

Heterociklički hibridni spojevi, derivati antranilne kiseline i aminokinolina, kao potencijalni agensi u suzbijanju bakterijskih biofilmova

Džajić, Ivan

Master's thesis / Diplomski rad

2021

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Pharmacy and Biochemistry / Sveučilište u Zagrebu, Farmaceutsko-biokemijski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:163:405874>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom](#).

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-28**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Pharmacy and Biochemistry University of Zagreb](#)



Ivan Džajić

**Heterociklički hibridni spojevi, derivati
antranilne kiseline i aminokinolina, kao
potencijalni agensi u suzbijanju bakterijskih
biofilmova**

DIPLOMSKI RAD

Predan Sveučilištu u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskom fakultetu

Zagreb, 2021.

Ovaj diplomski rad je prijavljen na kolegiju Farmaceutska kemija 2 Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta i izrađen u Fidelta d.o.o. pod stručnim vodstvom doc. dr. sc. Ivane Perković, mag. pharm. i dr. sc. Tanje Poljak, mag. pharm.

Veliko hvala mentorici doc. dr. sc. Ivani Perković na svim stručnim savjetima, vodstvu, pomoći, a najviše na ukazanom povjerenju i prilici za izradu ovog rada.

Zahvaljujem komentorici dr. sc. Tanji Poljak na velikoj pomoći, strpljenju i odvojenom vremenu tijekom izrade eksperimentalnog dijela ovog rada.

Hvala svim zaposlenicima Fidelta d.o.o., a posebno Božici, Zorici, Ireni, Kristini, Filipu, Ivani, Eli i Marijani na najboljoj mogućoj radnoj atmosferi, svim savjetima i pomoći u izradi eksperimentalnog dijela ovog rada.

Hvala svim zaposlenicima FBF-a koji su učinili ovaj studij zanimljivim i inspirativnim te prepoznali moju veliku želju za znanjem. Posebno hvala doc. dr. sc. Ani Budimir i prof. dr. sc. Ani Mornar Turk na prenesenom znanju i pruženim prilikama za rad u znanosti tijekom ranijih godina studija te velika hvala asistentima Edvinu i Mariu sa Zavoda za analitiku i kontrolu lijekova na prijateljstvu i pomoći na fakultetu i izvan fakulteta.

Hvala prijateljima iz ZFS za sav smijeh i nezaboravne trenutke od prvog dana do završetka studija. Posebno hvala Zrinki, Luciji i Kecu bez kojih bi učenje i polaganje ispita bilo puno teže. Hvala i svim kolegama glazbenicima za prijateljstvo i potporu u životu van akademskih okvira.

Veliko hvala za potporu tijekom studija cijeloj mojoj obitelji, a posebno baki Ljubici koja je cijeli moj život vjerovala u mene. Ovaj rad bi joj puno značio.

Kratice

2-ABA-CoA	2'-aminobenzoilacetyl-CoA (engl. 2'-aminobenzoylacetyl-CoA)
4-CABA	2-amino-4-klorobenzojeva kiselina (engl. 2-amino-4-chlorobenzoic acid)
6-CABA	2-amino-6-klorobenzojeva kiselina (engl. 2-amino-6-chlorobenzoic acid)
6-FABA	2-amino-6-fluorobenzojeva kiselina (engl. 2-amino-6-fluorobenzoic acid)
AHL	<i>N</i> -acilhomoserinski lakton
AI	autoinduktor (engl. <i>autoinducer</i>)
ALS	amiotrofna lateralna skleroza
AMP	adenozin monofosfat (engl. <i>adenosine monophosphate</i>)
BHL	<i>N</i> -butiril-L-homoserin lakton
CDI	1,1'-karbonildiimidazol
CoA	koenzim A
DCM	diklormetan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetil sulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
DSC	diferencijalna pretražna kalorimetrija (engl. <i>differential scanning calorimetry</i>)
eDNA	izvanstanična DNA
EPS	izvanstanična polimerna tvar (engl. <i>extracellular polymeric substance</i>)
EtOH	etanol
GFP	zeleni fluorescentni protein (engl. <i>green fluorescent protein</i>)
HHQ	2-heptil-4-(1 <i>H</i>)kinolon
IQS	integrirani kinolonski signal (engl. <i>integrated quinolone signal</i>)
MeOH	metanol
MRSA	meticilin rezistentan <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	masena spektrometrija
NMR	nuklearna magnetska rezonancija
OdDHL	<i>N</i> -oksododekanoil-L-homoserinski lakton
PBP	protein koji veže penicilin (engl. <i>penicillin-binding protein</i>)
PQS	kinolonski signal <i>P. aeruginosa</i> -e (engl. <i>Pseudomonas quinolone signal</i>)

PSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Psl	lokus sinteze polisaharida (engl. <i>polysaccharide synthesis locus</i>)
PTLC	preparativni TLC
QS	međustanična komunikacija (engl. <i>quorum sensing</i>)
QSI	inhibitori međustanične komunikacije
s.t.	sobna temperatura
TLC	tankoslojna kromatografija (engl. <i>thin layer chromatography</i>)
TMS	tetrametilsilan
UV	ultraljubičasto
WHO	Svjetska zdravstvena organizacija (engl. <i>World Health Organization</i>)

Sadržaj

1. UVOD.....	1
1.1. Antimikrobna terapija i antibakterijski lijekovi.....	1
1.1.1. Neracionalna primjena antibakterijskih lijekova, antibiotska rezistencija.....	1
1.1.2. Mehanizmi rezistencije antibakterijskih lijekova.....	1
1.1.3. Prioritizacija odabira meta za razvoj novih lijekova u kontekstu industrije i javnog zdravstva	3
1.2. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> i virulencija.....	4
1.2.1. Primjeri čimbenika virulencije PSA opisanih u ranoj literaturi	4
1.2.2. Tvorba biofilma.....	5
1.2.3. <i>Quorum sensing</i> kao meta za otkriće novih lijekova	6
1.2.4. Uloga i biosinteza PQS	7
1.2.5. Potencijal inhibitora <i>quorum sensing</i> -a kao terapijski djelatnih tvari.....	8
1.3. Hibridni spojevi	9
1.4. Pregled dosadašnjih istraživanja.....	9
1.4.1. Inhibitori signalne mreže Pqs	9
1.4.2. Istraženi odnos strukture i aktivnosti derivata antranilne kiseline	10
1.4.3. Kinolinski derivati kao biološki aktivni spojevi u antimikrobnoj terapiji	10
1.4.4. Primjeri istraživanih hibridnih inhibitora QS	11
2. OBRAZLOŽENJE TEME	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. Sinteza metilnih estera derivata antranilne kiseline	18
3.1.1. Sinteza metil 2-amino-5-bromobenzoata	18
3.1.2. Sinteza metil 2-amino-6-klorobenzoata	18
3.2. Sinteza hidrazida derivata antranilne kiseline	19
3.2.1. Sinteza 2-amino-5-bromobenzohidrazida (2a).....	19
3.2.2. Sinteza 2-amino-6-klorobenzohidrazida (2b)	19
3.2.3. Sinteza 2-aminobenzohidrazida (2c).....	20
3.2.4. Sinteza 2-amino-4-klorobenzohidrazida (2d)	20
3.2.5. Sinteza 2-amino-6-fluorobenzohidrazida (2e)	20
3.3. Sinteza oksadiazolona 3a-e	21
3.3.1. Sinteza 5-(2-amino-5-bromofenil)-3- <i>H</i> -1,3,4-oksadiazol-2-ona (3a)	21
3.3.2. Sinteza 5-(2-amino-6-klorofenil)-3- <i>H</i> -1,3,4-oksadiazol-2-ona (3b).....	21
3.3.3. Sinteza 5-(2-aminofenil)-3- <i>H</i> -1,3,4-oksadiazol-2-ona (3c)	22
3.3.4. Sinteza 5-(2-amino-4-klorofenil)-3- <i>H</i> -1,3,4-oksadiazol-2-ona (3d).....	22

3.3.5.	Sinteza 5-(2-amino-6-fluorofenil)-3- <i>H</i> -1,3,4-oksadiazol-2-ona (3e).....	22
3.4.	Sinteza <i>N</i> -(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamina (4)	23
3.5.	Sinteza acilsemikarbazida 5a-e	23
3.5.1.	Sinteza 1-[(2-amino-5-bromobenzoil)amino]-3-[2-[(7-kloro-4-kinolil)amino]etil] uree (5a).....	23
3.5.2.	Sinteza 1-[(2-amino-6-kloro-benzoil)amino]-3-[2-[(7-kloro-4-kinolil)amino]etil] uree (5b).....	24
3.5.3.	Sinteza 1-[(2-aminobenzoil)amino]-3-[2-[(7-kloro-4-kinolil)amino]etil]uree (5c)	24
3.5.4.	Sinteza 1-[(2-amino-4-klorobenzoil)amino]-3-[2-[(7-kloro-4-kinolil)amino]etil] uree (5d).....	25
3.5.5.	Sinteza 1-[(2-amino-6-fluoro-benzoil)amino]-3-[2-[(7-kloro-4-kinolil)amino]etil] uree (5e).....	25
3.6.	Ciklizacija 1,4-disupstituiranog semikarbazida.....	26
3.6.1.	Sinteza <i>N</i> -[5-(2-amino-5-bromofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]- <i>N</i> -(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamina (6a)	26
3.6.2.	Sinteza <i>N</i> -[5-(2-amino-6-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]- <i>N</i> -(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamina (6b).....	27
3.6.3.	Sinteza <i>N</i> -[5-(2-aminofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]- <i>N</i> -(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamina (6c).....	27
3.6.4.	Sinteza <i>N</i> -[5-(2-amino-4-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]- <i>N</i> -(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamina (6d).....	28
3.6.5.	Sinteza <i>N</i> -[5-(2-amino-6-fluorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]- <i>N</i> -(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamina (6e)	29
4.	REZULTATI I RASPRAVA.....	30
5.	ZAKLJUČCI.....	45
6.	LITERATURA	46
7.	SAŽETAK/SUMMARY	50
8.	PRILOZI.....	52
9.	TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD	

1. UVOD

1.1. Antimikrobna terapija i antibakterijski lijekovi

Iako često ne spada u uobičajene aktualne teme vezane za budućnost čovječanstva i znanosti, poslijednjih godina stručnjacima i općoj populaciji postaje jasno kako je potreba za učinkovitom antimikrobnom terapijom zasigurno jedno od gorućih pitanja u zdravstvu s kojima se trenutno suočava.

1.1.1. Neracionalna primjena antibakterijskih lijekova, antibiotska rezistencija

Dvadeseto stoljeće, naročito njegova druga polovica, obilježeno je zapanjujućim uspjehom farmaceutske industrije na području razvoja antibakterijskih lijekova. Njihova neracionalna primjena je dovela do porasta bakterijske rezistencije te je znanstvena zajednica ubrzo osvijestila kakvi su potencijalni razmjeri ovog javnozdravstvenog problema.. Centri za kontrolu i prevenciju bolesti (CDC, engl. *Centers for Disease Control and Prevention*) 2019. godine su objavili izvješće u kojem navode da Sjedinjene Američke Države godišnje bilježe 2,8 milijuna infekcija uzrokovanih patogenima rezistentnim na antimikrobne lijekove, od kojih 35000 završi sa smrtnim ishodom. Izvješće također sadrži i popis patogena, razvrstanih po stupnjevima opasnosti, uz procjene brojeva kliničkih slučajeva i smrtnih slučajeva vezanih za pojedini soj (<https://www.cdc.gov>).

Uključeni su gotovo svi sojevi vrste *Staphylococcus aureus* koji su još 1941. godine bili osjetljivi na penicilin G, a već tijekom 1944. godine pronađeni su zlatni stafilocoki sposobni za enzimsku razgradnju penicilina. Doza od deset tisuća jedinica penicilina svakih šest sati tijekom četiri dana je početkom 40.-tih godina dvadestog stoljeća bila dostatna za izliječenje pneumonije uzrokovane vrstom *Streptococcus pneumoniae*, dok pedeset godina kasnije doze od više desetaka milijuna jedinica nisu jamčile preživljavanje pacijenata u slučaju infekcije (Neu, 1992).

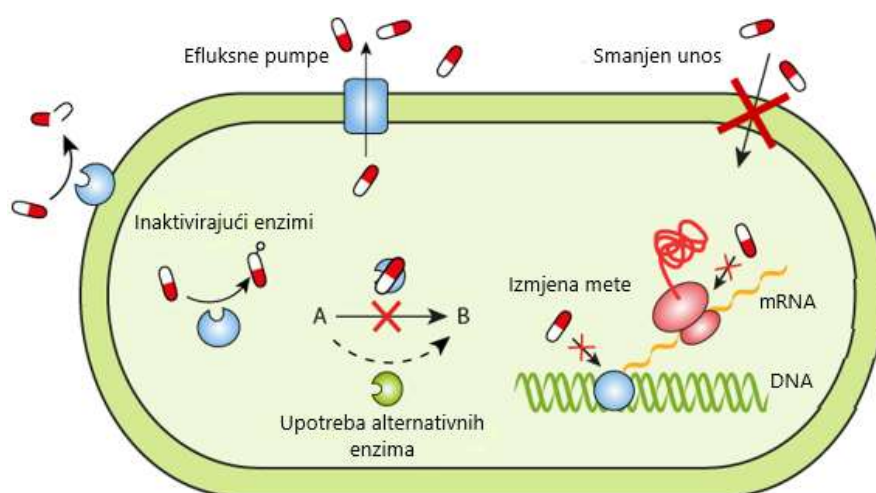
1.1.2. Mehanizmi rezistencije bakterija na antibakterijske lijekove

Primjer mehanizma rezistencije je sprječavanje prodora antibakterijskih lijekova u unutrašnjost bakterijske stanice. Za razliku od Gram-pozitivnih bakterija, Gram-negativne bakterije načelno su slabije podložne prodoru antibakterijskih lijekova, zbog barijerne funkcije njihove vanjske membrane. Hidrofilni antibakterijski lijekovi difundiraju kroz porinske proteine vanjske membrane bakterija. Regulacijom tih proteina naniže lijekovima se smanjuje pristup unutrašnjosti bakterije (Blair i sur., 2015). Drugi način sprječavanja pristupa molekule

lijeka unutrašnjosti bakterije postiže se pojačanom ekspresijom efluksnih pumpi – transmembranskih proteina koji aktivnim transportom izbacuju molekule iz bakterijske stanice (Munita i Arias, 2015)(Slika 1.).

Drugi primjer postizanja bakterijske rezistencije je inaktivacija antibakterijskog lijeka. Bakterija proizvodi enzime sposobne za modifikaciju strukture lijeka, čime se smanjuje mogućnost interakcije lijeka s njegovom metom zbog ometanog pristupa meti. Neke od reakcija su: 1) acetilacija (aminoglikozidi, kloramfenikol, streptogramini), 2) fosforilacija (aminoglikozidi, kloramfenikol) te 3) adenilacija (aminoglikozidi, linkozamidi) (Munita i Arias, 2015). Rezistencija bakterija na β -laktame zasniva se na prisustvu β -laktamaze, enzima čija je funkcija razgradnja amidne veze β -laktamskog prstena čime se on otvara, a produkt ove hidrolize je inaktivna molekula (Blair i sur., 2015).

Treći primjer mehanizma rezistencije je promjena u strukturi meta antibakterijskih lijekova. Mutacija u genu koji kodira za metu antibakterijskog lijeka dovodi do promjene u afinitetu antibakterijskog lijeka prema meti dok je vlastita normala funkcija proteina-mete u bakteriji očuvana.. Transformacijom – unošenjem DNA iz bakterijske okoline – postiže se bakterijska rezistencija modifikacijom mete pomoću formiranja „mozaičnih“ gena. Podvrste *S. aureus*, kao što je soj otporan na meticilin (MRSA, engl. *methicillin-resistant S. aureus*) i *S. pneumoniae* svoju rezistenciju ostvaruju unošenjem gena koji kodiraju izmijenjene mete proteina koji veže penicilin (PBP, engl. *penicillin-binding protein*) neosjetljive na β -laktame (Blair i sur., 2015). Mete antibakterijskih lijekova mogu se zaštititi i enzimskom modifikacijom koja ne obuhvaća mutaciju na razini molekule DNA.



Slika 1. Shematski prikaz najčešćih bakterijskih mehanizama rezistencije na antibakterijske lijekove (preuzeto i prilagođeno s <http://www.reactgroup.org>)

1.1.3. Prioritizacija odabira meta za razvoj novih lijekova u kontekstu industrije i javnog zdravstva

Iako bi u teoriji najvažnije nezadovoljene medicinske potrebe (engl. *unmet medical need*) trebale imati najveći prioritet u razvoju novih lijekova, brojni drugi faktori utječu na odluku o tome koju bolest će istraživači na odabrati kao cilj za pronalazak učinkovite farmakoterapije. Unatoč ogromnom uloženom trudu, kod nekih bolesti problem je činjenica da trenutna razina razumijevanja bolesti spriječava napredak u tom području, kao što je slučaj kod Alzheimerove bolesti i shizofrenije (Blass, 2015).

Istraživanja farmaceutske industrije obično se fokusiraju na kronične bolesti česte u razvijenom svijetu, kao što su osteoporoza, hipertenzija, hiperkolesterolemija i artritis te je jasno da pronalazak djelotvorne i sigurne terapije jamči velik profit farmaceutskim kompanijama. Važna i manje očita meta također su stanja s malom, ali konzistentnom populacijom oboljelih poput amiotrofne lateralne skleroze (ALS) za koje još ne postoji učinkovita terapija. Kada bi terapija postojala, terminalnu bolest bi pretvorila u kronično stanje, povećao bi se broj pacijenata koji je koriste što bi kompaniji osiguralo trajan izvor prihoda (Blass, 2015). Antibakterijski lijekovi uvijek su zamišljeni kao akutna terapija te, budući da trenutno stanje naizgled još uvijek nije alarmantno kao što bi moglo postati u budućnosti, njihov razvoj kompanijama se možda ne čini hitnim kao što uistinu jest u usporedbi s ostalim spomenutim grupama lijekova.

Pesimističan pogled na budućnost nazire se u preglednom radu iz 2017. godine gdje autori navode da ćemo se zbog povećane pojavnosti višestruko otpornih sojeva i minimalnog broja novootkrivenih antibakterijskih lijekova uskoro vratiti u „predantibiotsku“ eru gdje su i jednostavne i teške infekcije (poput tuberkuloze, pneumonije, infekcija rana) bile gotovo neizlječive te čest uzrok smrti (Matzov i sur, 2017).

Prijetnja rezistentnih sojeva bakterija morbiditetu i mortalitetu diljem svijeta dovela je do zahtjeva članica Svjetske zdravstvene organizacije (WHO, engl. *World Health Organization*) za sastavljanje liste bakterija rezistentnih na antibakterijske lijekove kao korak koji vodi potpori istraživanja i razvoja učinkovitih lijekova. Na temelju 25 uzoraka stečene rezistencije i 10 kriterija za prioritizaciju, odabrano je 20 vrsta bakterija koje su stratificirane u tri skupine, od kojih *Pseudomonas aeruginosa* (PSA) otporna na karbapeneme pripada u najvišu skupinu, onu s kritičnim prioritetom. Popis je sastavljen s ciljem da se potaknu istraživanja antibakterijskih lijekova, koja ima ključnu ulogu u razvoju strategija za suočavanje s ovom prijetnjom (Tacconelli i sur., 2018).

1.2. *Pseudomonas aeruginosa* i virulencija

Pseudomonas aeruginosa (PSA) je Gram-negativna bakterija često opisivana kao jedna od glavnih prijetećih vrsta patogena koji čine kraticu ESKAPE (sastavljenu od imena rodova *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* i *Enterobacter*), kojima je zajednički visok stupanj virulentnosti i antibiotske rezistencije. Otpornost na tretman antibakterijskim lijekovima postiže se pomoću više mehanizama: intrinzična rezistencija zbog niske permeabilnosti stanične stijenke (zbog prisustva efluksnih pumpi i β -laktamaza), stečena rezistencija nakon stupanja u kontakt s antibakterijskim lijekovima (poput mutacija na genu za DNA girazu koje uzrokuju rezistenciju na fluorokinolone) te adaptivna rezistencija kojoj mehanizam nije mutacijski. Potonji oblik mijenja ekspresiju određenih gena, između kojih su i oni zaslužni za tvorbu biofilma (Schütz i Empting, 2018).

Virulencija mikroorganizma tumači se njegovom sposobnošću za pristupanje i invaziju domaćina, razmnožavanje i izazivanje bolesti koja u konačnici može dovesti do smrti. Iako se virulencija smatra svojstvom patogena, važno je napomenuti da njezin stupanj zavisi o dostupnosti domaćina podložnog infekciji te samoj prirodi njihove interakcije (Casadevall i Pirofski, 2001).

1.2.1. Primjeri čimbenika virulencije PSA opisanih u ranoj literaturi

Virulencija PSA, osim opće definicije koja je istinita za sve mikroorganizme, posebno dolazi do izražaja u kontekstu njegove oportunističke patogenosti. Da bi se ona ostvarila, nužni su određeni preduvjeti koji se često ostvaruju u bolničkom okruženju. Širok spektar bolesti koje uzrokuje PSA u raznim kliničkim situacijama desetljećima je poznat te je produkt izuzetne naglašenosti učinka faktora virulencije u određenim skupinama pacijenata. Primjeri takvih infekcija su septikemija u granulocitopeničnih pacijenata, plućne infekcije u pacijenata s cističnom fibrozom, endokarditis kod ovisnika o heroinu i sepsa u pacijenata s teškim opeklinama (Pollack, 1984).

