spojine drug sklopitveni reagent. Kot uspešen se je izkazal postopek tvorbe amida s TCT. Ugotovili smo, da je ta sklopitveni reagent optimalen tudi za sintezo amidov **10** in **12**.

Odstranjevanje acetamidne zaščite skupine pri spojni **4** je bilo uspešno, medtem ko pri spojni **3** ni potekla reakcija v želeno smer. Potekla je dekarboksilacija esterske skupine na oksadiazolnem obroču.

Končne spojine **3**, **4** in **13** so bile testirane na inhibicijo DNA giraze. Spojina **3** ni izkazovala inhibicije, spojina **4** pa je izkazovala minimalno inhibicijo pri 100 μM koncentraciji. Rezultati za spojino **13** so preliminarni in kažejo od vseh spojin največjo inhibitorno aktivnost.

7. LITERATURA

1. Berkow R: Veliki zdravstveni priročnik za domačo uporabo, Mladinska knjiga, Ljubljana, 2005: 840.
2. Strle F, Sketelj J: Odpornost mikroorganizmov proti antibiotikom ogroža dosežke medicine. Zdravstveno varstvo, 2008; 47: 149.
3. Resnik M, Kerč J: Mikrobiološka kakovost farmacevtskih izdelkov. Farmacevtski vestnik, 2010; letnik 61, številka 1: 23.
4. Kaesbohrer A, Schroeter A, Tenhagen B A, Alt K, Guerra B, Appel B: Emerging antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* with public health relevance. Zoonoses and Public Health, 2012; 59: 158-165.
5. Cunningham M L, Kwan B P, Nelson K J, Bensen D C, Shaw K J: Distinguishing On-Target versus Off-Target Activity in Early Antibacterial Drug Discovery Using a Macromolecular Synthesis Assay. Journal of Biomolecular Screening, 2013; 18: 1018.
6. Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 3-15.
7. <http://www.britannica.com/EBchecked/media/129671/Structure-of-a-typical-bacterial-cell-showing-the-cell-wall> (dostopano 18.6.2014)
8. Gasparič A: Antibiotiki v farmaciji in medicini. Protimikrobne snovi, 2009: 11-32
9. Fidler N, Kus B: Kaj je dobro vedeti o zdravljenju z antibiotiki?, Lek, Ljubljana, 2009: 4-18.
10. Kikelj D: Učinkovine za sistemsko zdravljenje bakterijskih infekcij. Zdravila za sistemsko zdravljenje infekcij, Lekarniška zbornica Slovenije, Ljubljana, 2005: 39-46.
11. <http://dnarnanews.blogspot.com/2013/04/what-is-three-parts-of-nucleotide.html> (dostopano 19.6.2014)
12. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 244-282
13. <http://stara.biologija.org/pdf/3-mgen-skripta.pdf> (dostopano 26.10.2014)
14. http://en.citizendium.org/wiki/replication_of_a_circular_bacterial_chromosome (dostopano 19.6.2014)
15. Velez-Cruz R, Osheroff N: DNA Topoisomerases: Type II. Encyclopedia of Biological Chemistry, Volume 1, Elsevier Inc., 2004: 806-811.

16. Heide L: New aminocoumarin antibiotics as gyrase inhibitors. International Journal of Medical Microbiology, 2013; 1-6
17. Mayer C, Janin Y L: Non-quinolone Inhibitors of Bacterial Type IIA Topoisomerases: A Feat of Bioisosterism. Chemical Reviews, 114 (4), 2014: 2313-2342
18. Lafitte D, Lamour V, Tsvetkov P O, Makarov A A, Klich M, Deprez P, Moras D, Briand C, Gilli R: DNA Gyrase Interaction with Coumarin-Based Inhibitors: The Role of the Hydroxybenzoate Isopentenoyl Moiety and the 5'-Methyl Group of the Noviose. Biochemistry 2002; 41: 7217.
19. Ferroud D, Collard J, Klich M, Dupuis-Hamelin C, Mauvais P, Lassaigne P, Bonnefroy A, Musicki B: Synthesis and biological evaluation of coumariccarboxylic acids as inhibitors of gyrase B. L-rhamnose as an effective substitute for L-noviose. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 1999; 9: 2886.
20. Angehrn P, Buchmann S, Funk C, Goetschi E, Gmuender H, Hebeisen P, Kostrewa D, Link H, Luebbers T, Masciadri R, Nielsen J, Reindl P, Ricklin F, Schmitt-Hoffmann A, Theil F P: New Antibacterial Agents Derived from the DNA Gyrase Inhibitor Cyclothialidine. J. Med. Chem 2004; 47 (6): 1487.
21. http://studentski.net/gradiva/uljffa/fa1/farmacevtska-kemija.html?r=ulj_ffa_fa1_fk3_vaj_zascitne_skupine_01.pdf (dostopano 17.9.2014)
22. Sachitanand M Mali, Rupal D Bhaisare, Hosahudya N Gopi: Thioacids Mediated Selective and Mild N-Acylation of Amines. The Journal of Organic Chemistry 2013; 78: 5550-5555
23. K. Nadrah: Načrtovanje, sinteza in biološko vrednotenje delovanja intergrinskih receptorjev. Doktorska disertacija. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2008, 32-35; 87-88.
24. A. M. Yahya: Synthesis of Some Heterocyclic Compounds from Amidoxime and Imidate. Raf. Jour. Sci. 2008; 19, 59-68.
25. F. Eloy, R. Lenaers: The Chemistry of Amidoximes and Related Compounds. Chem. Rev. 1962; 62(2), 156-157.
26. L. Trdan: Sinteza 4-(Benziloksi) anilinskih derivatov klatrodina. Magistrsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2013, 48-52.

27. T. Korošec. Uporaba derivatov 2H-1,4-benzoksazin-3-(4H)-ona in 5-cianoindola pri sintezi antagonistov fibrinogenskega receptorja. Diplomsko delo. Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, 2002, 68-72.
28. Bora R O, Dar B, Pradhan V, Farooqui M: [1, 2, 4]-Oxadiazoles: Synthesis and Biological Applications. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry 2014; 14(4): 355-69.
29. Boström J, Hogner A, Llinas A, Wellner E, Plowright A T: Oxadiazoles in Medicinal Chemistry. Journal of Medicinal Chemistry 2012; 55: 1817-1830.
30. http://shodhganga.inflibnet.ac.in/bitstream/10603/8559/8/08_chapter-3.pdf
(dostopano 5.9.2014)
31. Jakopin Ž, Roškar R, Sollner Dolenc M: Synthesis of 3,5-disubstituted 1,2,4-oxadiazoles as peptidomimetic building blocks. Tetrahedron Letters 2007; 48: 1465-1468.
32. Augustine J K, Akabote V, Hegde S G, Alagarsamy P: PTSA-ZnCl₂: An Efficient Catalyst for the Synthesis of 1,2,4-Oxadiazoles from Amidoximes and Organic Nitriles. J. Org. Chem 2009; 74: 5640-5643.
33. <http://etd.lib.metu.edu.tr/upload/12612945/index.pdf> (dostopano 8.9.2014)
34. Montalbetti C A G N, Falque V: Amide bond formation and peptide coupling. Tetrahedron 2005; 61: 10827-10852.
35. Al-Warhi T I, Al-Hazimi H M A, El-Faham A: Recent development in peptide coupling reagents. Journal of Saudi Chemical Society 2012; 16: 97–116.
36. Dewick P M: Essentials of Organic Chemistry: For Students of Pharmacy, Medicinal Chemistry and Biological Chemistry, John Wiley & Sons Ltd, New Delhi, 2006: 259-260.