Govoreći o čimbenicima virulencije, raniji radovi iz druge polovice 20. stoljeća naglašavaju adherenciju PSA na epitelne stanice kao ključan čimbenik u koloniziranju raznih sustava u ljudskom organizmu, postignutu pomoću pila ili fimbrija – proteinskih struktura na površini bakterijske stanice (Pollack, 1984).

Važan čimbenik virulencije PSA njezina je multifaktorijalna invazivnost. Osim penetracije pomoću razgradnje domaćinovih fizičkih barijera, pokazana je važna korelacija između broja polimorfonuklearnih leukocita – primarne zaštite protiv invazije PSA – te

sposobnosti suzbijanja infekcije. Nazalna tkiva leukopeničnih miševa u istom su eksperimentu na mjestima invazije podlegla nekrozi (Brownstein i Johnson, 1982).

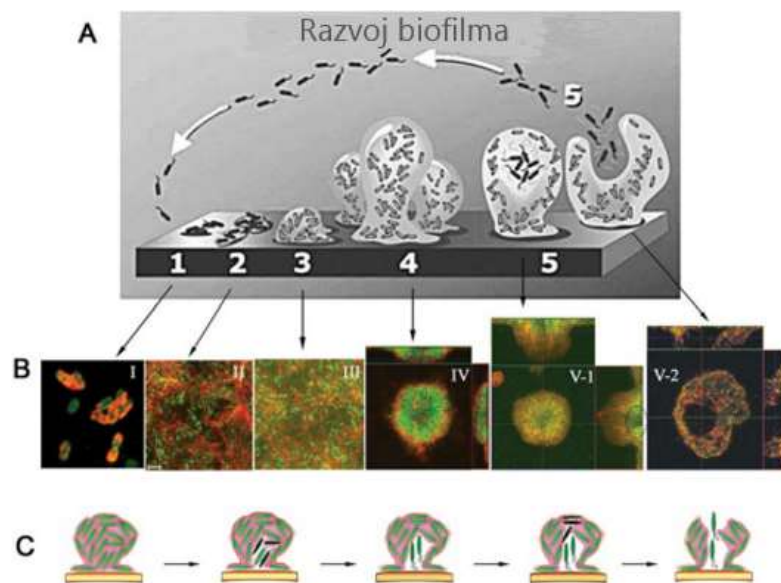
Još jedan čimbenik virulencije PSA je sposobnost diseminacije i uzrokovanje sistemskog oboljenja. Neki od faktora lokalne invazivnosti vjerojatno pridonose i njezinoj diseminaciji: Uz moguća antifagocitna svojstva glikokaliksa i lipopolisaharida vanjske membrane, pokazano je da su krvni izolati PSA uglavnom otporni i na baktericidnu aktivnost seruma (Young, 1972). Uz to, navodi se da su lipopolisaharid (endotoksin) i endotoksin A bakterijski produkti zaslužni za sistemsku toksičnost PSA (Pollack, 1984).

1.2.2. Tvorba biofilma

U prikladnim uvjetima *P. aeruginosa* tvori biofilm. Njegova funkcija je smanjenje osjetljivosti stanice na antimikrobne agense te zaštita od domaćinovog imunskog odgovora.

Raniji radovi opisuju ga kao „*glikokaliks*“, polisaharidnu strukturu, lociranu na samoj površini stanice ali odvojenu od oligosaharidne komponente lipopolisaharida. Isti autori pokazali su kako je ta struktura visoko organizirana i čvrsto upakirana te bakteriji služi kao sidro, vežući je za okoliš i sestrinske stanice te štiteći je od obrambenih faktora domaćina, poput fagocita, protutijela, komplementa i mukocilijarnog mehanizma respiratornog trakta (Pollack, 1984).

Izvanstanična polimerna tvar (EPS, engl. *Extracellular polymeric substance*) funkcionira kao matriks, održava strukturu te stanice biofilma drži na okupu. Sastoji se od slabo definirane mješavine polisaharida, nukleinskih kiselina i proteina. Egzopolisaharidi Psl (engl. *polysaccharide synthesis locus*), Pel i alginat glavna su komponenta biofilma u PSA, uz izvanstaničnu DNA (eDNA, engl. *extracellular DNA*) (Ma i sur., 2009). Produkt biosintetske mašinerije Psl služi kao kostur - držeći stanice biofilma na okupu, dok je matriksni polisaharid kodiran *pel* lokusom bogat glukozom te je važan za stvaranje pelikule. Alginat je sastavnica matriksa mukoidnog fenotipa PSA, dominantnog plućnog patogena u pacijentima s cističnom fibrozom, te nastaje zbog mutacija negativnog regulatora *mucA* u nemukoidnim sojevima PSA (Ryder i sur., 2007). Ma i suradnici opisali su kompleksan mehanizam razvoja biofilma koji uključuje dinamično strukturiranje Psl i agregata stanica u trodimenzionalnim mikrokolonijama. Predložili su i mehanizam kojim PSA koristi programiranu staničnu smrt i lizu za proizvodnju šupljina u matriksu da bi se oslobodio dio stanica za buduće razvijanje biofilma (Slika 2.) (Ma i sur., 2009).

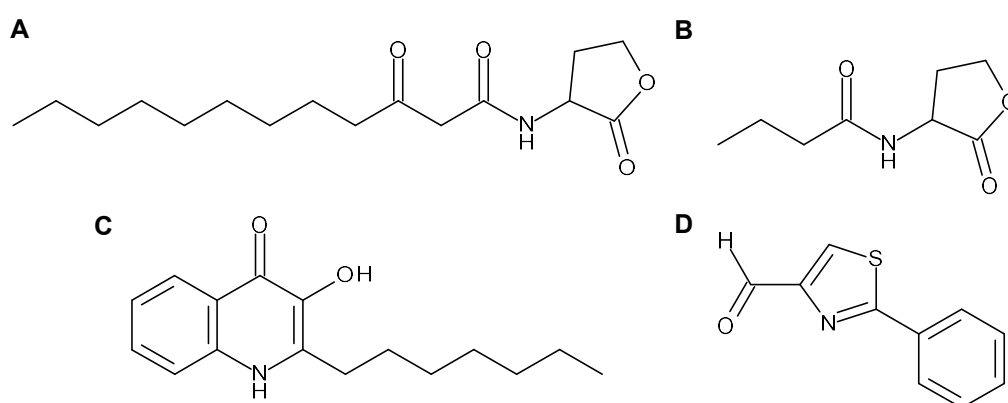


Slika 2. Formiranje i razvoj biofilma PSA. (A) Shematski prikaz pet stadija razvoja biofilma. (B) Odabrane slike stadija formiranja biofilma. Crveno obojenje - Psl, zeleno obojenje - PSA obilježena zelenim fluorescentnim proteinom (GFP, engl. *green fluorescent protein*). (C) Predloženi mehanizam razvoja biofilma koji se sastoji od žrtvovanja dijela stanica u središtu, prekida matriksa i oslobađanja stanica za daljnju disperziju.

1.2.3. *Quorum sensing* kao meta za otkriće novih lijekova

Quorum sensing (QS) naziv je za sofisticirani međustanični bakterijski komunikacijski sustav ovisan o gustoći populacije. Za signalizaciju koristi male difundirajuće molekule. Ključne patogene karakteristike poput proizvodnje čimbenika virulencije i tvorbe biofilma pod kontrolom su ovog sustava (Schütz i Empting, 2018). U preglednom radu iz 2014. godine temeljito je opisana hijerarhija četiri međusobno povezanih sustava uključenih u cjelokupni *quorum sensing* PSA, kao i malih molekula – ponekad zvanih autoinduktorima (AI, engl. *autoinducers*), koje tvore komplekse s pripadajućim regulatorima ekspresije: *N*-okso-dodekanoil-L-homoserinski lakton (OdDHL) koji se veže za LasR, *N*-butiril-L-homoserin lakton (BHL) za RhIR, kinolinski signal PSA (PQS, engl. *Pseudomonas quinolone signal*) za PqsR te najnovije otkriveni integrirani kinolonski signal (IQS, engl. *integrated quinolone signal*) koji se veže za IqsR (Lee i Zhang, 2015). Među navedenim signalnim molekulama, OdDHL i BHL dijele strukturni motiv *N*-acilhomoserinskog laktone (AHL, engl. *N-acyl-homoserine lactone*).

Istraživanje inhibitora bakterijskog QS pripada novijim strategijama razvoja lijekova. Općenito, novim klasama antibakterijskih lijekova koje se istražuju posljednjih godina zajednička je činjenica da ciljaju specifične čimbenike virulencije i njihove regulatorne mehanizme, umjesto uobičajenog ciljanja vijabilnosti stanica. Takav pristup minimizira selekcijski pritisak koji bi u protivnom dovodio do pojave rezistencije (Soukariéh i sur., 2018). Također, ciljanje specifičnih čimbenika virulencije trebalo bi imati minimalan učinak na komenzalnu mikrobiotu domaćina, budući da se radi o metama specifičnima za ciljanu bakteriju (Kutty i sur., 2015). Inhibitori QS (skraćeno: QSI, engl. *quorum sensing inhibitors*) mogli bi djelovati na navedeni način.



Slika 3. Strukture četiriju autoinduktora sustava QS bakterije *P. aeruginosa*: OdDHL (A), BHL (B), PQS (C), IQS (D)

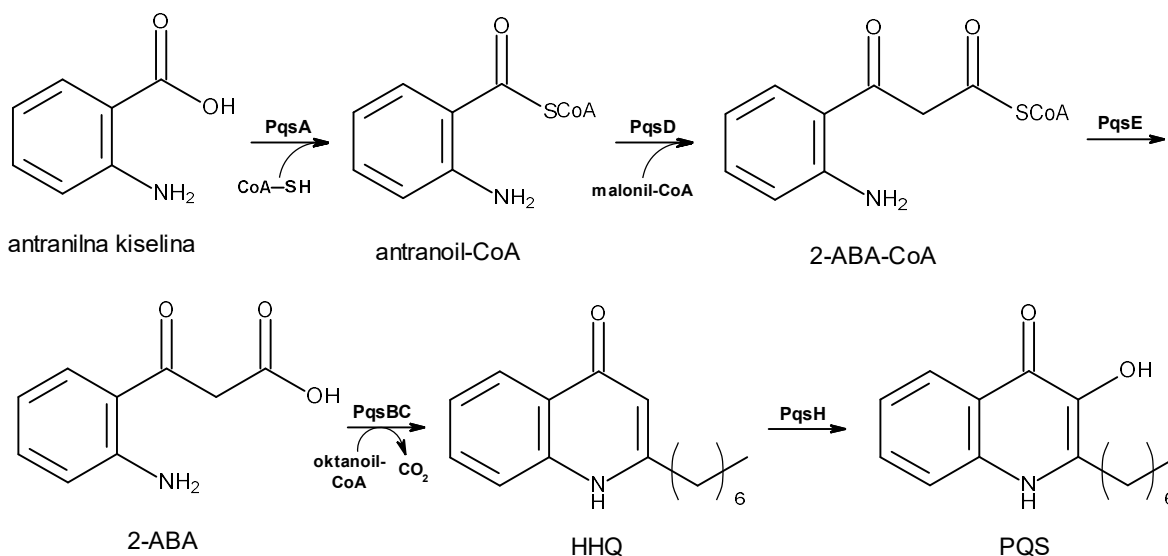
1.2.4. Uloga i biosinteza PQS

Izraz PQS odnosi se na signalnu molekulu 2-heptil-3-hidroksikinolin-4-(1*H*)-on (Slika 3.). PQS i njegov prekursor 2-heptil-4-(1*H*)kinolon (HHQ) vezanjem na transkripcijski regulator PqsR induciraju ekspresiju gena, uključujući one za PqsABCDE, enzime koji su zajedno s PqsH – čija je ekspresija pod kontrolom LasR - zaslužni za enzimsku biosintetsku kaskadu samog PQS (Schütz i Empting, 2018).

Osim što služi kao signalna molekula sustava QS, novija istraživanja upućuju na mnogobrojne dodatne učinke PQS. Uz svoju veliku sposobnost fezanja Fe^{3+} , PQS također pojačava ekspresiju gena za siderofore pioverdin i piokelin. Pokazano je i kako PQS različitim mehanizmima može ispoljavati citotoksični učinak te modulirati imunosti odgovor domaćina (Lin i sur., 2018).

Biosinteza PQS počinje iz molekule antranilne kiseline koja se pomoću PqsA prevodi u antranoil-koenzim A. Smatra se da PqsB, PqsC, PqsD i PqsE prevode antranilat u HHQ (Slika

4.) koji se može prenositi između stanica PSA. Posljednji korak uključuje hidroksilaciju HHQ te kao produkt daje PQS uz pomoć enzima PqsH (Lee i Zhang, 2015; Schütz i Empting, 2018).



Slika 4. Shematski prikaz biosinteze PQS. Imena enzima navedena su na strelicama. Kratice: CoA - koenzim A, 2-ABA-CoA - 2'-aminobenzoilacetil-CoA, 2-ABA - 2'-aminobenzoilacetatna kiselina.

1.2.5. Potencijal inhibitora *quorum sensing*-a kao terapijski djelatnih tvari

Sve veći broj znanstvenih radova vezanih uz inhibiciju QS-a i suzbijanje biofilma ukazuje na veliki potencijal istraživanja mogućih novih načina liječenja u ovom području. Rabin i suradnici zaključuju da remećenje matriksa EPS - ciljanjem njegovih komponenata poput alginata, Pel i Psl – može biti uspješan pristup u borbi protiv PSA, s obzirom da ograničen prodor antibakterijskih lijekova kroz biofilm uzrokuje njihovu neučinkovitost u suzbijanju infekcije (Rabin i sur., 2015). Pregledni rad objavljen 2013. godine navodi niz molekula učinkovitih u inhibiciji QS-a. Obuhvaćeni su QSI prirodnog (poput prokariotskog, životinjskog, biljnog, morskog) i sintetskog podrijetla (Kalia, 2013). Jedna od skupina obuhvaća niz potentnih antagonista PqsR (Soukariéh i sur. 2018). U *in vitro* i *in vivo* modelima biofilma pokazano je da QSI povećavaju osjetljivost bakterijskih biofilмова na antibakterijske lijekove. U istraživanju su od antibakterijskih lijekova korišteni tobramicin (na vrstama *P. aeruginosa* i *B. cepacia*) te klindamicin i vankomicin (na vrsti *S. aureus*). Važan zaključak je da, iako kombinacija antibakterijskih lijekova i QSI nije pokazala sinergizam protiv planktonskih stanica, dok je učinak bio pojačan pri upotrebi na stanicama uklopljenim u biofilm (Brackman i sur., 2011). Prikazani su i brojni drugi primjeri sinergizma QSI i antibakterijskih lijekova u suzbijanju bakterijskih infekcija povezanih s nastankom biofilma te se može zaključiti da bi

kombiniranje antibakterijskih lijekova s QSI moglo doprinijeti boljoj učinkovitosti antimikrobnih lijekova (Kalia, 2013).

1.3. Hibridni spojevi

Polifarmakologija, odnosno istovremeno ciljanje više pojedinačnih molekulskih meta vezanih za pojavu bolesti, pokazalo se kao učinkovita terapija brojnih bolesti poput malignih oboljenja, infekcija uzrokovanih različitim mikroorganizmima i kroničnih bolesti te takav pristup svoje mjesto nalazi u brojnim kliničkim smjernicama za liječenje navedenih oboljenja. Međutim, takav pristup postiže se u većini slučajeva kombinacijom lijekova, od kojih svaki cilja samo na jednu metu. Također, neželjene interakcije lijekova, kao i komplicirani režimi doziranja mogu rezultirati smanjenom suradljivošću pacijenata. Hibridni spojevi su molekule u kojima je prisutno dva ili više različitih farmakofora s različitim mehanizmima djelovanja te se razvoj takvih lijekova pokazao potencijalnim odgovorom na navedene izazove (Thomann i sur., 2016). Istraživanje hibridnih spojeva posljednjih godina provodi se na mnogim područjima pa tako i za liječenje malarije ili malignih bolesti, koje također nerijetko pokazuju visok stupanj rezistencije na lijekove s pojedinačnom metom. Uobičajen pristup u dizajnu takvih spojeva zasniva se na kombinaciji međusobno kovalentno povezanih farmakofora, a neki od otkrivenih hibridnih spojeva dvojni su inhibitori ciklooksigenaze-2 i 5-lipooksigenaze (Cai i sur., 2016) te inhibitori aromataze i steroidne sulfataze (Woo i sur., 2011).

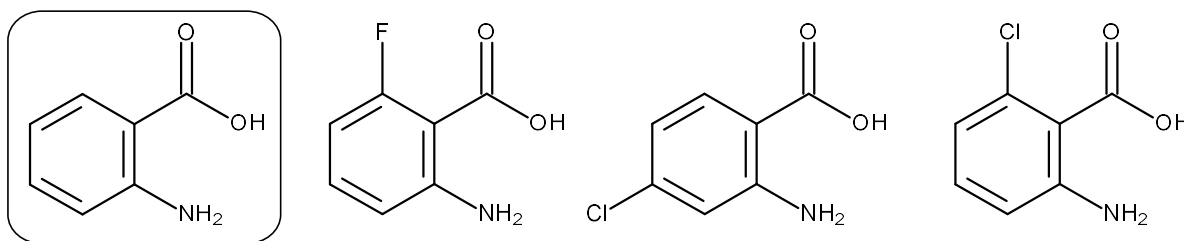
1.4. Pregled dosadašnjih istraživanja

1.4.1. Inhibitori signalne mreže Pqs

Pregledni rad u kojem su sabrani do tada otkriveni inhibitori enzima iz sintetskog puta autoinduktora PQS objavljen je 2018. godine. Inhibitori PqsA zasnivali su se na derivatima antranilne kiseline supstituirane halogenima na različitim položajima. Navedeno je da je istražen odnos strukture i funkcionalnosti spojeva koji ciljaju transkripcijski faktor PqsR te da su poznata četiri farmakološka profila: agonisti, antagonisti, inverzni agonisti i bifazni modulatori PqsR. U radu su prikazane i strukturne modifikacije liganada PqsR u svrhu postizanja inhibicije proizvodnje piocijanina te način na koji je izbjegnuta metabolička pretvorba spomenutih spojeva. Skupine istraživanih molekula također uključuju: mimetike antranil-adenozin monofosfata (antranil-AMP), inhibitore PqsD, PqsE, PqsBC, antagoniste PqsR i njihove derivate te dvojne inhibitore sustava Pqs (Schütz i Empting, 2018).

1.4.2. Istraženi odnos strukture i aktivnosti derivata antranilne kiseline

Pod pretpostavkom da bi elektron-odvlačeći učinak halogenih elemenata trebao spriječiti biosintezu aktiviranih spojeva poput tioestera antranilne kiseline s CoA a time i kinolinskog prstena, sintetiziran je niz njezinih analoga s halogenim elementima u *orto*- i *para*-položaju u odnosu na njezinu karboksilnu skupinu. Potvrđeno je da su najbolji učinak u smanjivanju razina završnih produkata Pqs sustava pokazali 6-FABA, 6-CABA i 4-CABA (engl. *2-amino-6-fluorobenzoic acid*, *2-amino-6-chlorobenzoic acid*, *2-amino-4-chlorobenzoic acid*, Slika 5.). Ista skupina istraživača nije isključila mogućnost da je steričko ometanje ili interakcija halogena s bočnim ograncima aktivnog mjesta PqsA uzrok njihove učinkovitosti (Lesic i sur., 2007). Kasnija istraživanja potvrdila su da se antranilna kiselina za enzim PqsA veže u obliku antranoil-adenozinmonofosfata (antranoil-AMP), da je 6-FABA-AMP također dobar supstrat koji ostvaruje dodatne interakcije s enzimom i da se razlog učinkovitosti 6-FABA krije u inhibiciji nekog od nizvodnih koraka sinteze HHQ i PQS (Witzgall i sur., 2017).

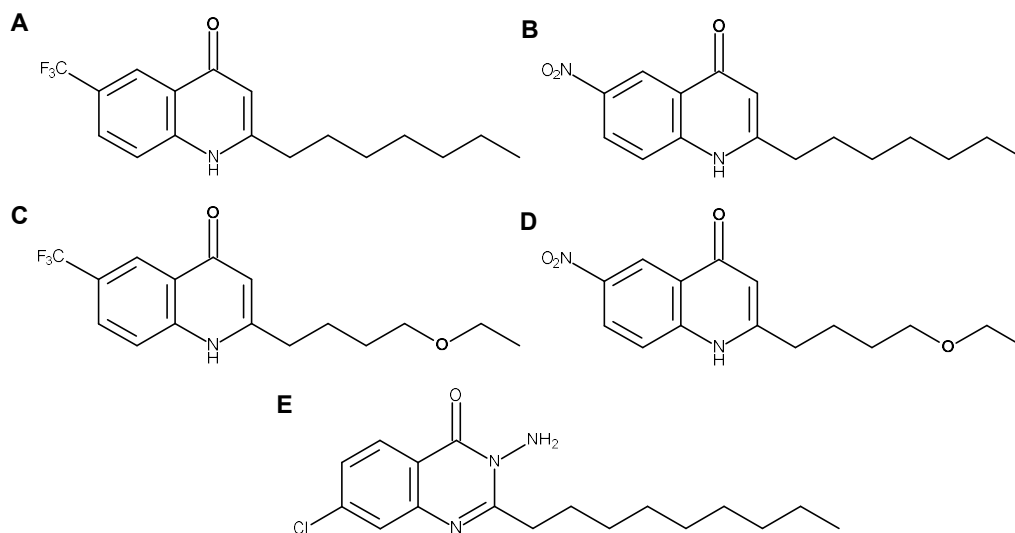


Slika 5. Antranilna kiselina (označena) i njezini derivati, redom: 6-FABA, 4-CABA, 6-CABA.

1.4.3. Kinolinski derivati kao biološki aktivni spojevi u antimikrobnoj terapiji

Spojevi čija se struktura zasniva na kinolinskom prstenu široko su zastupljeni, kako u prirodi, tako i u svijetu sintetskih spojeva. Među postojećim antimikrobnim lijekovima, kinolinski prsten sastavnica je poznatih antimalarka (npr. kinin, klorokin i primakin) i antibakterijskih lijekova (fluorokinoloni) a nalazi se i u antihelminticima, antimikoticima, kardi tonicima, protuupalnim lijekovima i brojnim drugim terapijskim skupinama (Chung i sur., 2015). Nitroksolin (5-nitro-8-hidroksikinolin) je uroantiseptik koji inhibira QS *P. aeruginosa* u mikromolarnim koncentracijama. Kao rezultat toga, djelovanjem nitroksolina inhibiran je nastanak biofilma *P. aeruginosa* te je postignuta disperzija već formiranog biofilma (Sobke i sur., 2012). Kao što je ranije spomenuto, alkilkinoloni su signalne molekule u Pqs sustavu. Nekoliko istraživačkih skupina ispitalo je djelovanje različitih derivata kinazolina, kinolona i kinolina na bakterijski biofilm. Lu i suradnici dizajn antagonista PqsR bazirali su na strukturi prirodnog liganada, HHQ (Slika 6. A i B) (Lu i sur., 2012) te su otkrivenim spojevima

optimirali hidrofilitnost, uz dodatno istraživanje njihovog odnosa strukture i aktivnosti (Slika 6. C i D) (Lu i sur., 2014). Ilangovan i suradnici sintetizirali su niz od 50 alkilkinolonskih i kinazolinskih analoga te su mjerili njihov učinak na biosintezu alkilkinolona, ekspresiju gena zaslužnih za virulenciju i razvoj biofilma kod PSA (Slika 6. E) (Ilangovan i sur., 2013).

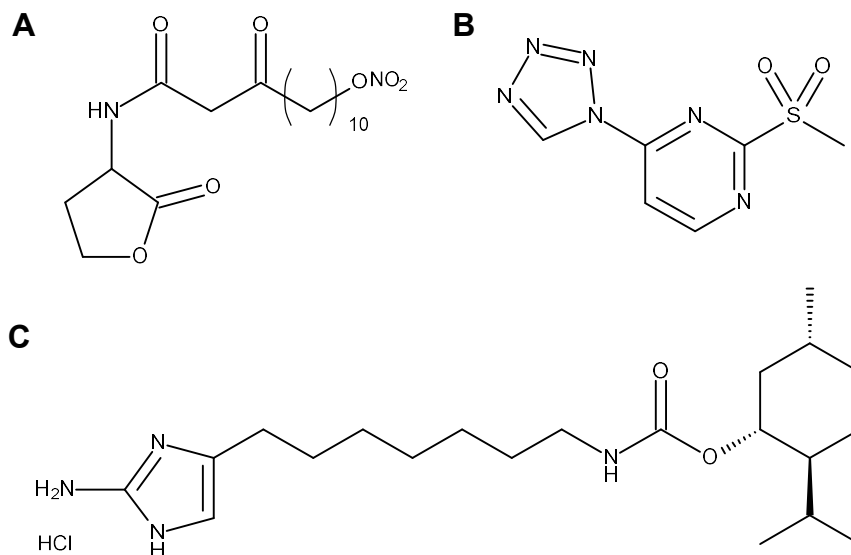


Slika 6. Kinolinski/kinazolinski antagonisti PqsR: spojevi s visokom inhibicijom stimulacije PqsR u prisustvu HHQ (A i B), spojevi koji su pokazali snažan antagonistički učinak na PqsR uz značajno poboljšanu topljivost u odnosu na prethodno istraživane spojeve (C i D), kinazolinski antagonist PqsR, nastao strukturnom modifikacijom postojećih alkilkinolonskih agonista (E).

1.4.4. Primjeri istraživanih hibridnih inhibitora QS

Kutty i suradnici sintetizirali su seriju hibridnih spojeva koji su sadržavali donorske skupine dušikova oksida te antagonista *N*-acilhomoserinskih laktona. Dušikov oksid u radu je naveden kao multifunkcionalna bakterijska signalna molekula i modulator sustava QS. Antagonistički učinak na molekule sa strukturnim motivom AHL postiže se modifikacijom duljine acilnog lanca te dodavanjem arilne funkcionalne skupine. Važno je napomenuti da su autori, uz visok stupanj inhibicije QS i povezanih čimbenika virulencije, kao izrazito poželjno svojstvo naveli ne-baktericidna svojstva sintetiziranih spojeva (Slika 7. A) (Kutty i sur., 2015). Thomann i suradnici sintetizirali su dvojni inhibitor temeljen na molekulskim motivima s pokazanim inhibitornim djelovanjem na PqsD te antagonističkim djelovanjem na PqsR. Kao markere aktivnosti QS mjerili su razine pocijanina i pioverdina, čimbenika virulencije čija je sinteza povezana s aktivnošću QS. Dvojni inhibitor uzrokovao je značajno smanjenje sinteze spomenutih čimbenika koje je ovisilo o njegovoj koncentraciji (Slika 7. B) (Thomann i sur.,

2016). Interesantan pristup pri dizajnu dvojnih inhibitora biofilma imali su Rogers i suradnici koji su sintetizirali hibride spojeva uzora dobivenih optimizacijom strukturnih motiva prisutnih u spojevima morskog podrijetla (bromoageliferin) te bakterijskim metabolitima (mentil karbamat iz roda *Cytophaga*) (Slika 7. C) (Rogers i sur., 2011).



Slika 7. Strukture nekih od istraživanih hibridnih inhibitora QS: Hibridni spoj s motivima donorske skupine dušikova oksida te antagonista AHL (A), dvojni inhibitor PqsD/antagonist PqsR (B), hibridni spoj s objedinjenim strukturnim motivima bromoageliferina i mentil karbamata (C).

2. OBRAZLOŽENJE TEME

Cilj ovog rada je sinteza hibrida sastavljenih od derivata antranilne kiseline i 7-kloro-4-aminokinolina povezanih heterocikličkim prstenom 1,3,4-oksadiazolom. Povezivanje dva strukturna motiva za koje je prethodno pokazano da djeluju kao inhibitori međustanične komunikacije u bakterijama (QSI), moglo dovesti do pojačanja njihova djelovanja.

Prvi molekularni motiv sadržan u strukturi hibridnih molekula je derivat 4-amino-7-klorokinolina. Osim što spojevi s kinolinom u strukturi služe kao signalne molekule u nekim putovima QS-a, za neke od njih dokazan je antimikrobni učinak (Lu i sur., 2012, 2014; Sobke i sur., 2012; Ilangovan i sur., 2013).

Antranilna kiselina i njezini supstituirani derivati (halogen vezan na različitim položajima na benzenskom prstenu) predstavljaju drugi strukturni motiv. Antranilna kiselina je polazni spoj u biosintezi autoinduktora 2-heptil-3-hidroksikinolin-4-(1*H*)-ona, čimbenika virulencije i produkta jednog od glavnih putova QS *P. aeruginosa*-e. Pokazano je da njezini analozi, naročito oni s elektron-odvlačćim skupinama vezanima na prsten, uspješno smanjuju koncentracije autoinduktora zaslužnih za sintezu biofilma i virulenciju (Lesic i sur., 2007; Witzgall i sur., 2017).

Kao poveznica između dva farmakofora izabran je 1,3,4-oksadiazol, peteročlani heterociklički prsten stabilan na enzimsku i kemijsku razgradnju.

U nastavku istraživanja, sintetiziranim spojevima biti će ispitano biološko djelovanje.

3. MATERIJALI I METODE

Svi reagensi korišteni u sintezi komercijalno su dostupni, bili su *p.a.* ili minimalno purum čistoće ($\geq 95\%$) i upotrijebljeni su bez dodatnog pročišćavanja. Sva otapala korištena u sintezi bila su *p.a.* kvalitete te su bezvodna otapala sušena nad molekulskim sitima. Za potrebe ekstrakcije otapala su sušena nad bezvodnim solima.

Reagensi korišteni u ovom radu navedeni su na sljedeći način: ime spoja (kratica/formula, proizvođač); metil 2-amino-4-klorobenzoat, metil 2-amino-6-fluorobenzoat (Fluorochem, Ujedinjeno Kraljevstvo), 2-amino-5-bromobenzojeva kiselina, 4,7-diklorokinolin, trifenilfosfin (PPh₃), metil antranilat 50-60 w% hidrazin hidrat (Sigma Aldrich, MO, SAD), 2-amino-6-klorobenzojeva kiselina (Apollo Scientific, Ujedinjeno Kraljevstvo), 1,1'-karbonildiimidazol (CDI, Combi-Blocks), hidrazin hidroklorid (Aldrich chemistry, MO, SAD), natrijev sulfat (Na₂SO₄), etanol (EtOH), kloroform (CHCl₃), diklormetan (DCM), cikloheksan (Lach Ner, Češka Republika), kalijev karbonat (K₂CO₃), tetraklorugljik (CCl₄), metanol (MeOH), toluen, diizopropil-eter (iPr₂O), dimetil sulfoksid (DMSO), etil acetat (EtOAc) (Kemika, Republika Hrvatska), etilendiamin (TCI, OR, SAD), tionil klorid (SOCl₂), trietilamin (Et₃N), toluen (Acros Organics, Belgija), *N,N*-dimetilformamid (DMF, Fisher Chemical, PA, SAD), acetonitril (ACN, Alfa Aesar, MA, SAD), deuterirani dimetil sulfoksid (DMSO-*d*₆, Eurisotop, Ujedinjeno Kraljevstvo).

Tijek reakcije, sastav i čistoća sintetiziranih spojeva praćeni su pomoću tankoslojne kromatografije (TLC) i tekućinske kromatografije ultravisoke djelotvornosti spregnute s masenim detektorom (UPLC-MS/UV). TLC je provedena na TLC folijama (Silica Gel 60 F₂₅₄ aluminium sheets, Merck) uz detekciju UV lampom (254 nm). UPLC-MS/UV analize provedene su na Waters Acquity sustavu spregnutim s SQD spektroskopom masa.

Pročišćavanja spojeva provedena su korištenjem purifikacijskog sustava (Interchim, PuriFlash xs 520 Plus). Korištene su Interchim Puriflash SiHC (12 g - 25 g; 15 μM) kolone. Kao slabi eluens korišten je DCM (otapalo A), a kao jaki eluens korišten je metanol. Radi ublažavanja učinka razrijeđenja pri miješanju otapala tijekom ispiranja kolone, unaprijed su priređene otopine metanola u DCM (otapalo B koncentracija 10, 15 i 20 %, zavisno o eksperimentu). Jedan od završnih spojeva dijelom je pročišćen na preparativnoj TLC (PTLC) ploči (Merck).

Spojevi pripremljeni u okviru ovog diplomskog rada identificirani su spektroskopskim tehnikama (¹H i ¹³C NMR, MS). ¹H i ¹³C spektri snimljeni su na spektrometrima Bruker DPX 300 MHz (opremljen s RT 5 mm BBI probom), Bruker AV400 MHz (opremljen s RT 5mm

BBO probom), Bruker DRX 500 MHz (opremljen s RT 5 mm SEI i TXI probama) i Bruker Avance III 600 MHz (opremljen s 5 mm RT BBI probom). Spektri su snimljeni pri 25 °C u deuteriranom DMSO. Relativni pomaci izraženi su u ppm prema tetrametilsilanu (TMS) kao unutarnjem standardu.

UPLC analize su provedene na instrumentu Waters Acquity UPLC spregnutim sa SQD spektrometrom masa. Postavke instrumenta i metode korištene za analizu opisane su u daljnjem tekstu.

Uvjeti detektora:

UV detektor:

- PDA raspon: 210 – 340 nm (UV-TIC spektar je zbroj signala od 210 – 340 nm)
- akvizicija 40 Hz

MS detektor:

- ionizacijski mod: pozitivan i negativan alternirajući elektrosprej (ESI⁺/ESI⁻)
- raspon masa: 90 – 1000 AMU
- scan vrijeme: 0,15 s
- *interscan* kašnjenje: MS *interscan* - 0,02 s
- napon na kapilari: 3,00 kV; napon na stošcu (*cone*): 33,00 V; ekstraktor: 3,00 V
- RF leće: 0,2 V
- temperatura izvora (*source temperature*): 150 °C;
- desolvacijska temperatura: 350 °C;
- protok desolvacijskog plina: 750 L h⁻¹;
- protok plina na stošcu (*cone gas flow*): 70 L h⁻¹
- LM 1 rezolucija: 15,0; HM 1 rezolucija: 15,0

Za praćenje sastava reakcijske smjese korištene su dvominutne UPLC analize, u dva različita moda.

UPLC-MS/UV High pH mod:

- Kolona: BEH-C18 kolona (1,7µm , 2,1 × 50 mm), Acquity
- Temperatura: 25 °C
- Pokretna faza: A (0,05 % V/V otopina amonijaka u vodi)
B (0,03 % V/V otopina amonijaka u ACN)
- Protok: 0,9 mL/min Injekcijski volumen: 2 µL
- Diluent: voda/ACN (50:50 V/V)
- Detektor: UV detektor, MS detektor

- Trajanje analize: 2 min (+ 0,5 min za kondicioniranje kolone i + 0,5 min za ispiranje kolone koje nisu uključene u trajanje analize)

UPLC-MS/UV High pH mod:

- Kolona: BEH-C18 kolona (1,7 μ m , 2,1 \times 50 mm), Acquity
- Temperatura: 25 °C
- Pokretna faza: A (0,1 % *V/V* otopina HCOOH u vodi)
B (0,1 % *V/V* otopina HCOOH u ACN)
- Gradijent: 97 % A, 3 % B do 97 % B do 1,5 min
- Protok: 0,9 mL/min
- Injekcijski volumen: 2 μ L
- Diluent: voda/ACN (50:50 *V/V*)
- Detektor: UV detektor, MS detektor
- Trajanje analize: 2 min (+ 0,5 min za kondicioniranje kolone i + 0,5 min za ispiranje kolone koje nisu uključene u trajanje analize)

Tablica 1. Gradijentni program dvominutne UPLC metode pri visokom i niskom pH

Vrijeme/min	%A ^a	%B ^b
0	97	3
1,5	3	97
1,9	3	97
2,0	97	3

^a Udio komponente A u pokretnoj fazi

^b Udio komponente B u pokretnoj fazi

Za potvrđivanje čistoće izoliranih produkata reakcija korištene su osmerominutne UPLC analize, u dva različita moda. Osmerominutne analize snimane su usporedno sa slijepim probama koje su sadržavale čisti diluent.

UPLC-MS/UV High pH mod:

- Kolona: BEH-C18 kolona (1,7 μ m , 2,1 \times 100 mm), Acquity
- Temperatura: 25 °C
- Pokretna faza: A (0,05 % *V/V* otopina amonijaka u vodi)
B (0,03 % *V/V* otopina amonijaka u ACN)
- Protok: 0,6 mL/min
- Injekcijski volumen: 2 μ L
- Diluent: voda/ACN (50:50 *V/V*)

- Detektor: UV detektor, MS detektor
- Trajanje analize: 8 min (+ 0,5 min za kondicioniranje kolone i + 0,5 min za ispiranje kolone koje nisu uključene u trajanje analize)

UPLC-MS/UV Low pH mod:

- Kolona: BEH-C18 kolona (1,7 μm , 2,1 \times 100 mm), Acquity
- Temperatura: 25 $^{\circ}\text{C}$
- Pokretna faza: A (0,1 % *V/V* otopina HCOOH u vodi)
B (0,1 % *V/V* otopina HCOOH u ACN)
- Protok: 0,6 mL/min- Injekcijski volumen: 2 μL
- Diluent: voda/ACN (50:50 *V/V*)
- Detektor: UV detektor, MS detektor
- Trajanje analize: 8 min (+ 0,5 min za kondicioniranje kolone i + 0,5 min za ispiranje kolone koje nisu uključene u trajanje analize)

Dio sintetiziranih spojeva dodatno je karakteriziran ispitivanjem njihovih tališta. U tu svrhu korištena je diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC, engl. *Differential Scanning Calorimetry*). Termogrami su snimljeni na kalorimetru DSC 822e (Mettler Toledo) opremljenom sustavom za hlađenje ispod sobne temperature. Uzorci su postavljeni na aluminijsku posudu za DSC prekrivenu probušenim poklopcem. Posuda s uzorkom grijana je brzinom 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ na temperaturnom području 25-300 $^{\circ}\text{C}$. Nad uzorkom je održavan tok struje dušika brzine 50 mL/min. Podaci iz DSC instrumenta analizirani su koristeći STAR^e softver (V16.20b) (Mettler-Toledo).

3.1. Sinteza metilnih estera derivata antranilne kiseline

3.1.1. Sinteza metil 2-amino-5-bromobenzoata

Otopini 1,000 g (4,63 mmol) 2-amino-5-bromobenzojeve kiseline u 45 mL bezvodnog metanola dokapano je 2,01 mL (3,30 g, 27,8 mmol, 6 ekvivalenata) tionil klorida na s.t. Otopina je refluksirana na 58 °C tijekom 18 h. Zatim je dokapano još 0,67 mL (1,10 g, 9,3 mmol, 2 ekvivalenta) tionil klorida te je otopina ponovno refluksirana na 60 °C tijekom 18 h. Reakcijska smjesa je ohlađena na s.t., otapalo i višak tionil klorida upareni su pod sniženim tlakom te je ostatak otopljen u DCM (50 mL) i ekstrahiran zasićenom otopinom NaCl (30 mL) te osušen nad bezvodnim Na₂SO₄. Organski sloj je profiltriran, uparen pod sniženim tlakom te dodatno osušen pod sniženim tlakom. Dobiveni produkt **1a** je upotrijebljen u daljnjim reakcijama bez dodatnog pročišćavanja.

Iskorištenje: 1,065 g (80 %)

*t*_i 153 °C

MS (*m/z*) 229,94 (M-1)⁻

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,76 (s, 1H, 6), 7,70-6,90 (bs, 2H, 7), 7,38 (d, 1H, 3, *J* = 9,0 Hz), 6,78 (d, 1H, 4, *J* = 9,0 Hz), 3,79 (s, 3H, 9) ppm.

¹³C NMR (400 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167,1 (8), 150,6 (2), 136,9 (4), 132,8 (6), 119,5 (3), 110,8 (5), 105,4 (1), 52,2 (9) ppm.

3.1.2. Sinteza metil 2-amino-6-klorobenzoata

Otopini 0,900 g (5,82 mmol) 2-amino-6-klorobenzojeve kiseline u 10 mL suhog toluena dokapano je 2,32 mL (3,80 g, 32,0 mmol) tionil klorida na s.t. Otopina je refluksirana na 120 °C tijekom 18 h. Reakcijska smjesa je ohlađena i otapalo upareno pod sniženim tlakom. Smeđi uljasti produkt je ohlađen na ledenoj kupelji te je u njega dodano 5 mL suhog metanola. Nastali svijetlo-smeđi talog je odsisan i ispran bezvodnim metanolom. Dobiveni produkt **1b** u obliku HCl soli upotrijebljen je u daljnjim reakcijama bez dodatnog pročišćavanja.

Iskorištenje: 0,543 g (47 %)

MS (*m/z*) 186,02 (M+1)⁺

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7,89-7,58 (bs, 3H, 7), 7,18 (t, 1H, 4, *J* = 2,4 Hz), 6,83 (d, 1H, 6, *J* = 9,0 Hz), 6,75 (d, 1H, 3, *J* = 6,6 Hz), 3,83 (s, 3H, 9) ppm.

¹³C NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 166,5 (8), 146,5 (2), 132,4 (4), 131,9 (6), 118,9 (5), 117,2 (1), 116,3 (3), 52,8 (9) ppm

3.2. Sinteza hidrazida derivata antranilne kiseline

Opći postupak: Odgovarajućem metilnom esteru antranilne kiseline (**1a**, **1b** ili kupljen) dodano je 7,8 ekvivalenata (3,9 ekvivalenata za **2c**) hidrazin hidrata (50-60 w % u vodi). Otopina je zapečaćena u mikrovalnoj viali te miješana na 100-110 °C tijekom 1-4 dana. Reakcijska otopina zatim je ohlađena i prebačena u lijevak za odijeljivanje uz dodatak etil acetata (20 mL). U organski sloj se doda zasićena otopina amonijeva klorida (20 mL), te se vodeni sloj ekstrahira dodatnom količinom etil acetata (4 × 20 mL). Organski slojevi su sjedinjeni, osušeni nad bezvodnim Na₂SO₄, filtrirani i upareni pod sniženim tlakom.

3.2.1. Sinteza 2-amino-5-bromobenzohidrazida (**2a**)

Količina metilnog estera **1a**: 1,065 g (4,63 mmol)

Količina hidrazin hidrata: 0,562 mL (36,11 mmol)

Vrijeme trajanja reakcije: 3 dana

Iskorištenje: 0,677 g (67,5 %)

*t*_i 125 °C

MS(*m/z*) 231,86 (M+1)⁺

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,63-9,55 (bs, 1H, 9), 7,56 (d, 1H, 6, *J* = 2,4 Hz), 7,25 (dd, 1H, 3, *J* = 9,0, 2,4 Hz), 6,67 (d, 1H, 4, *J* = 8,4 Hz), 6,51-6,44 (bs, 2H, 7), 5,01-4,22 (bs, 2H, 10) ppm

¹³C NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 167,6 (8), 149,0 (2), 134,4 (4), 130,3 (6), 118,7 (3), 115,7 (5), 105,5 (1) ppm

3.2.2. Sinteza 2-amino-6-klorobenzohidrazida (**2b**)

Količina metilnog estera **1b**: 0,520 g (2,80 mmol)

Količina hidrazin hidrata: 1,360 mL (21,84 mmol)

Vrijeme trajanja reakcije: 4 dana

Iskorištenje: 0,326 g (62,7 %)

*t*_i 161 °C

MS(*m/z*) 185,87 (M+1)⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,47 (s, 1H, 9), 7,02 (t, 1H, 4, *J* = 8,0 Hz), 6,59 (d, 1H, 5, *J* = 8,0 Hz), 6,56 (d, 1H, 3, *J* = 8,0 Hz), 5,28-5,20 (bs, 2H, 10), 4,44-4,29 (bs, 2H, 7) ppm.

¹³C NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 164,9 (8), 147,6 (2), 130,6 (6), 130,2 (4), 120,2 (1), 115,7 (5), 113,4 (3) ppm

3.2.3. Sinteza 2-aminobenzohidrazida (2c)

Količina metil antranilata: 1.517 g (10,00 mmol)

Količina hidrazin hidrata: 2,430 mL (39,00 mmol)

Vrijeme trajanja reakcije: 18 h

Nakon hlađenja reakcijske smjese nastalom talogu produkta je dodan diizopropil-eter (5 mL) te je odsisan i osušen pod sniženim tlakom.

Iskorištenje: 0,833 g (55,1 %)

t_i 121 °C

MS(m/z) 151,91 (M+1)⁺

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 9,51-9,36 (bs, 1H, 9), 7,41 (d, 1H, 6, $J = 7,8$ Hz), 7,11 (t, 1H, 4, $J = 7,7$ Hz), 6,8 (d, 1H, 3, $J = 8,3$ Hz), 6,47 (t, 1H, 5, $J = 7,5$ Hz), 6,40-6,23 (bs, 2H, 7), 4,45-4,24 (bs, 2H, 10) ppm

¹³C NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 168,5 (8), 149,3 (2), 131,5 (4), 127,6 (6), 116,2 (3), 114,6 (5), 113,7 (1) ppm

3.2.4. Sinteza 2-amino-4-klorobenzohidrazida (2d)

Količina metil 2-amino-4-klorobenzoata: 1,000 g (5,35 mmol)

Količina hidrazin hidrata: 2,600 mL (41,73 mmol)

Vrijeme trajanja reakcije: 18 h

Iskorištenje: 0,946 g (94,6 %)

MS(m/z) 185,67 (M+1)⁺

¹H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 9,62-9,47 (s, 1H, 9), 7,41 (d, 1H, 3, $J = 9,0$ Hz), 6,74 (d, 1H, 6, $J = 2,1$ Hz), 6,78-6,60 (bs, 2H, 7), 6,49 (dd, 1H, 5, $J = 8,4, 3,0$ Hz), 4,51-4,24 (bs, 2H, 10) ppm

3.2.5. Sinteza 2-amino-6-fluorobenzohidrazida (2e)

Količina metil 2-amino-6-fluorobenzoata: 0,500 g (2,96 mmol)

Količina hidrazin hidrata: 1,438 mL (23,09 mmol)

Vrijeme trajanja reakcije: 18 h

Iskorištenje: 0,410 g (82 %)

t_i 142 °C

MS(m/z) 169,84 (M+1)⁺

^1H NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 9,44-9,30 (bs, 1H, 9), 7,06 (q, 1H, 4, $J = 3,0$ Hz), 6,48 (d, 1H, 3, $J = 7,0$ Hz), 6,30 (t, 1H, 5, $J = 8,5$ Hz), 5,78 (s, 2H, 7), 4,66-6,21 (bs, 2H, 10) ppm
 ^{13}C NMR (500 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163,5 (8), 161,2 (2), 149,5 (d, 6, $J = 31,2$ Hz), 131,1 (d, 4, $J = 51,6$ Hz), 111,1 (5), 106,6 (d, 1, $J = 92,4$ Hz), 101,8 (d, 5, $J = 108,6$ Hz) ppm

3.3. Sinteza oksadiazolona 3a-e

Opći postupak: Otopini odgovarajućeg derivata hidrazida antranilne kiseline u 5-20 mL bezvodnog *N,N*-dimetil formamida dodano je 1,05 ekvivalenata (1,15 ekvivalenata za **3e**) 1,1'-karbonildiimidazola (CDI) te je tako priređena otopina miješana na s.t. tijekom 18 h. Reakcijska smjesa ekstrahirana je odgovarajućim otapalima. Organski slojevi dobiveni ekstrakcijom sjedinjeni su, osušeni nad Na₂SO₄, filtrirani i upareni do suha pod sniženim tlakom.

3.3.1. Sinteza 5-(2-amino-5-bromofenil)-3-*H*-1,3,4-oksadiazol-2-ona (3a)

Količina hidrazida **2a**: 0,677 g (2,94 mmol)

Volumen DMF: 12 mL

Količina CDI: 0,500 mg (3,08 mmol, 1,05 ekvivalenata).

Reakcijska smjesa pomiješana je s etil acetatom (60 mL) te ekstrahirana vodom (40 mL). Vodeni sloj ekstrahiran je etila cetatom (2 × 50 mL). Nakon uparavanja dobiveno je 0,709 g ostatka koji je sadržao produkt **3a** te je upotrijebljen u daljnjim reakcijama bez dodatnog pročišćavanja.

t_i 231 °C

MS(m/z) 230,06 (M+1)⁺

3.3.2. Sinteza 5-(2-amino-6-klorofenil)-3-*H*-1,3,4-oksadiazol-2-ona (3b)

Količina hidrazida **2b**: 0,310 g (1,67 mmol)

Volumen DMF: 10 mL

Količina CDI: 0,352 g (1,75 mmol, 1,05 ekvivalenata).

U otopinu je dodano još 0,068 mg (0,42 mmol, 0,25 ekvivalenata) CDI te se nastavila miješati na s.t. tijekom 18 h. Voda (80 mL) je dodana u otopinu te je ekstrahirana etil acetatom (3 × 30 mL). Organski slojevi su sjedinjeni i ekstrahirani 10 % otopinom LiCl (2 × 30 mL). Uparavanjem je dobiveno 0,203 g ostatka koji je sadržao produkt **3b** te je upotrijebljen u daljnjim reakcijama bez dodatnog pročišćavanja.

MS(m/z) 210,11 (M-1)⁻

^1H NMR (500MHz, DMSO-*d*₆): δ 12,68-12,28 (bs, 1H, 10) 7,17 (t, 1H, 4, $J = 8,5$ Hz), 6,69 (d, 1H, 5, $J = 8,0$ Hz), 6,65 (d, 1H, 3, $J = 8,0$ Hz), 6,02-5,94 (bs, 2H, 7) ppm

3.3.3. Sinteza 5-(2-aminofenil)-3-*H*-1,3,4-oksadiazol-2-ona (3c)

Količina hidrazida **2c**: 0,500 g (3,31 mmol)

Volumen DMF: 15 mL

Količina CDI: 0,563 g (3,47 mmol, 1,05 ekvivalenata)

Otopina je pomiješana s etil acetatom (60 mL) te je ekstrahirana vodom (2 x 60 mL) i zasićenom otopinom NaCl (2 × 60 mL). Uparavanjem je dobiveno 0,168 g ostatka koji je sadržao produkt **3c** te je upotrijebljen u daljnjim reakcijama bez dodatnog pročišćavanja.

MS(*m/z*) 177,85 (M+1)⁺

¹H NMR (400MHz, DMSO-*d*₆): δ 12,70-12,27 (bs, 1H, 10), 7,44 (dd, 1H, 6, *J* = 8,0, 1,6 Hz), 7,21 (dt, 1H, 4, *J* = 7,2, 1,6 Hz), 6,84 (dd, 1H, 3, *J* = 8,4, 0,8 Hz), 6,64 (t, 1H, 5, *J* = 7,2, 1,2 Hz), 6,37-6,22 (bs, 2H, 7)

¹³C NMR (400MHz, DMSO-*d*₆): δ 154,6 (8), 153,6 (9), 146,9 (2), 131,8 (4), 126,7 (6), 115,8 (3), 115,5 (5), 104,5 (1) ppm

3.3.4. Sinteza 5-(2-amino-4-klorofenil)-3-*H*-1,3,4-oksadiazol-2-ona (3d)

Količina hidrazida **2d**: 0,945 g (5,09 mmol)

Volumen DMF: 20 mL

Količina CDI: 0,867 g (5,35 mmol 1,05 ekvivalenata)

Otopina je pomiješana s etil acetatom (60 mL) te je ekstrahirana vodom (2 × 60 mL) i zasićenom otopinom NaCl (2 × 60 mL). Uparavanjem je dobiveno 0,493 g ostatka koji je sadržao produkt **3d** te je upotrijebljen u daljnjim reakcijama bez dodatnog pročišćavanja.

*t*_i 191 °C

MS(*m/z*) 212,05 (M+1)⁺

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 12,9-12,2 (bs, 1H, 10), 7,44 (d, 1H, 6, *J* = 8,4 Hz), 6,91 (d, 1H, 3, *J* = 1,8 Hz), 6,66 (d, 1H, 5, *J* = 9,0, 2,4 Hz), 6,55-6,51 (bs, 2H, 7) ppm

3.3.5. Sinteza 5-(2-amino-6-fluorofenil)-3-*H*-1,3,4-oksadiazol-2-ona (3e)

Količina hidrazida **2e**: 0,400 g (2,36 mmol)

Volumen DMF: 5 mL

Količina CDI: 0,440 g (2,72 mmol, 1,15 ekvivalenata)

Otopina je pomiješana s etilacetatom (30 mL) te je ekstrahirana 10 % otopinom LiCl (2 × 20 mL). Uparavanjem je dobiveno 0,240 g ostatka koji je sadržao produkt **3e** te je upotrijebljen u daljnjim reakcijama bez dodatnog pročišćavanja.

MS(m/z) 194,05 ($M+1$)⁺

3.4. Sinteza *N*'-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamina (4)

Mješavina 5,00 g (25,3 mmol) 4,7-diklorokinolina i 15 mL (13,50 g, 227,2 mmol) 1,2-diaminoetana postepeno je zagrijana na 80 °C tijekom sat vremena uz miješanje. Zatim je temperatura povišena na 120 °C te je suspenzija miješana još šest sati, nakon čega je izlivena u smjesu vode i leda te ostavljena tijekom 18 h uz miješanje. Nastali talog produkta **4** je odsisan, ispran vodom i osušen pod sniženim tlakom.

Iskorištenje: 5,20 g (93 %)

t_r 100, 137 °C

MS (m/z) 221,94 ($M+1$)⁺

¹H NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 8,38 (d, 1H, 2, $J = 4,83$ Hz), 8,28 (d, 1H, 7, $J = 9,05$ Hz), 7,78 (d, 1H, 4, $J = 3,02$ Hz), 7,43 (d, 1H, 6, $J = 8,99$ Hz), 7,29-7,20 (bs, 1H, 10), 6,48 (d, 1H, 1, $J = 5,99$ Hz), 3,25 (q, 2H, 12, $J = 5,99$ Hz), 2,82 (t, 2H, 11, $J = 6,74$ Hz) ppm

¹³C NMR (400 MHz, DMSO- d_6): δ 151,9 (2), 150,3 (9), 149,1 (3), 133,3 (5), 127,5 (4), 124,1 (7), 124,0 (6), 117,5 (8), 98,7 (1) 46,0 (11), 40,0 (12) ppm

3.5. Sinteza acilsemikarbazida **5a-e**

Opći postupak: Suspenziji odgovarajućeg 3*H*-1,3,4-oksadiazol-2-onskog derivata antranilne kiseline **3a-e** u etanolu (10-20 mL) dodan je 1 ekvivalent spoja **4** (0,7 ekvivalenata za derivat **3a**). Tako priređene suspenzije miješane su na 100 °C 1-3 dana. Reakcijske smjese su zatim ohlađene, te su dobiveni talozi odsisani (svi derivati osim **5a**), isprani malom količinom etanola te osušeni pod sniženim tlakom.

3.5.1. Sinteza 1-[(2-amino-5-bromobenzoil)amino]-3-[2-[(7-kloro-4-kinolil)amino]etil] uree (**5a**)

Količina spoja **3a**: 0,688 g (2,69 mmol)

Količina spoja **4**: 0,417 g (1,88 mmol)

Volumen etanola: 20 mL

Vrijeme trajanja reakcije: 18 h

Reakcijska smjesa je ohlađena, otapalo je upareno pod sniženim tlakom te je sirovi produkt pročišćen brzom kromatografijom na koloni koristeći gradijentnu eluciju (Interchim, 25 g 15 μ m SiO₂ kolona, slabi eluens: DCM, jaki eluens: MeOH, 0 → 20 % jakog eluensa).

Dobiveno je 0,365 g smeđeg uljastog produkta koji je sadržao spoj **5a**. Korišten je u daljnjim reakcijama bez pročišćavanja.

3.5.2. Sinteza 1-[(2-amino-6-kloro-benzoil)amino]-3-[2-[(7-kloro-4-kinolil)amino]etil]uree (**5b**)

Količina spoja **3b**: 0,200 g (0,95 mmol)

Količina spoja **4**: 0,211 g (0,95 mmol)

Volumen etanola: 10 mL

Vrijeme trajanja reakcije: 18 h

Iskorištenje: 0,213 g (52 %)

t_r 213 °C

MS (m/z) 432,92 (M+1)⁺

¹H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 10,08-9,85 (bs, 1H, 9'), 8,56 (s, 1H, 10'), 8,41 (d, 1H, 2, J = 6,0 Hz), 8,18 (d, 1H, 7, J = 9,0 Hz), 7,79 (d, 1H, 4, J = 2,0 Hz), 7,46 (d, 1H, 6, J = 4,5, 2,0 Hz), 7,40 (t, 1H, 10, J = 5,0 Hz), 7,05 (t, 1H, 4', J = 7,5 Hz), 6,63 (d, 1H, 5', J = 9,0 Hz), 6,63 (s, 1H, 13), 6,56 (d, 1H, 3', J = 5,0 Hz), 6,54 (d, 1H, 1, J = 6,5 Hz), 5,99 (s, 2H, 7'), 3,43 (m, 4H, 11 i 12) ppm

¹³C NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 165,9 (8'), 159,2 (11'), 152,0 (2), 150,0 (9), 149,0 (3), 147,9 (2'), 133,4 (5), 130,6 (4'), 130,5 (6'), 127,5 (4), 124,2 (6), 123,9 (7), 119,1 (1'), 117,3 (8), 115,1 (5'), 113,2 (3'), 98,7 (1), 43,3 (11), 38,1 (12) ppm

3.5.3. Sinteza 1-[(2-aminobenzoil)amino]-3-[2-[(7-kloro-4-kinolil)amino]etil]uree (**5c**)

Količina spoja **3c**: 0,168 g (0,95 mmol)

Količina spoja **4**: 0,211 g (0,95 mmol)

Volumen etanola: 10 mL

Vrijeme trajanja reakcije: 2 dana

Iskorištenje: 0,186 g (49 %)

MS (m/z) 399,14 (M+1)⁺

¹H NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ 9,93-9,72 (bs, 1H, 9'), 8,40 (d, 1H, 2, J = 5,2 Hz), 8,16 (d, 1H, 7, J = 8,8 Hz), 8,05-7,92 (bs, 1H, 10'), 7,79 (d, 1H, 4, J = 2,8 Hz), 7,60 (d, 1H, 6', J = 8,4 Hz), 7,43 (dd, 1H, 6', J = 10,4, 2,4 Hz), 7,48-7,36 (m, 1H, 10), 7,18 (dt, 1H, 4', J = 8,4, 1,2 Hz), 6,86-6,75 (bs, 1H, 13), 6,72 (d, 1H, 3', J = 6 Hz), 6,57 (d, 1H, 1, J = 5,6 Hz), 6,51 (t, 1H, 5', J = 7,6 Hz), 6,44-6,32 (bs, 2H, 7'), 3,40-3,25 (m, 4H, 11 i 12) ppm

^{13}C NMR (400MHz, DMSO- d_6): δ 168,9 (8'), 159,3 (11'), 152,0 (2), 150,1 (9), 150,0 (3), 149,0 (2'), 133,4 (5), 132,2 (4'), 128,4 (4), 127,5 (6'), 124,1 (6), 123,9 (7), 117,3 (8), 116,3 (3'), 114,4 (5'), 112,4 (1'), 98,6 (1), 43,3 (12), 37,8 (11) ppm

3.5.4. Sinteza 1-[(2-amino-4-klorobenzoil)amino]-3-[2-[(7-kloro-4-kinolil)amino]etil] uree (5d)

Količina spoja **3d**: 0,493 g (2,33 mmol)

Količina spoja **4**: 0,516 g (2,33 mmol)

Volumen etanola: 20 mL

Vrijeme trajanja reakcije: 3 dana

Iskorištenje: 0,457 g (45 %)

MS(m/z) 432,89 (M+1)⁺

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 10,00-9,87 (bs, 1H, 9'), 8,41 (d, 1H, 2, $J = 5,4$ Hz), 8,16 (d, 1H, 7, $J = 8,4$ Hz), 8,02 (s, 1H, 13), 7,79 (d, 1H, 4, $J = 2,4$ Hz), 7,61 (d, 1H, 6', $J = 9,0$ Hz), 7,44 (dd, 1H, 6, $J = 9,6, 2,4$ Hz), 7,41 (t, 1H, 10, $J = 4,8$ Hz), 6,88-6,80 (bs, 1H, 10'), 6,79 (d, 1H, 3', $J = 2,4$ Hz), 6,73-6,65 (bs, 2H, 7'), 6,56 (d, 1H, 1, $J = 5,4$ Hz), 6,54 (dd, 1H, 5', $J = 9,0, 1,8$ Hz), 3,38-3,27 (m, 4H, 11 i 12), ppm

^{13}C NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 168,2 (8'), 159,2 (9'), 152,0 (2), 151,2 (2'), 150,0 (9), 149,0 (3), 136,7 (4'), 133,4 (5), 130,4 (5'), 127,5 (4), 124,1 (6), 123,8 (7), 117,3 (8), 115,0 (3'), 114,1 (6'), 111,2 (1'), 98,6 (1), 43,3 (12), 37,8 (11) ppm

3.5.5. Sinteza 1-[(2-amino-6-fluoro-benzoil)amino]-3-[2-[(7-kloro-4-kinolil)amino]etil] uree (5e)

Količina spoja **3e**: 0,235 g (1,20 mmol)

Količina spoja **4**: 0,267 g (1,20 mmol)

Volumen etanola: 10 mL

Vrijeme trajanja reakcije: 18 h

Reakcijska smjesa je ohlađena te otapalo upareno pod sniženim tlakom. Ostatak je resuspendiran u etanolu, nakon čega se stvorio talog koji je obrađen kao i spojevi **5b-d**.

Iskorištenje: 0,194 g (39 %)

MS (m/z) 416,93 (M+1)⁺

^1H NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 9,91-9,70 (bs, 1H, 9') 8,41 (d, 1H, 2, $J = 3,0$ Hz), 8,44-8,33 (bs, 1H, 10'), 8,17 (d, 1H, 7, $J = 8,5$ Hz), 7,79 (s, 1H, 4), 7,45 (d, 1H, 6, $J = 9,0, 2,0$ Hz), 7,40

(t, 1H, 10, $J = 5,0$ Hz), 7,09 (q, 1H, 4', $J = 7,5$ Hz), 6,67 (t, 1H, 13, $J = 6,5$ Hz), 6,56 (d, 1H, 1, $J = 5,5$ Hz), 6,51 (d, 1H, 3', $J = 9,0$ Hz), 6,30 (t, 1H, 5', $J = 9,5$ Hz), 6,12-6,04 (s, 2H, 7'), 3,44-3,32 (m, 4H, 11, 12) ppm

^{13}C NMR (500 MHz, DMSO- d_6): δ 164,7 (8'), 162,0 (6'), 159,0 (2'), 152,0 (2), 150,1 (9), 149,0 (3), 133,4 (5), 131,3 (4'), 127,5 (4), 124,2 (6), 123,8 (7), 117,3 (8), 110,9 (3'), 107,0 (1'), 101,3 (d, 5', $J = 107,4$ Hz), 98,6 (1), 43,3 (12), 38,0 (11) ppm

3.6. Ciklizacija 1,4-disupstituiranog semikarbazida

Suspenciji odgovarajućeg semikarbazida **5a-e** u diklormetanu (5 mL) dodano je 1,5 ekvivalenata trifenilfosfina (2 ekvivalenta u slučaju **5e**), 1,6-2,7 ekvivalenata tetraklorugljika te 4 ekvivalenta trietilamina. Otopina je miješana na 46 °C tijekom 18 h (tri dana u slučaju **5b**). Reakcijska otopina zatim je ohlađena, dodan je diklormetan (25 mL), te je ekstrahiran vodom (20 mL). Zatim je vodeni sloj ekstrahiran dodatnom količinom diklormetana (2 × 20 mL). Organski slojevi su sjedinjeni, osušeni nad bezvodnim Na₂SO₄, filtrirani i upareni pod sniženim tlakom. Dobiveni ostatak pročišćen je kromatografijom na koloni koristeći gradijentnu eluciju.

3.6.1. Sinteza *N'*-[5-(2-amino-5-bromofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]-*N*-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamina (**6a**)

Količina spoja **5a**: 0,365 g (čistoća 60%, 0,458 mmol)

Količina trifenilfosfina: 0,180 g (0,688 mmol)

Količina trietilamina: 0,254 mL (1,83 mmol)

Količina tetraklorugljika: 0,100 mL (1,27 mmol, 2,7 ekvivalenata)

Nakon 18 h miješanja dodano je još 0,120 g (0,458 mmol) trifenilfosfina te se suspenzija nastavila miješati 18 h. Dodano je još 0,120 g (0,458 mmol) trifenilfosfina te se suspenzija nastavila miješati još 4 dana.

Dobiveni ostatak nakon uparavanja pročišćen je brzom kromatografijom na koloni koristeći gradijentnu eluciju (Interchim, 12 g 15 μm SiO₂ kolona, slabi eluens: DCM, jaki eluens: MeOH, 0 → 15 % jakog eluensa). Dobivena frakcija je uparena do suha pod sniženim tlakom te je ostatak trituiran s 2 mL diizopropil-etera, odsisan i osušen.

Iskorištenje: 0,012 g (5,7 %)

MS(m/z) 461,0 (M+1)⁺

t_r 213 °C

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 8,46 (d, 1H, 2, $J = 6,6$ Hz), 8,26 (d, 1H, 7, $J = 9,6$ Hz), 8,00 (t, 1H, 13, $J = 6,0$ Hz), 7,82 (d, 1H, 4, $J = 2,4$ Hz), 7,86-7,73 (m, 1H, 10), 7,49 (dd, 1H, 6, $J = 8,4, 2,4$ Hz), 7,47 (d, 1H, 6', $J = 3,6$ Hz), 7,29 (dd, 1H, 4', $J = 9,0, 2,4$ Hz), 6,82 (d, 1H, 3', $J = 9,6$ Hz), 6,75-6,70 (bs, 2H, 7'), 6,69 (d, 1H, 1, $J = 5,4$ Hz), 3,60 (q, 2H, 11), 3,55 (q, 2H, 12) ppm

^{13}C NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 162,5 (9'), 157,5 (8'), 151,5 (9), 148,0 (3), 146,0 (2'), 134,5 (5), 134,7 (4'), 128,0 (6'), 127,0 (4), 125,0 (6), 124,7 (7), 133,5 (3'), 133,0 (8), 107,5 (1'), 106,0 (5'), 99,0 (1), 41,8 (11), 41,3 (12) ppm

3.6.2. Sinteza *N'*-[5-(2-amino-6-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]-*N*-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamina (6b)

Količina semikarbazida **5b**: 0,200 g (0,46 mmol)

Količina trifenilfosfina: 0,182 g (0,69 mmol)

Količina trietilamina: 0,256 mL (1,84 mmol)

Količina tetraklorugljika: 0,055 mL (0,74 mmol, 1,6 ekvivalenata)

Dobiveni ostatak pročišćen je brzom kromatografijom na koloni koristeći gradijentnu eluaciju (Interchim, 12 g 15 μm SiO₂ kolona, slabi eluens: DCM, jaki eluens: MeOH, 0 \rightarrow 17 % jakog eluensa). Dobivena frakcija je uparena do suha pod sniženim tlakom te je ostatak trituiran s 5 mL metanola, odsisan i osušen.

Iskorištenje: 0,043 g (23 %)

MS (m/z) 415,12 (M+1)⁺

^1H NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 8,68-8,58 (bs, 1H, 13), 8,50 (d, 1H, 2, $J = 6,6$ Hz), 8,41 (d, 1H, 7, $J = 8,4$ Hz), 8,01 (t, 1H, 10, $J = 5,4$ Hz), 7,89 (s, 1H, 4), 7,62 (d, 1H, 6, $J = 9,0$ Hz), 7,14 (t, 1H, 4', $J = 7,8$ Hz), 6,82 (d, 1H, 1, $J = 7,2$ Hz), 6,75 (d, 1H, 5', $J = 9,0$ Hz), 6,66 (d, 1H, 3', $J = 8,4$ Hz), 6,22-6,12 (bs, 2H, 7'), 3,7 (q, 2H, 12, $J = 3,6$ Hz), 3,55 (q, 2H, 11, $J = 3,5$ Hz) ppm

^{13}C NMR (600 MHz, DMSO- d_6): δ 163,4 (8'), 154,4 (9'), 150,3 (1'), 148,0 (2'), 136,5 (5), 133,1 (6'), 132,3 (4'), 126,1 (6), 125,5 (7), 123,5 (4), 117,0 (3'), 116,9 (3??), 114,6 (5'), 106,1 (2'), 99,1 (1), 42,4 (12), 41,4 (11) ppm

3.6.3. Sinteza *N'*-[5-(2-aminofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]-*N*-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamina (6c)

Količina semikarbazida **5c**: 0,160 g (0,40 mmol)

Količina trifenilfosfina: 0,158 g (0,60 mmol)

Količina trietilamina: 0,225 mL (1,60 mmol)

Količina tetraklorugljika: 0,048 mL (0,64 mmol, 1,6 ekvivalenata)

Nakon 18 h miješanja dodano je još 0,053 g (0,151 mmol) trifenilfosfina te se suspenzija nastavila miješati još 3 dana. Organski sloj je uparen do suha pod sniženim tlakom te je dobiveno 0,314 g sirovog produkta u obliku svijetložute pjene. Sirovi produkt (0,050 g) pročišćen je preparativnom tankoslojnom kromatografijom na PTLC ploči tvrtke Merck, koristeći DCM:MeOH (90:10) kao pokretnu fazu. Tako je dobiveno 0,012 g spoja **6c**. Preostali sirovi produkt pročišćen je brzom kromatografijom na koloni koristeći gradijentnu eluciju (Interchim, 12 g 15 μ m SiO₂ kolona, slabi eluens: DCM, jaki eluens: MeOH, 0 \rightarrow 10 % jakog eluensa). Dobivena frakcija je uparena do suha pod sniženim tlakom te je ostatak trituiran s 5 mL metanola, odsisan i osušen.

Iskorištenje: 0,039 g (31 %)

MS(*m/z*) 380,93 (M+1)⁺

t_i 219 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,43 (d, 1H, 2, *J* = 6,0 Hz), 8,22 (d, 1H, 7, *J* = 9,6 Hz), 7,92 (t, 1H, 13, *J* = 5,4 Hz), 7,79 (d, 1H, 4, *J* = 4,2 Hz), 7,52 (t, 1H, 10, *J* = 5,4 Hz), 7,45 (dd, 1H, 6, *J* = 4,2 Hz, 2,4 Hz), 7,38 (dd, 1H, 6', *J* = 7,5, 1,2 Hz), 7,16 (dt, 1H, 4', *J* = 7,8, 1,8 Hz), 6,83 (d, 1H, 3', *J* = 4,2 Hz), 6,64 (d, 1H, 1, *J* = 3,0 Hz), 6,60 (t, 1H, 5', *J* = 7,2 Hz), 6,58-6,52 (bs, 2H, 7'), 3,55 (m, 4H, 11 i 12) ppm

¹³C NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 162,5 (9'), 158,7 (8'), 152,3 (2), 150,6 (9), 149,5 (3), 147,2 (2'), 133,9 (5), 131,4 (4'), 127,9 (4), 126,6 (6'), 124,6 (6), 124,5 (7), 118,0 (8), 115,9 (3'), 115,8 (5), 105,6 (1'), 99,1 (1), 41,9 (11), 41,3 (12) ppm

3.6.4. Sinteza *N'*-[5-(2-amino-4-klorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]-*N*-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamina (6d**)**

Količina semikarbazida **5d**: 0,230 g (0,53 mmol)

Količina trifenilfosfina: 0,209 g (0,797 mmol)

Količina trietilamina: 0,295 mL (2,12 mmol)

Količina tetraklorugljika: 0,120 mL (1,16 mmol, 2,2 ekvivalenata)

Dobiveni ostatak pročišćen je brzom kromatografijom na koloni koristeći gradijentnu eluciju (Interchim, 12 g 15 μ m SiO₂ kolona, slabi eluens: DCM, jaki eluens: MeOH, 0 \rightarrow 20 % jakog eluensa). Dobivena frakcija je uparena do suha pod sniženim tlakom te je ostatak trituiran s 5 mL metanola, odsisan i osušen.

Iskorištenje: 0,056 g (25 %)

MS(*m/z*) 414,89 (M+1)⁺

t_i 208 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,42 (d, 1H, 2, *J* = 5,4 Hz), 8,20 (d, 1H, 7, *J* = 9,6 Hz), 7,97 (t, 1H, 13, *J* = 5,4 Hz), 7,78 (d, 1H, 4, *J* = 1,8 Hz), 7,46 (t, 1H, 10), 7,45 (dd, 1H, 6, *J* = 9,6, 2,4 Hz), 7,34 (d, 1H, 6', *J* = 9,0 Hz), 6,89 (d, 1H, 3', *J* = 2,4 Hz), 6,83-6,78 (bs, 2H, 7'), 6,62 (m, 2H, 1 i 5'), 3,54 (m, 4H, 11 i 12) ppm

¹³C NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 162,6 (8'), 157,9 (9'), 152,4 (2), 150,5 (2'), 148,6 (9), 148,2 (3), 135,7 (4'), 133,9 (5), 128,2 (5'), 128,0 (4), 124,6 (6), 124,5 (7), 118,0 (8), 115,6 (3'), 114,8 (6'), 104,6 (1'), 99,1 (1), 41,8 (12), 41,2 (11) ppm

3.6.5. Sinteza *N'*-[5-(2-amino-6-fluorofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]-*N*-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamina (6e)

Količina semikarbazida **5e**: 0,185 g (0,44 mmol)

Količina trifenilfosfina: 0,231 g (0,88 mmol)

Količina trietilamina: 0,246 mL (1,78 mmol)

Količina tetraklorugljika: 0,053 mL (0,71 mmol, 1,6 ekvivalenata)

Dobiveni ostatak pročišćen je brzom kromatografijom na koloni koristeći gradijentnu eluciju (Interchim, 12 g 15 μm SiO₂ kolona, slabi eluens: DCM, jaki eluens: MeOH, 0 → 20 % jakog eluensa). Dobivena frakcija je uparena do suha pod sniženim tlakom te je ostatak trituiran s 2 mL metanola, odsisan i osušen.

Iskorištenje: 0,032 g (18 %)

MS(*m/z*) 399,16 (M+1)⁺

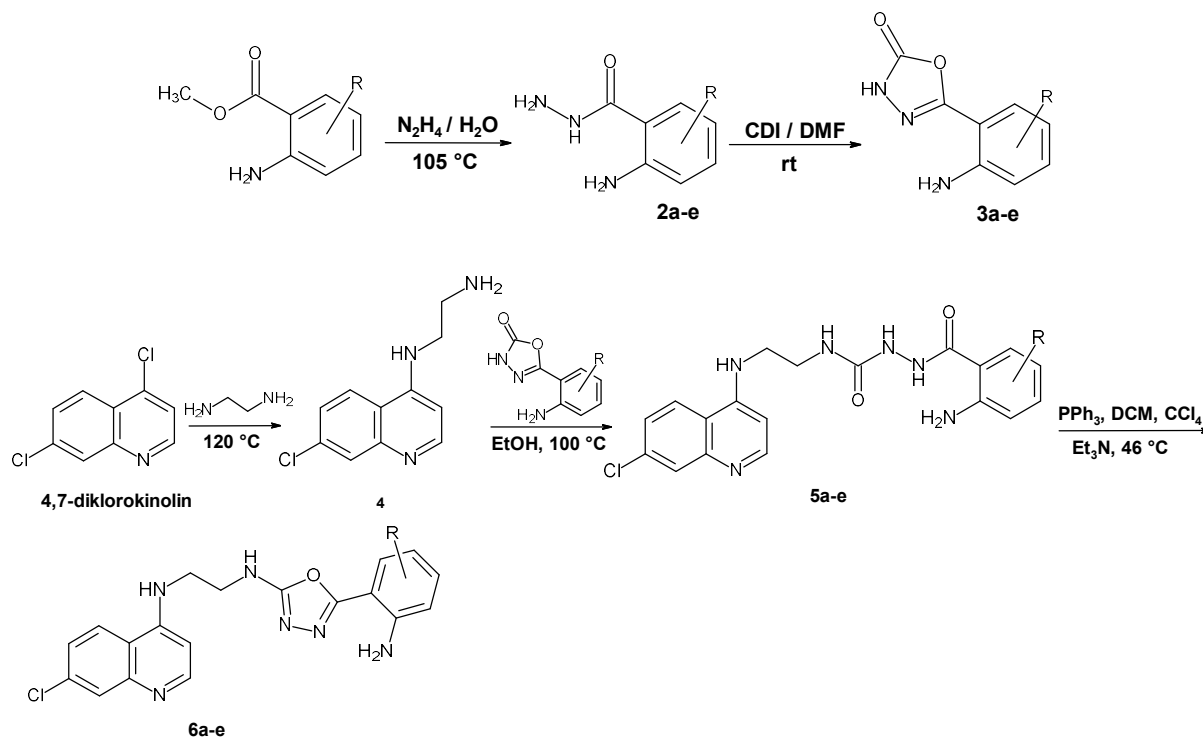
t_i 191 °C

¹H NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 8,46 (d, 1H, 2, *J* = 10,8 Hz), 8,30 (d, 1H, 7, *J* = 9,6 Hz), 8,04 (t, 1H, 13, *J* = 7,2 Hz), 8,03-7,93 (bs, 1H, 10), 7,83 (d, 1H, 4, *J* = 2,4 Hz), 7,53 (dd, 1H, 6, *J* = 8,4, 1,8 Hz), 7,15 (q, 1H, 4', *J* = 7,2 Hz), 6,85 (s, 2H, 7'), 6,71 (d, 1H, 1, *J* = 5,4 Hz), 6,60 (d, 1H, 5', *J* = 8,4 Hz), 6,41 (m, 1H, 3', *J* = 3,6 Hz), 3,63 (q, 2H, 10), 3,53 (q, 2H, 13) ppm

¹³C NMR (600 MHz, DMSO-*d*₆): δ 163,1 (9'), 161,2 (6'), 159,5 (2'), 151,9 (9), 150,2 (2), 149,4 (8'), 147,0 (3), 135,0 (5), 132,0 (d, 4', *J* = 46,2 Hz), 125,9 (4), 125,3 (6), 124,9 (7), 117,5 (8'), 111,7 (3'), 101,9 (d, 5', *J* = 87,6 Hz), 99,1 (1), 95,1 (d, 1', *J* = 60 Hz), 42,0 (11), 41,3 (12) ppm

4. REZULTATI I RASPRAVA

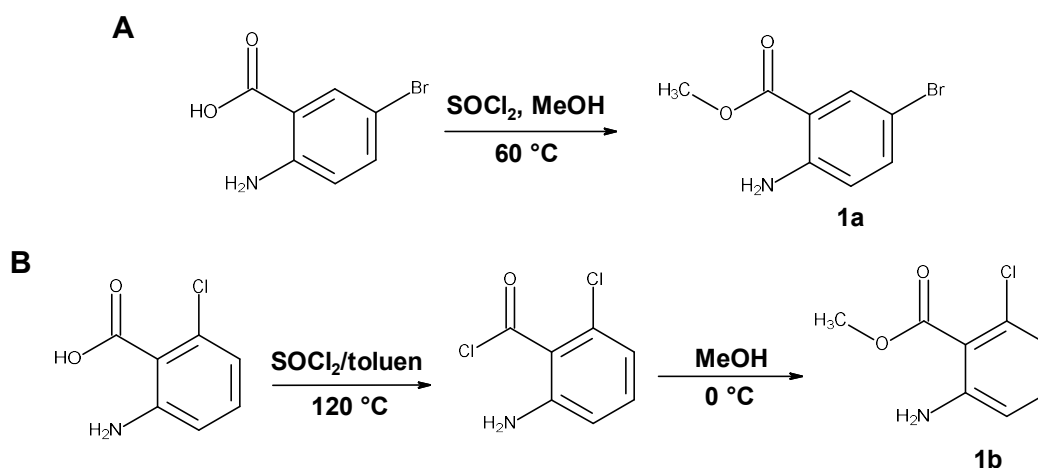
Ciljni spojevi sintetizirani u sklopu ovog rada novi su hibridi derivata antranilne kiseline i 4-amino-7-klorokinolina (Slika 8.). 1,3,4-Oksadiazol služi kao poveznica između ovih dvaju molekulskih motiva.



Slika 8. Sinteza novih hibrida derivata antranilne kiseline i 4-amino-7-klorokinolina **6a-e** priređenih u sklopu ovog rada.

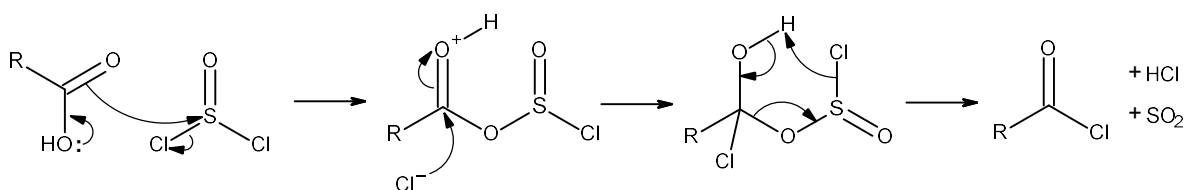
	a	b	c	d	e
R	Br (C5')	Cl (C6')	H	Cl (C4')	F (C6')

Početni spojevi u sintezi željenih produkata **6a-e** bili su metilni esteri derivata antranilne kiseline. Polazni spojevi korišteni u sintezi spojeva **6a** i **6b** u seriji, komercijalno su bili dostupni kao kiseline, te su, u svrhu nastavljanja zajedničkim sintetskim putem, prevedeni u pripadajuće metilne estere (Slika 9.). Postupak sinteze metilnih estera preuzet je i prilagođen po uzoru na rad El-Azzouny i suradnika (El-Azzouny i sur., 2003)



Slika 9. Sinteze metilnih estera **1a** (A) i **1b** (B) iz odgovarajućih karboksilnih kiselina

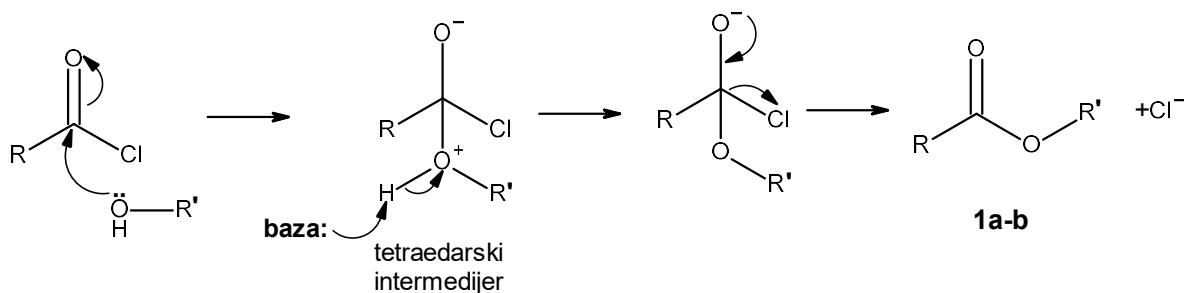
Kiselinski derivat uspješno je preveden u ester **1a** reakcijom u jednom koraku, bez izolacije intermedijera (Slika 9.A). U sintezi estera **1b** ista metoda nije davala zadovoljavajuć prinos te je stoga sintetiziran u dva odvojena koraka (Slika 9.B).



Slika 10. Mehanizam prevođenja karboksilne kiseline u kiselinski klorid

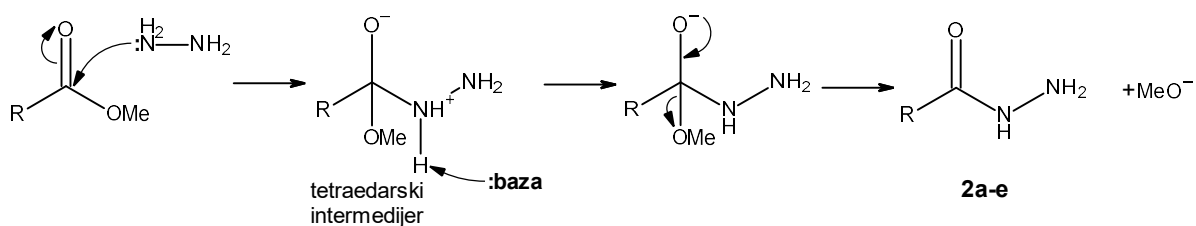
Za sintezu metilnog estera derivata antranilne kiseline potrebno je izmijeniti „lošu“ izlaznu skupinu HO⁻ s kloridnom skupinom. Karbonilni kisik je nukleofilniji od hidroksilnog te napada atom sumpora, pri čemu kloridni ion napušta spoj. Formirani anion u stanju je deprotonirati nastali spoj, tvoreći nestabilan intermedijer s kojim se nalazi u dinamičkoj ravnoteži (nestabilni intermedijer nije prikazan na slici). Nukleofilnim napadom kloridnog iona na karbonilni kisik formira se tetraedarski intermedijer, koji se urušava na način prikazan na slici, ireverzibilno oslobađajući plinove HCl i SO₂ (Clayden i sur., 2012)

. Ovo je sporiji korak te se izvodi pri povišenoj temperaturi. Za dobivanje kiselinskog klorida prevedenog u spoj **1b** reakcija je izvedena prema protokolu pri temperaturi 120 °C, koristeći toluen kao otapalo.



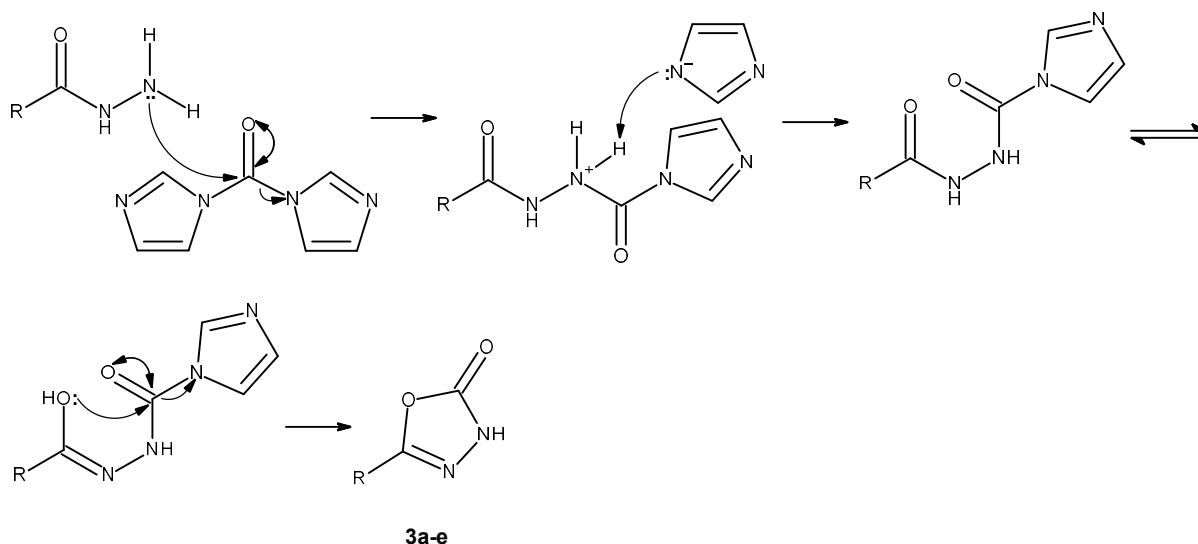
Slika 11. Mehanizam prevođenja kiselinskog klorida u alkilni ester

Sljedeći korak započinje adicijom alkohola na karbonilni ugljik, formirajući tetraedarski intermedijer. Bazični spoj u otopini uklanja kiseli proton. Iako je metanol dodan u suvišku te istovremeno služi kao otapalo i nukleofilni reagens, pretpostavlja se da aromatska amino-skupina iz derivata antranilne kiseline barem dijelom služi kao baza. Kloridni ion zatim napušta intermedijer, te ugljik ponovno poprima sp^2 hibridiziranu, planarnu konfiguraciju dajući ester kao produkt (Clayden i sur., 2012). Za dobivanje spoja **1a** reaktanti su refluksirani u metanolu pri 60 °C. Ovakva metoda veoma je poželjna, budući da izostavlja nužan međukorak uparavanja otapala sa zaostalim klorovodikom te koristi značajno blaže uvjete.



Slika 12. Mehanizam sinteze hidrazida iz metilnog estera

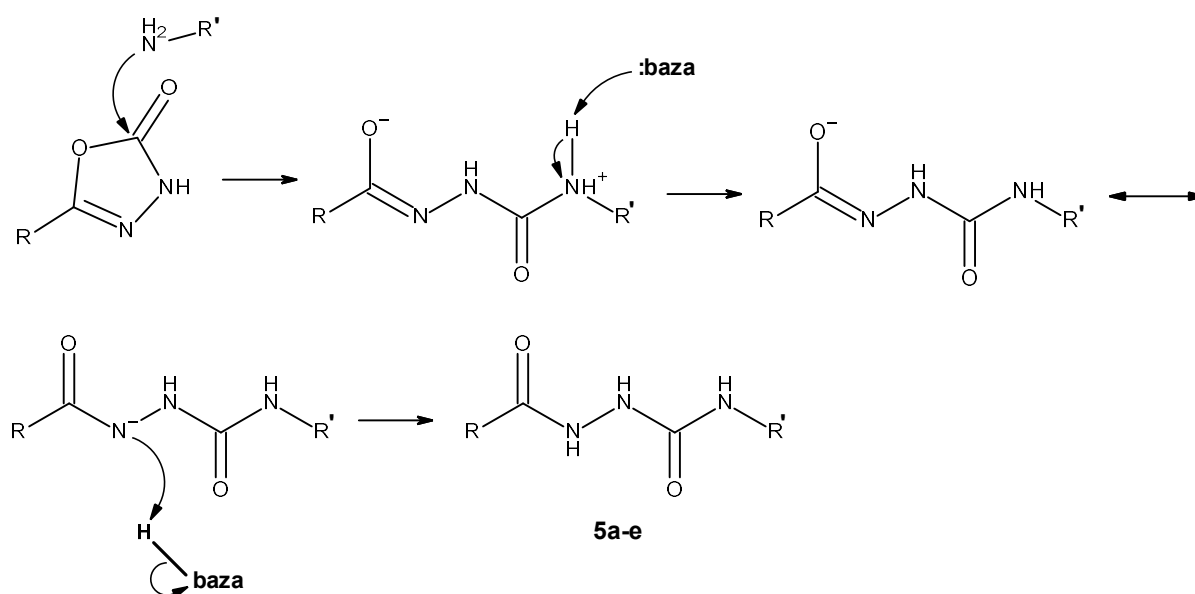
Sinteza hidrazida također je nukleofilna supstitucija na nezasićenom ugljikovom atomu te se odvija prema mehanizmu opisanom u prethodnom reakcijskom koraku. Metoksidni anion lakše napušta tetraedarski intermedijer nego $^- \text{NHNH}_2$ anion, budući da je kao slabija baza znatno stabilniji. Hidrazin je dodan u suvišku te je tako upotrijebljen i kao baza. Eksperimentalni uvjeti uključuju otopinu hidrazina u vodi grijanu na 105 °C, a voda kao slabiji nukleofil ne može tvoriti kiselinu kao neželjeni produkt (El-Azzouny i sur., 2003).



Slika 13. Mehanizam sinteze 3-*H*-1,3,4-oksadiazol-2-onskog derivata pomoću CDI (Clayden i sur., 2012)

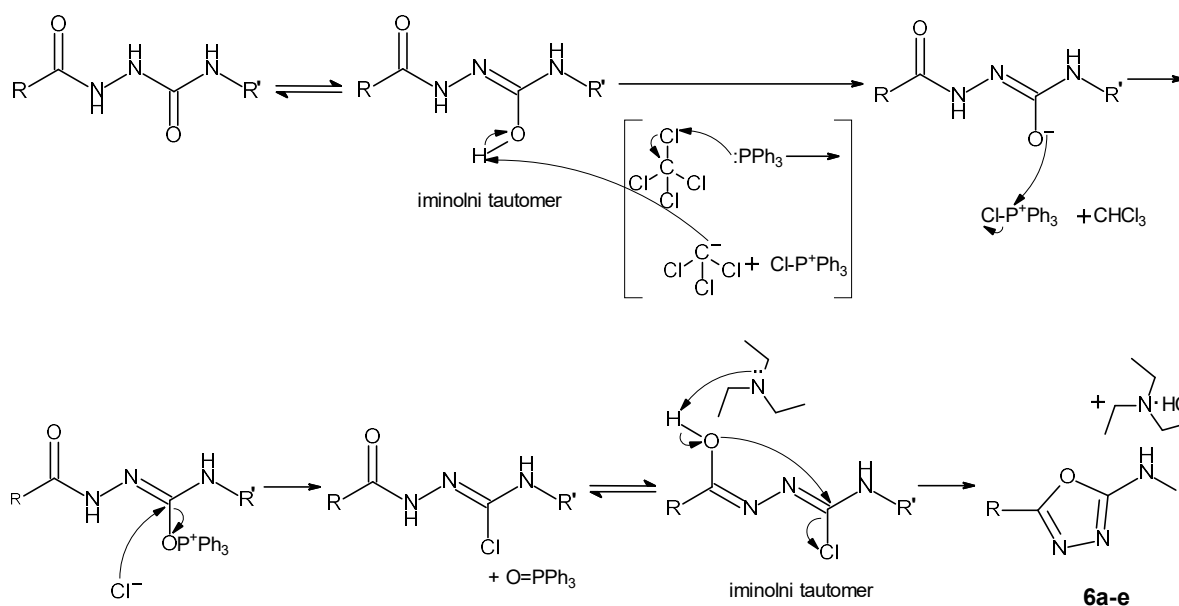
U sljedećem koraku u spoj je uveden novi atom ugljika. CDI se koristi kao dvostruki elektrofil, uz dva ekvivalenta imidazola kao izlazne skupine. Reagira istim mehanizmom kao i fozgen (COCl_2), dajući produkt u kojemu su dva nukleofilna atoma povezana karbonilnom skupinom. Zbog svojeg povoljnijeg sigurnosnog profila, preferira se upotreba CDI. Reakcija je provedena pri sobnoj temperaturi, koristeći DMF kao otapalo (Biwersi i sur., 2004).

Reakcija sinteze kinolinskog derivata 4 je nukleofilna aromatska supstitucija. Produkt ove reakcije drugi je građevni element u reakciji s priređenim 3-*H*-1,3,4-oksadiazol-2-onskim derivatom antranilne kiseline. Reakcija je provedena pri temperaturi 80 °C, kasnije povišenoj na 120 °C, te nukleofil etilendiamin istovremeno služi i kao otapalo. Budući da je dodan u suvišku te da je topljiviji u vodi od dobivenog produkta, preostali etilendiamin se lako isprao vodom pri obradi reakcijske smjese, dajući čist produkt.



Slika 14. Mehanizam sinteze 1,4-disupstituiranog semikarbazida napadom amina na 3-*H*-1,3,4-oksadiazol-2-on

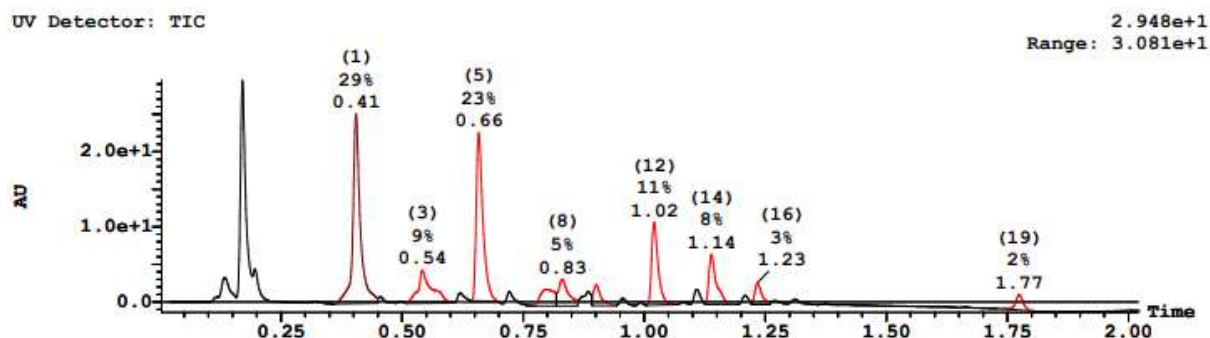
Napadom amina rastvara se prethodno formirani 3-*H*-1,3,4-oksadiazol-2-onski prsten. Reakcija je provedena u etanolu, koji dijelom može poslužiti kao akceptor protona, kao i primarni aromatski amin već prisutan u spojevima podrijetlom iz derivata antranilne kiseline. Kao što je vidljivo iz rezonantne strukture, atom dušika u semikarbazonском intermedijeru vrlo je bazičan i lako preuzima proton koji je baza prethodno vezala. Reakcija je provedena pri 100 °C (Biwarsi i sur., 2004).



Slika 15. Predloženi mehanizam sinteze 1,3,4-oksadiazola ciklizacijom 1,4-disupstituiranog semikarbazida

Prvi korak poslijednje reakcije obuhvaća deprotoniranje iminolnog tautomera 1,4-disupstituiranog semikarbazida nastalog u prethodnom reakcijskom koraku. Triphenilfosfin i tetraklorugljik, također prisutni u reakcijskoj posudi, međusobno reagiraju (triphenilfosfin kao permanentni dipol napada polarizabilni tetraklorugljik što dovodi do heterolitičkog kidanja C-Cl veze) dajući ionski par $\text{Cl-P}^+\text{Ph}_3$ i CCl_3^- , od kojih je potonji zaslužan za deprotonaciju spomenutog enolnog tautomera. Oslobađa se jedna molekula kloroforma te negativno nabijeni nukleofilni kisikov atom napada atom fosfora, što dovodi do oslobađanja kloridnog iona. Oslobođeni ion u sljedećem koraku napada elektrofilni ugljikov atom u reakciji nukleofilne supstitucije gdje je triphenilfosfin oksid izlazna skupina. Ovakva reakcija kloriranja naziva se i Appelova reakcija (Appel, 1975). Sljedeći korak obuhvaća tautomerizaciju druge karbonilne skupine. Trietilamin se smatra zaslužnim za deprotonaciju formiranog iminola te nukleofilni kisikov atom napada elektrofilni ugljikov atom. Kloridni ion napušta spoj te se on ciklizira u 1,3,4-oksadiazol. Vorbrüggen i Krolkiewicz opisali su reakciju ciklizacije koja se sastoji od sličnog niza koraka te se služi istim reagensima. Predloženi mehanizam ciklizacije napisan je po uzoru na njihov rad (Vorbrüggen i Krolkiewicz, 1993).

U svrhu postizanja kraćeg sintetskog postupka prilikom priređivanja hidrazidskog intermedijera **2b**, isproban je alternativni put amidacije u kojem se iz priređenog sirovog produkta kiselinskog klorida (sintetiziranog po uzoru na poglavlje **3.1.2.** i priređivanje intermedijera **1b**) dodavanjem 2,2 ekvivalenta hidrazin hidroklorida pri sobnoj temperaturi u bezvodnom kloroformu pokušao direktno proizvesti spoj **2b**. Reakcija je provedena u prisustvu 5 ekvivalenata Et_3N , baze čija je dvojaka funkcija bila oslobađanje hidrazina iz oblika soli u aktivni nukleofilni oblik te tvorba soli s oslobođenim klorovodikom (mehanizam reakcije je nukleofilna supstitucija, analogno mehanizmu prikazanom na Slici 12 u sklopu poglavlja Rezultati). Vrlo brzo nakon postavljanja reakcije snimljen je kromatogram koji je pokazao značajnu količinu neželjenih nusprodukata nastalih pri spomenutim uvjetima (Slika 16.). Kao što je u poglavlju **3.1.2.** opisano, esterifikacija kiselinskog klorida pri sniženoj se temperaturi događala trenutno, što govori u prilog izrazito visokoj reaktivnosti ovog intermedijera. Ovaj neuspjeli korak postavljen je s istim reagensima u ledenoj kupelji no nije pokazivao uspješnije rezultate (snimljeni kromatogram nije prikazan u ovom radu).



Slika 16. Kromatogram koji prikazuje degradaciju spojeva pri direktnoj amidaciji korištenjem kiselinskog klorida i hidrazin hidroklorida u prisustvu suviška baze Et_3N

U poglavlju **3.3.** nisu navedene čistoće produkata nastalih reakcijom s CDI budući da se dvominutne UPLC analize ne smatraju u potpunosti pouzdanim mjerilom za kvantitativnu analizu sastava uzorka. Na temelju njihovih ^1H spektara i dvominutnih UPLC analiza procijenjeno je čistoća spojeva **3a-e**, ovisno o pojedinom derivatu, iznosi između 70 % i 100 %. Međutim, kao što se vidi u koraku poglavlju **3.5.**, gotovo isključivo je korišten 1 ekvivalent amina za nukleofilni napad, računano u odnosu na masu spojeva **3a-e**, uz pretpostavku 100 %-tne čistoće. Takva odluka donesena je iz razloga što su spojevi **5a-e** pokazali svojstvo slabe topljivosti u etanolu te su se onečišćenja u vidu nusprodukata ili zaostalih reagensa razmjerno lako uklanjala filtriranjem i ispiranjem etanolom.

Od svih sintetskih koraka, postupak obrade reakcije opisan u poglavlju **3.3.** može se smatrati najmanje ujednačenim postupkom provedenim u sklopu ovog rada. Nepotpuno optimizirana obrada rezultirala je heterogenim rezultatima u vidu čistoće produkata i iskorištenja reakcija. Ponavljanje ekstrakcije postupak je koji nedvojbeno smanjuje iskorištenje reakcije ali je istovremeno nužno zbog uklanjanja onečišćenja i ostatnog DMF koji je korišten kao otapalo. U svrhu potpunijeg korištenja je i 10 % otopina LiCl kao vodena faza pri ekstrakciji, no ona je bila u stanju ukloniti samo dio zaostalog DMF koji se također vrlo teško uklanjao uparavanjem pri sniženim tlakom. Prostor za unaprjeđenje ovog koraka nalazi se najviše u pronalasku optimalnog postupka obrade reakcije, ali i najmanje moguće količine otapala koja bi bila dostatna za odvijanje reakcije.

Pripravljene su i karakterizirane sljedeći novi spojevi, koji do sada nisu opisani u literaturi:

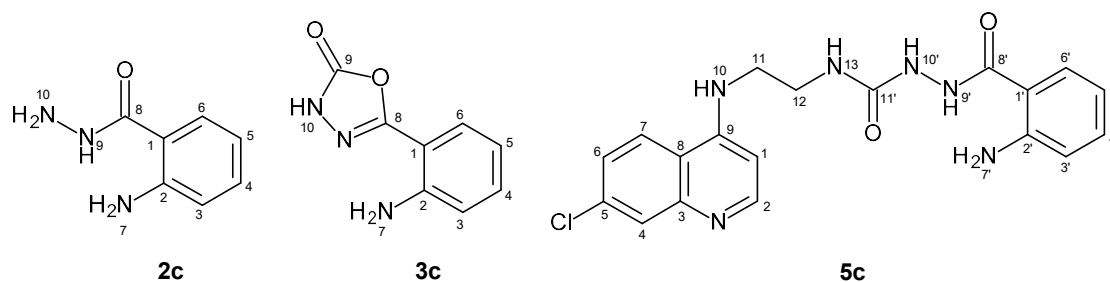
- *N*-[5-(2-amino-5-bromo-fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]-*N*-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamin (**6a**)
- *N*-[5-(2-amino-6-kloro-fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]-*N*-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamin (**6b**)
- *N*-[5-(2-aminofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]-*N*-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamin (**6c**)
- *N*-[5-(2-amino-5-kloro-fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]-*N*-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamin (**6d**)
- *N*-[5-(2-amino-6-fluoro-fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]-*N*-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamin (**6e**)

Svi sintetizirani spojevi pročišćeni su kromatografijom na koloni i/ili trituirani u metanolu (**6c-e**) odnosno diizopropil-eteru (**6a**). Njihove strukture potvrđene su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim metodama (^1H i ^{13}C NMR, MS) a čistoća im je potvrđena UPLC analizom.

Analitički i spektroskopski podaci nosintetiziranih spojeva **6a-e** dani su u tablicama 4 i 5, dok su kao primjeri intermedijera iz zajedničkog sintetskog puta spoja **6c** analitički i spektroskopski podaci dani u tablicama 2 i 3.

Tablica 2. Analitički i spektroskopski podaci intermedijera **2c**, **3c**, **5c** iz zajedničkog sintetskog puta

Spoj	Iskorištenje (%)	t_f (°C)	Molekulska formula	M_r	ESI-MS (m/z)
2c	55	121	C ₇ H ₉ N ₃ O	151,17	151,91 (M+1) ⁺
3c	-	-	C ₈ H ₇ N ₃ O ₂	177,16	177,85 (M+1) ⁺
5c	49	-	C ₁₉ H ₁₉ ClN ₆ O ₂	398,85	399,14 (M+1) ⁺

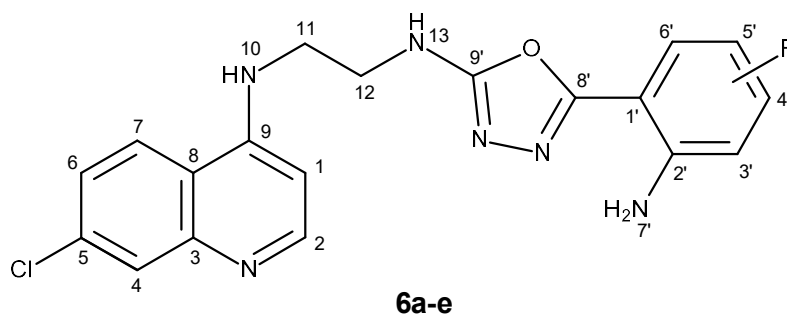


Tablica 3. Kemijski pomaci ¹H i ¹³C NMR spektara spojeva **2c**, **3c**, **5c**

Spoj	¹ H NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm, J /Hz)	¹³ C NMR (DMSO- <i>d</i> ₆ , δ ppm, J /Hz)
2c	9,51-9,36 (bs, 1H, 9), 7,41 (d, 1H, 6, J = 7,8 Hz), 7,11 (t, 1H, 4, J = 7,7 Hz), 6,8 (d, 1H, 3, J = 8,3 Hz), 6,47 (t, 1H, 5, J = 7,5 Hz), 6,40-6,23 (bs, 2H, 7), 4,45-4,24 (bs, 2H, 10)	168,5 (8), 149,3 (2), 131,5 (4), 127,6 (6), 116,2 (3), 114,6 (5), 113,7 (1)
3c	12,70-12,27 (bs, 1H, 10), 7,44 (dd, 1H, 6, J = 8,0, 1,6 Hz), 7,21 (dt, 1H, 4, J = 7,2, 1,6 Hz), 6,84 (dd, 1H, 3, J = 8,4, 0,8 Hz), 6,64 (t, 1H, 5, J = 7,2, 1,2), 6,37-6,22 (bs, 2H, 7)	154,6 (8), 153,6 (9), 146,9 (2), 131,8 (4), 126,7 (6), 115,8 (3), 115,5 (5), 104,5 (1)
5c	9,93-9,72 (bs, 1H, 9'), 8,40 (d, 1H, 2, J = 5,2 Hz), 8,16 (d, 1H, 7, J = 8,8 Hz), 8,05-7,92 (bs, 1H, 10'), 7,79 (d, 1H, 4, J = 2,8 Hz), 7,60 (d, 1H, 6', J = 8,4 Hz), 7,43 (dd, 1H, 6', J = 10,4, 2,4 Hz), 7,48-7,36 (m, 1H, 10), 7,18 (dt, 1H, 4', J = 8,4, 1,2 Hz), 6,86-6,75 (bs, 1H, 13), 6,72 (d, 1H, 3', J = 6 Hz), 6,57 (d, 1H, 1, J = 5,6 Hz), 6,51 (t, 1H, 5', J = 7,6 Hz), 6,44-6,32 (bs, 2H, 7'), 3,40-3,25 (m, 4H, 11 i 12)	168,9 (8'), 159,3 (11'), 152,0 (2), 150,1 (9), 150,0 (3), 149,0 (2'), 133,4 (5), 132,2 (4'), 128,4 (4), 127,5 (6'), 124,1 (6), 123,9 (7), 117,3 (8), 116,3 (3'), 114,4 (5'), 112,4 (1'), 98,6 (1), 43,3 (12), 37,8 (11)

Tablica 4. Analitički i spektroskopski podaci novosintetiziranih oksadiazolskih derivata **6a-e**

Spoj	R	Iskorištenje (%)	t_r (°C)	Molekulska formula	M_r	ESI-MS (m/z) ⁺
6a	Br (C5')	-	213	C ₁₉ H ₁₆ BrClN ₆ O	459,73	461,0 (M+1) ⁺
6b	Cl (C6')	23	-	C ₁₉ H ₁₆ Cl ₂ N ₆ O	415,28	415,12 (M+1) ⁺
6c	H	31	219	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₆ O	380,83	380,93 (M+1) ⁺
6d	Cl (C4')	25	208	C ₁₉ H ₁₆ Cl ₂ N ₆ O	415,28	414,89 (M+1) ⁺
6e	F (C6')	18	191	C ₁₉ H ₁₆ ClFN ₆ O	398,82	399,16 (M+1) ⁺



Tablica 5. Kemijski pomaci ^1H i ^{13}C NMR spektara spojeva **6a-e**

Spoj	R	^1H NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)	^{13}C NMR (DMSO- d_6 , δ ppm, J/Hz)
6a	Br (C5')	8,46 (d, 1H, 2, $J = 6,6$ Hz), 8,26 (d, 1H, 7, $J = 9,6$ Hz), 8,00 (t, 1H, 13, $J = 6,0$ Hz), 7,82 (d, 1H, 4, $J = 2,4$ Hz), 7,86-7,73 (m, 1H, 10), 7,49 (dd, 1H, 6, $J = 8,4, 2,4$ Hz), 7,47 (d, 1H, 6', $J = 3,6$ Hz), 7,29 (dd, 1H, 4', $J = 9,0, 2,4$ Hz), 6,82 (d, 1H, 3', $J = 9,6$ Hz), 6,75-6,70 (bs, 2H, 7'), 6,69 (d, 1H, 1, $J = 5,4$ Hz), 3,60 (q, 2H, 11), 3,55 (q, 2H, 12)	162,5 (9'), 157,5 (8'), 151,5 (9), 148,0 (3), 146,0 (2'), 134,5 (5), 134,7 (4'), 128,0 (6'), 127,0 (4), 125,0 (6), 124,7 (7), 133,5 (3'), 133,0 (8), 107,5 (1'), 106,0 (5'), 99,0 (1), 41,8 (11), 41,3 (12)
6b	Cl (C6')	8,68-8,58 (bs, 1H, 13), 8,50 (d, 1H, 2, $J = 6,6$ Hz), 8,41 (d, 1H, 7, $J = 8,4$ Hz), 8,01 (t, 1H, 10, $J = 5,4$ Hz), 7,89 (s, 1H, 4), 7,62 (d, 1H, 6, $J = 9,0$ Hz), 7,14 (t, 1H, 4', $J = 7,8$ Hz), 6,82 (d, 1H, 1, $J = 7,2$ Hz), 6,75 (d, 1H, 5', $J = 9,0$ Hz), 6,66 (d, 1H, 3', $J = 8,4$ Hz), 6,22-6,12 (bs, 2H, 7'), 3,7 (q, 2H, 12, $J = 3,6$ Hz), 3,55 (q, 2H, 11, $J = 3,5$ Hz)	163,4 (8'), 154,4 (9'), 150,3 (1'), 148,0 (2'), 136,5 (5), 133,1 (6'), 132,3 (4'), 126,1 (6), 125,5 (7), 123,5 (4), 117,0 (3'), 116,9 (3), 114,6 (5'), 106,1 (2'), 99,1 (1), 42,4 (12), 41,4 (11)
6c	H	8,43 (d, 1H, 2, $J = 6,0$ Hz), 8,22 (d, 1H, 7, $J = 9,6$ Hz), 7,92 (t, 1H, 13, $J = 5,4$ Hz), 7,79 (d, 1H, 4, $J = 4,2$ Hz), 7,52 (t, 1H, 10, $J = 5,4$ Hz), 7,45 (dd, 1H, 6, $J = 4,2$ Hz, 2,4 Hz), 7,38 (dd, 1H, 6', $J = 7,5, 1,2$ Hz), 7,16 (dt, 1H, 4', $J = 7,8, 1,8$ Hz), 6,83 (d, 1H, 3', $J = 4,2$ Hz), 6,64 (d, 1H, 1, $J = 3,0$ Hz), 6,60 (t, 1H, 5', $J = 7,2$ Hz), 6,58-6,52 (bs, 2H, 7'), 3,55 (m, 4H, 11&12)	162,5 (9'), 158,7 (8'), 152,3 (2), 150,6 (9), 149,5 (3), 147,2 (2'), 133,9 (5), 131,4 (4'), 127,9 (4), 126,6 (6'), 124,6 (6), 124,5 (7), 118,0 (8), 115,9 (3'), 115,8 (5), 105,6 (1'), 99,1 (1), 41,9 (11), 41,3 (12)
6d	Cl (C4')	8,42 (d, 1H, 2, $J = 5,4$ Hz), 8,20 (d, 1H, 7, $J = 9,6$ Hz), 7,97 (t, 1H, 13, $J = 5,4$ Hz), 7,78 (d, 1H, 4, $J = 1,8$ Hz), 7,46 (t, 1H, 10), 7,45 (dd, 1H, 6, $J = 9,6, 2,4$ Hz), 7,34 (d, 1H, 6', $J = 9,0$ Hz), 6,89 (d, 1H, 3', $J = 2,4$ Hz), 6,83-6,78 (bs, 2H, 7'), 6,62 (m, 2H, 1 i 5'), 3,54 (m, 4H, 11 i 12)	162,6 (8'), 157,9 (9'), 152,4 (2), 150,5 (2'), 148,6 (9), 148,2 (3), 135,7 (4'), 133,9 (5), 128,2 (5'), 128,0 (4), 124,6 (6), 124,5 (7), 118,0 (8), 115,6 (3'), 114,8 (6'), 104,6 (1'), 99,1 (1), 41,8 (12), 41,2 (11)
6e	F (C6')	8,46 (d, 1H, 2, $J = 10,8$ Hz), 8,30 (d, 1H, 7, $J = 9,6$ Hz), 8,04 (t, 1H, 13, $J = 7,2$ Hz), 8,03-7,93 (bs, 1H, 10), 7,83 (d, 1H, 4, $J = 2,4$ Hz), 7,53 (dd, 1H, 6, $J = 8,4, 1,8$ Hz), 7,15 (q, 1H, 4', $J = 7,2$ Hz), 6,85 (s, 2H, 7'), 6,71 (d, 1H, 1, $J = 5,4$ Hz), 6,60 (d, 1H, 5', $J = 8,4$ Hz), 6,41 (m, 1H, 3', $J = 3,6$ Hz), 3,63 (q, 2H, 10), 3,53 (q, 2H, 13)	163,1 (9'), 161,2 (6'), 159,5 (2'), 151,9 (9), 150,2 (2), 149,4 (8'), 147,0 (3), 135,0 (5), 132,0 (d, 4', $J = 46,2$ Hz), 125,9 (4), 125,3 (6), 124,9 (7), 117,5 (8'), 111,7 (3'), 101,9 (d, 5', $J = 87,6$ Hz), 99,1 (1), 95,1 (d, 1', $J = 60$ Hz), 42,0 (11), 41,3 (12)

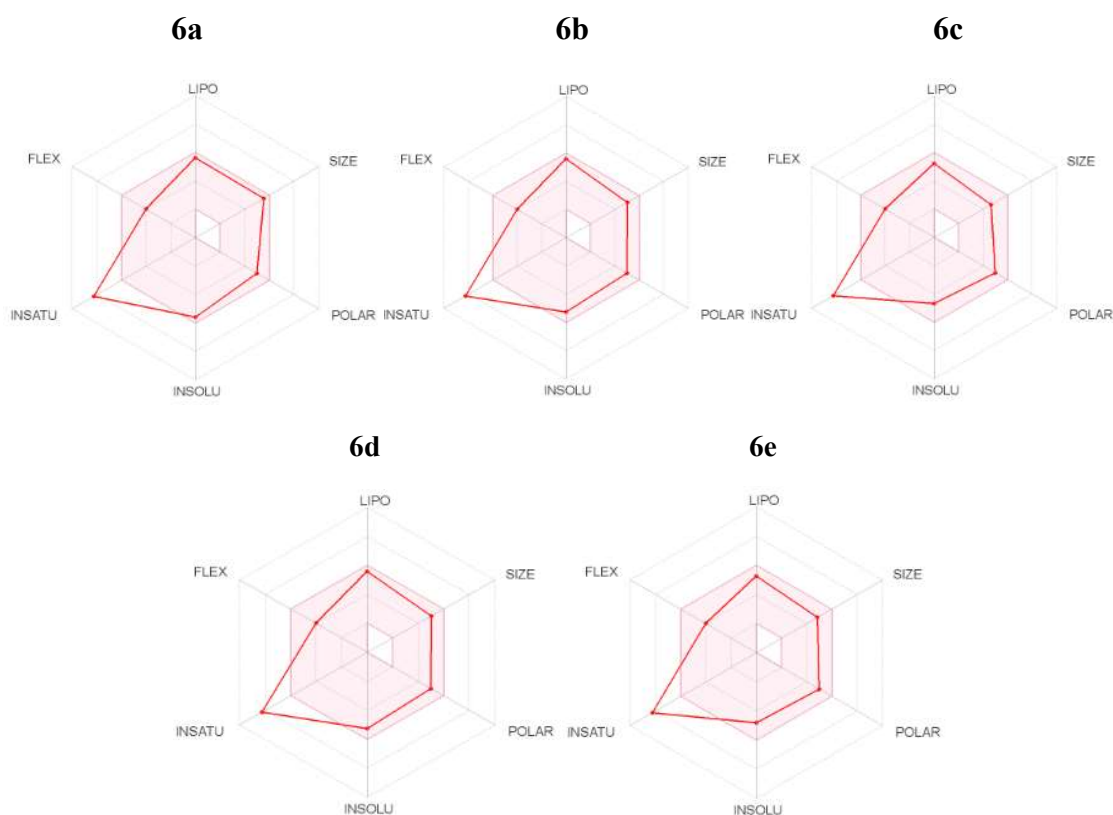
Besplatna *web* aplikacija SwissADME (<http://www.swissadme.ch>) upotrijebljena je za izračun fizičko-kemijskih deskriptora i predviđanje farmakokinetičkih parametara novosintetiziranih spojeva u sklopu ovog rada. Lipinski i suradnici u svojem revolucionarnom pregledu iz 1997. godine prikazali su skup eksperimentalnih i računalnih pristupa za procjenu topljivosti i permeabilnosti spojeva kandidata u razvoju lijekova. Važan doprinos ovog rada racionalnom dizajnu novih lijekova je „pravilo broja 5“ koje predviđa lošiju apsorpciju lijekova koji u svojoj strukturi imaju preko 5 donora vodikove veze, preko 10 akceptora vodikove veze, molekulsku masu preko 500, izračunatu vrijednost log P preko 5 (odnosno Moriguchi log P preko 4,15) (Lipinski i sur., 1997). Kao što je vidljivo iz tablice 6., nijedan od Lipinskijevih parametara nije prekoračen te bi spojevi u teoriji trebali imati zadovoljavajuće topljivosti i permeabilnosti. Veber i suradnici 2002. godine objavili su rad koji kritizira neke od zaključaka uklopljenih u „pravilo broja 5“ te opisuju svojstva molekula koja utječu na njihovu peroralnu bioraspoloživost. Tzv. „Veberova pravila“ predlažu da spojevi koji sadrže 10 ili manje rotirajućih veza, polarnu površinu manju od 140 Å (ili ukupno ≤ 12 donora i akceptora vodikove veze) imaju visoku vjerojatnost dobre oralne bioraspoloživosti u štakorima. Argumenti im se zasnivaju na tvrdnjama da vrijednost relativne molekulske mase 500 ne razdvaja značajno loše raspoložive spojeve od dobrih, da polarna površina bolje korelira s brzinom permeacije od logP vrijednosti te da broj rotirajućih veza negativno utječe na brzinu permeacije (Veber i sur., 2002). Priređeni spojevi zadovoljavaju i sva pravila koja su u svojem radu opisali Veber i suradnici.

Tablica 6. Pregled parametara izračunatih putem *web* aplikacije SwissADME

Spoj	6a	6b	6c	6d	6e
Molekulska formula	C ₁₉ H ₁₆ BrClN ₆ O	C ₁₉ H ₁₆ Cl ₂ N ₆ O	C ₁₉ H ₁₇ ClN ₆ O	C ₁₉ H ₁₆ Cl ₂ N ₆ O	C ₁₉ H ₁₆ ClFN ₆ O
<i>M_r</i>	459,73	415,28	380,83	415,28	398,82
log P ^a	3,67	3,59	3,05	3,57	3,33
Broj donora H - veze	3	3	3	3	3
Broj akceptora H - veze	4	4	4	4	4
Zbroj donora i akceptora H - veze	7	7	7	7	7
Broj rotirajućih veza	6	6	6	6	6
TPSA (Å ²)	102	102	102	102	102
Lipinskijeva pravila	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Veberova pravila	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3

^a U tablici je od višestrukog izbora vrijednosti log P dostupnih na *web* aplikaciji SwissADME upotrijebljena vrijednost zvana „Consensus Log P“ koja predstavlja prosječnu vrijednost petero dostupnih vrijednosti izračunatih različitim metodama, od kojih nijedna ne prelazi 5. Vrijednosti „Moriguchi Log P“ iznose 2,15 - 2,75.

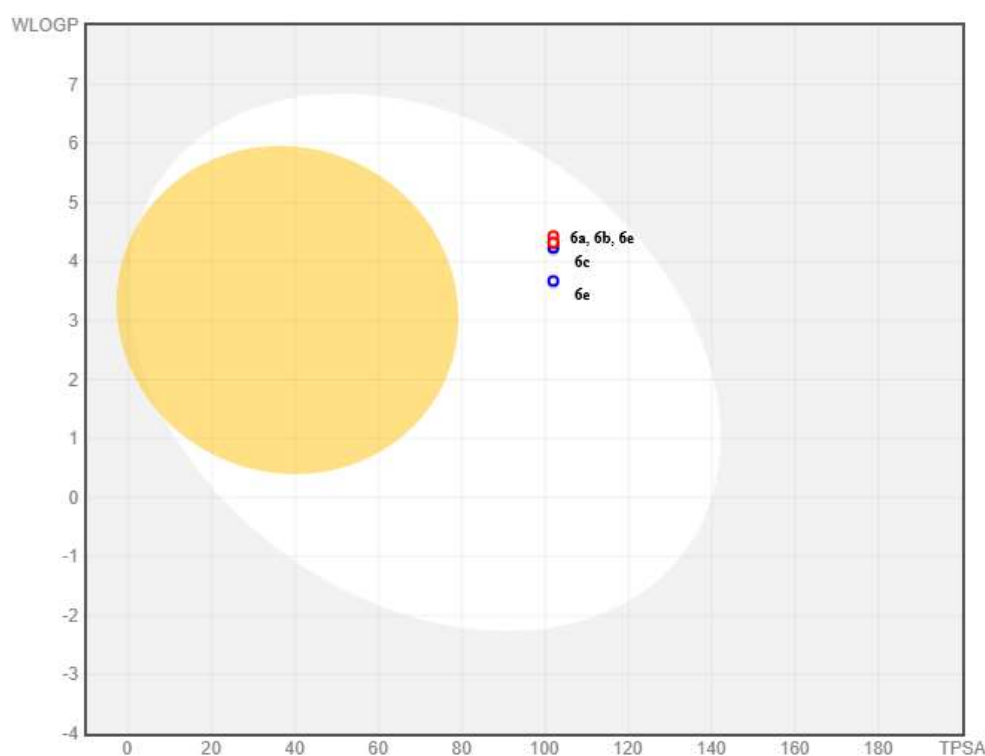
Bioavailability Radar jasan je grafički prikaz svojstava spojeva koji omogućuje jednostavnu procjenu prikladnosti šest fizičko-kemijskih parametara u kontekstu peroralne bioraspoloživosti ispitivanih spojeva (što definira svojstvo nazvano „sličnost lijekovima“ ili engl. „*drug-likeness*“) obuhvaćenih sa šest različitih osi: lipofilnost, veličina, polarnost, topljivost, fleksibilnost i zasićenost. Ružičasta zona predstavlja područje u kojem tzv. „radarski graf“ molekule mora u potpunosti upadati da bi se prema tim kriterijima smatrao „*drug-like*“. Lipofilnost je opisana određenim rasponom vrijednosti XLOGP3 -0,7-5,0, veličina rasponom molarnih masa 150-500 g/mol, polarnost rasponom TPSA 20-130 Å², netopljivost molekule negativnom vrijednošću molarne topljivosti po Delaneyjevoj topološkoj metodi (log S) kojoj je gornja granica 6, dok je nezasićenost kvantificirana udjelom *sp*³ hibridiziranih ugljikovih atoma te joj je donja granica 0,25. Fleksibilnost je izražena brojem rotirajućih veza koji u spojevima ne bi smio prelaziti 9 (Daina i sur., 2017). Na Slici 18 vidi se da sintetizirani spojevi zadovoljavaju 5 od 6 parametara, točnije da zbog svojeg značajnog udjela *sp*² hibridiziranih ugljikovih atoma spojevi **6a-e** imaju previsok stupanj nezasićenosti, što prema ovoj metodi prikaza predstavlja najveću prepreku ostvarivanju visoke peroralne bioraspoloživosti spojeva.



Slika 17. *Bioavailability radar* spojeva **6a-e** sintetiziranih u sklopu ovog rada

(preuzeto s <http://www.swissadme.ch>)

Još jedan od korisnih načina predviđanja farmakokinetičkih svojstava spojeva na temelju njihove kemijske strukture metoda je karakterističnog izgleda čije je ime poznatije pod kraticom BOILED (engl. *Brain Or IntestinaL EstimateD permeation method*) Egg. Predstavljen je kao točan model koji uključuje lipofilnost (prikazanu kao WLOGP na y-osi) i polarnost (prikazanu kao tPSA na x-osi, izraženu u Å²) malih molekula te predviđanja permeabilnosti moždane i intestinalne barijere bazirsa na vrijednostima tih dvaju parametara, prevodeći ih u jasan grafički prikaz. Bijela regija je fizičko-kemijski prostor molekula s visokom vjerojatnošću gastrointestinalne apsorpcije, a žuta regija („žumanjak“) je fizičko-kemijski prostor molekula s visokom vjerojatnošću permeacije krvno-moždane barijere (Daina i Zoete, 2016). Izračuni za spojeve **6a-e** grafički su prikazani na Slici 19. Kao što je vidljivo, svi sintetizirani spojevi nalaze se u „poželjnoj“ regiji u kojoj istovremeno obećavaju dobru pasivnu gastrointestinalnu apsorpciju i nisku vjerojatnost prolaska kroz krvno-moždanu barijeru. Obojenje točke na dijagramu govori o tome bi li spoj prema modelu trebao biti supstrat P-glikoproteina (plavo obojenje imaju predviđeni supstrati, dok su ostali spojevi obojeni crveno). Spojevi **6a**, **6b** i **6d** nisu predviđeni kao supstrati P-glikoproteina, dok spojevi **6c** i **6e** jesu¹.



Slika 18. BOILED-Egg prikaz spojeva **6a-e** sintetiziranih u sklopu ovog rada (preuzeto s <http://www.swissadme.ch>).

¹ Zbog bliskih vrijednosti WLog P točke generirane u *web* aplikaciji djelomično su preklapljene te ih u sklopu aplikacije nije bilo moguće odvojiti

5. ZAKLJUČCI

U sklopu ovog rada opisana je sinteza novih hibridnih spojeva - derivata antranilne kiseline i 7-kloro-4-aminokinolina povezanih 1,3,4-oksadiazolom.

Pripremljeni su i karakterizirani sljedeći novi spojevi, koji do sada nisu opisani u literaturi:

- *N*'-[5-(2-amino-5-bromo-fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]-*N*-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamin (**6a**)
- *N*'-[5-(2-amino-6-kloro-fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]-*N*-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamin (**6b**)
- *N*'-[5-(2-aminofenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]-*N*-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamin (**6c**)
- *N*'-[5-(2-amino-5-kloro-fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]-*N*-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamin (**6d**)
- *N*'-[5-(2-amino-6-fluoro-fenil)-1,3,4-oksadiazol-2-il]-*N*-(7-kloro-4-kinolil)etan-1,2-diamin (**6e**)

Prekursori za sintezu navedenih spojeva korišteni kao građevni elementi također su sintetizirani, a to su 1,4-disupstituirani semikarbazidi **5a-e**, 3-*H*-1,3,4-oksadiazol-2-onski derivati **3a-e**, te hidrazidi derivata antranilne kiseline **2a-e** koji su priređeni iz pripadajućih metilnih estera derivata antranilne kiseline. Metilni esteri derivata antranilne kiseline **1a** i **1b** sintetizirani su iz pripadajućih derivata antranilne kiseline, dok su preostala tri metilna estera bila komercijalno dostupna. Aminokinolinski derivat **4** priređen je iz 4,7-diklorokinolina.

Svim novosintetiziranim spojevima strukture su potvrđene uobičajenim spektroskopskim i analitičkim tehnikama (¹H i ¹³C NMR i MS), čistoće su im određene UPLC metodom uz UV-Vis i masenu detekciju te je dijelu spojeva talište određeno korištenjem diferencijalne pretražne kalorimetrije.

Spojevima **6a-e** računski su predviđeni farmakokinetički parametri poput peroralne bioraspodivnosti, prolaska kroz krvno-moždanu barijeru te transporta vezanjem za P-glikoprotein na temelju njihove kemijske strukture iz koje su izvedena njihova fizičko-kemijska svojstva.

U daljnjim istraživanjima koja izlaze iz okvira ovog rada novosintetiziranim spojevima **6a-e** bit će ispitano biološko djelovanje.

6. LITERATURA

Appel, R. Tertiary Phosphane/Tetrachloromethane, a Versatile Reagent for Chlorination, Dehydration, and P-N Linkage. *Angew Chem int Ed Engl*, 1975, 14, 801–811.

Biggest Threats and Data, 2019 AR Threats Report. <http://www.cdc.gov>, pristupljeno 22. 6. 2021.

Biwersi CM, Warmus JS, Zhang LY, Barrett SD, Kaufman MD, Plummer MS Reed JE. 2004. US Patent C07D 271/113.

Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol*, 2015, 13, 42–51.

Blass BE. Basic Principles of Drug Discovery and Development, Elsevier, 2015, 1-30.

Brackman G, Cos P, Maes L, Nelis HJ, Coenye T. Quorum sensing inhibitors increase the susceptibility of bacterial biofilms to antibiotics in vitro and in vivo, *Antimicrob Agents Chemother*, 2011, 55, 2655–2661.

Brownstein DG, Johnson E. Experimental Nasal Infection of Normal and Leukopenic Mice with *Pseudomonas aeruginosa*. *Vet Pathol*, 1982, 19, 169–178.

Cai H, Huang X, Xu S, Shen H, Zhang P, Huang Y, Jiang J, Sun Y, Jiang B, Yao H, Xu J. Discovery of novel hybrids of diaryl-1,2,4-triazoles and caffeic acid as dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase for cancer therapy. *Eur J Med Chem*, 2016, 108, 89–103.

Casadevall A, Pirofski L. Host-pathogen interactions: The attributes of virulence. *J. Infect. Dis.*, 2001, 184, 337–344.

Chung PY, Bian ZX, Pun HY, Chan D, Chan ASC, Chui CH, Tang JCO, Lam KH. Recent advances in research of natural and synthetic bioactive quinolines. *Future Med Chem*, 2015, 7, 947–967.

Clayden J, Greeves N, Warren S. Organic Chemistry. Second Edition. *Oxford Univ Press*, 2012, 199-215, 514-520, 742.

Daina A, Michielin O, Zoete V. SwissADME: A free web tool to evaluate pharmacokinetics, drug-likeness and medicinal chemistry friendliness of small molecules. *Sci Rep*, 2017, 7, 1–13.

Daina A, Zoete V. A BOILED-Egg To Predict Gastrointestinal Absorption and Brain Penetration of Small Molecules. *ChemMedChem*, 2016, 1117–1121.

El-Azzounyl AA, Maklad YA, Bartsch H, Zaghary WA, Ibrahim WM, Mohamed MS. Synthesis and Pharmacological Evaluation of Fenamate Analogues: 1,3,4-Oxadiazol-2-ones and 1,3,4-Oxadiazole-2-thiones. *Sci. Pharm.*, 2003, 71, 331–356.

Ilangovan A, Fletcher M, Rampioni G, Pustelny C, Rumbaugh K, Heeb S, Cámara M, Truman A, Chhabra SR, Emsley J, Williams P. Structural Basis for Native Agonist and Synthetic Inhibitor Recognition by the *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Regulator PqsR (MvfR). *PLoS Pathog*, 2013, 9.

Kalia VC. Quorum sensing inhibitors: An overview. *Biotechnol Adv*, 2013, 31, 224–245.

Kutty SK, Barraud N, Ho KKK, Iskander GM, Griffith R, Rice SA, Bhadbhade M, Willcox MDP, Black DS, Kumar N. Hybrids of acylated homoserine lactone and nitric oxide donors as inhibitors of quorum sensing and virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa*. *Org Biomol Chem*, 2015, 13, 9850–9861.

Lee J, Zhang L. The hierarchy quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*, 2015, 6, 26–41.

Lesic B, Lépine F, Déziel E, Zhang J, Zhang Q, Padfield K, Castonguay MH, Milot S, Stachel S, Tzika AA, Tompkins RG, Rahme LG. Inhibitors of pathogen intercellular signals as selective anti-infective compounds. *PLoS Pathog*, 2007, 3, 1229–1239.

Lin J, Cheng J, Wang Y, Shen X. The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS): Not just for quorum sensing anymore. *Front Cell Infect Microbiol*, 2018, 8, 1–9.

Lipinski CA, Lombardo F, Dominy BW, Feeney PJ. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev*, 1997, 23, 3–25.

Lu C, Kirsch B, Zimmer C, De Jong JC, Henn C, Maurer CK, Müsken M, Häussler S, Steinbach A, Hartmann RW. Discovery of antagonists of PqsR, a key player in 2-alkyl-4-quinolone-dependent quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Chem Biol*, 2012, 19, 381–390.

Lu C, Kirsch B, Maurer CK, De Jong JC, Braunshausen A, Steinbach A, Hartmann RW. Optimization of anti-virulence PqsR antagonists regarding aqueous solubility and biological properties resulting in new insights in structure-activity relationships. *Eur J Med Chem*, 2014, 79, 173–183.

Ma L, Conover M, Lu H, Parsek MR, Bayles K, Wozniak DJ. Assembly and development of the *Pseudomonas aeruginosa* biofilm matrix. *PLoS Pathog.*, 2009, 5, 1–11.

Matzov D, Bashan A, Yonath A. A bright future for antibiotics? *Ann Intern Med*, 2017, 86, 567–583.

Munita JM, Arias CA. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr*, 2015, 4, 481–507.

Neu HC. The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 1992, 257, 1064–1073.

Pollack M. The virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis*, 1984, 6 Suppl 3.

Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, O Sintim H. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem*, 2015, 7, 493–512.

Resistance mechanisms – Antibiotic resistance – ReAct, 2014., <http://www.reactgroup.org>, pristupljeno 22. 6. 2021.

Rogers SA, Lindsey EA, Whitehead DC, Mullikin T, Melander C. Synthesis and biological evaluation of 2-aminoimidazole/carbamate hybrid anti-biofilm and anti-microbial agents. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011, 21, 1257–1260.

Ryder C, Byrd M, Wozniak DJ. Role of polysaccharides in *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Curr Opin Microbiol*, 2007, 10, 644–648.

Schütz C, Empting M. Targeting the *Pseudomonas* quinolone signal quorum sensing system for the discovery of novel anti-infective pathoblockers. *Beilstein J Org Chem*, 2018, 14, 2627–2645.

Sobke A, Klinger M, Hermann B, Sachse S, Nietzsche S, Makarewicz O, Keller PM, Pfister W, Straubea E. The urinary antibiotic 5-nitro-8-hydroxyquinoline (nitroxoline) reduces the formation and induces the dispersal of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms by chelation of iron and zinc. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, 56, 6021–6025.

Soukariéh F, Williams P, Stocks MJ, Cámara M. *Pseudomonas aeruginosa* Quorum Sensing Systems as Drug Discovery Targets: Current Position and Future Perspectives. *J Med Chem*, 2018, 61, 10385–10402.

Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, Pulcini C, Kahlmeter G, Kluytmans J, Carmeli Y, Ouellette M, Outterson K, Patel J, Cavalieri M, Cox EM, Houchens CR, Grayson ML, Hansen P, Singh N, Theuretzbacher U, Magrini N, Aboderin AO, Al-Abri SS, Awang Jalil NN, Benzonana N, Bhattacharya S, Brink AJ, Burkert FR, Cars O, Cornaglia G, Dyar OJ, Friedrich AW, Gales AC, Gandra S, Giske CG, Goff DA, Goossens H, Gottlieb T, Guzman Blanco M, Hryniewicz W, Kattula D, Jinks T, Kanj SS, Kerr L, Kieny MP, Kim YS, Kozlov RS, Labarca J, Laxminarayan R, Leder K, Leibovici L, Levy-Hara G, Littman J, Malhotra-Kumar S, Manchanda V, Moja L, Ndoye B, Pan A, Paterson DL, Paul M, Qiu H, Ramon-Pardo P, Rodríguez-Baño J, Sanguinetti M, Sengupta S, Sharland M, Si-Mehand M, Silver LL, Song W, Steinbakk M, Thomsen J, Thwaites GE, van der Meer JWM, Van Kinh N, Vega S, Villegas M, Wechsler-Fördös A, Wertheim HFL, Wesangula E, Woodford N, Yilmaz FO, Zorzet A. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*, 2018, 18, 318–327.

Thomann A, De Mello Martins AGG, Brengel C, Empting M, Hartmann RW. Application of Dual Inhibition Concept within Looped Autoregulatory Systems toward Antivirulence Agents against *Pseudomonas aeruginosa* Infections. *ACS Chem Biol*, 2016, 11, 1279–1286.

Veber DF, Johnson SR, Cheng HY, Smith BR, Ward KW, Kopple KD. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *J Med Chem*, 2002, 45, 2615–2623.

Vorbrüggen H, Krolkiewicz K. A simple synthesis of d2-oxazolines, d-oxazines, d2-thiazolines and 2-substituted benzoxazoles. *Tetrahedron*, 1993, 49, 9353–9372.

Witzgall F, Ewert W, Blankenfeldt W. Structures of the N-Terminal Domain of PqsA in Complex with Anthraniloyl- and 6-Fluoroanthraniloyl-AMP: Substrate Activation in *Pseudomonas* Quinolone Signal (PQS) Biosynthesis. *ChemBioChem*, 2017, 18, 2045–2055.

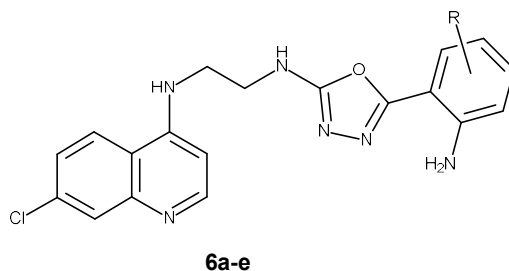
Woo LWL, Bubert C, Purohit A, Potter BVL. Hybrid dual aromatase-steroid sulfatase inhibitors with exquisite picomolar inhibitory activity. *ACS Med Chem Lett*, 2011, 2, 243–247.

Young LS. Human Immunity to *Pseudomonas aeruginosa*. II. Relationship between Heat-Stable Opsonins and Type-Specific Lipopolysaccharides. *J Infect Dis*, 1972, 126, 277–287.

7. SAŽETAK/SUMMARY

U ovom radu sintetizirano je pet novih hibridnih spojeva te su strukturno karakterizirani. Njihove strukture sastoje se od antranilne kiseline i njezinih halogeniranih derivata te derivate 4-amino-7-klorokinolina. Kao poveznica između dva farmakofora izabran je 1,3,4-oksadiazol, peteročlani heterociklički prsten stabilan na enzimsku i kemijsku razgradnju.

Sinteza je započeta amidacijom derivata metilnih estera antranilne kiseline u odgovarajuće hidrazide (**2a-e**) u reakciji s vodenom otopinom hidrazina. Metilni esteri **1a** i **1b** prethodno su priređeni iz odgovarajućih kiselinskih derivata korištenjem tionil-klorida i metanola, dok su preostali esteri bili komercijalno dostupni. Hidrazidi su zatim prevedeni u odgovarajuće 3-*H*-1,3,4-oksadiazol-2-onske derivate (**3a-e**) reakcijom s CDI. Drugi građevni element, aminokinolinski derivat **4** priređen je reakcijom 4,7-diklorokinolina i etilendiamina. 1,4-Disupstituirani semikarbazidi **5a-e** dobiveni su u reakciji kinolinskog derivata **4** i oksadiazola **3a-e**. U zadnjem reakcijskom koraku, u reakciji ciklizacije zatvoren je 1,3,4-oksadiazolni prsten te su dobiveni konačni produkti **6a-e**.



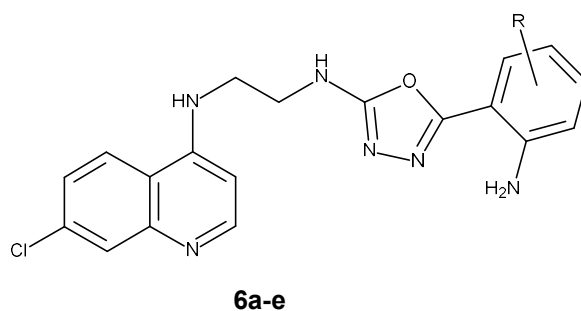
Dobiveni spojevi karakterizirani su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim tehnikama: ¹H i ¹³C NMR i MS. Čistoća im je utvrđena UPLC analizom te je kod svih sintetiziranih spojeva iznosila preko 95 %. Tališta sintetiziranih spojeva određivana su diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom.

Izračun fizičko-kemijskih deskriptora spojeva te njihovih farmakokinetičkih parametara napravljen je pomoću besplatne web aplikacije SwissADME. Na temelju rezultata može se zaključiti da bi spojevi trebali imati zadovoljavajuća svojstva topljivosti i permeabilnosti što ukazuje na dobru oralnu bioraspodivnost.

Ispitivanja biološkog djelovanja sintetiziranih spojeva izlaze iz okvira ovog rada te će biti provedena naknadno.

In the course of this paper, five novel hybrid compounds were synthesized and structurally characterized. Their structures consisted of anthranilic acid and its halogenated derivatives, along with 7-chloro-4-aminoquinoline. 1,3,4-oxadiazole, a five-membered heterocyclic ring resistant to chemical and enzymatic degradation, was used as a linker between the two pharmacophores.

The synthesis began with the amidation of anthranilic acid methyl ester derivatives into their corresponding hydrazides (**2a-e**), in a reaction with an aqueous solution of hydrazine. Methyl ester derivatives **1a** and **1b** were previously obtained from the corresponding acid derivatives, using thionyl chloride and methanol, while the remaining ester derivatives were commercially available. The hydrazides were then converted to the corresponding 3-*H*-1,3,4-oxadiazol-2-one derivatives (**3a-e**) in a reaction with CDI. Another building block, the aminoquinoline derivative **4** was obtained in the reaction between 4,7-dichloroquinoline and ethylenediamine. 1,4-disubstituted semicarbazides **5a-e** were obtained in the reaction between the aminoquinoline derivative **4** and the 3-*H*-1,3,4-oxadiazol-2-one derivatives **3a-e**. During the final reaction step, a 1,3,4-oxadiazole ring was enclosed in a cyclization reaction and the final products **6a-e** were obtained.

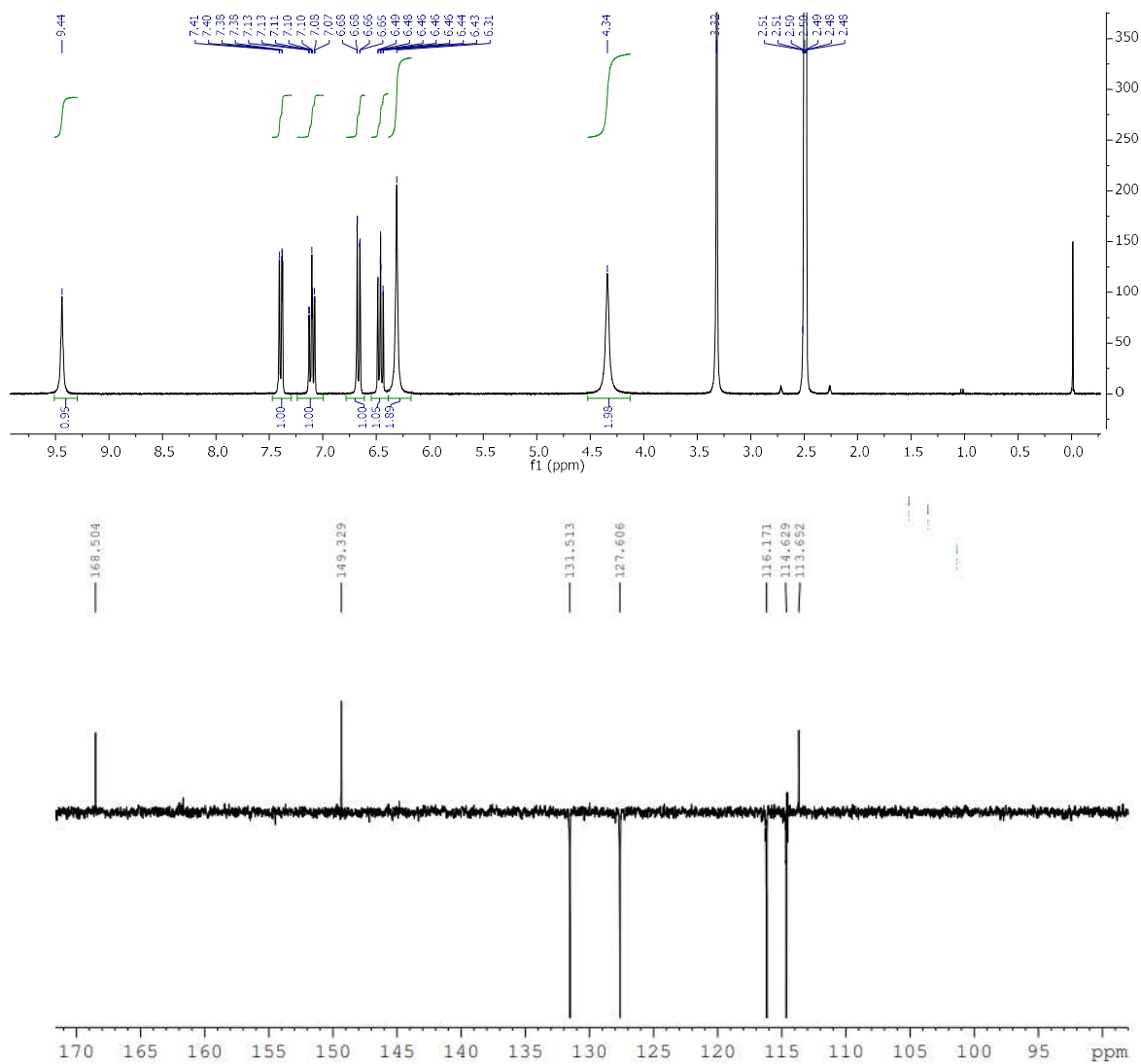
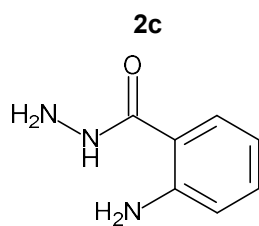


The synthesized compounds were characterized using standard analytical and spectroscopic techniques: ^1H and ^{13}C NMR and MS. Their purity was determined by UPLC analysis, all of which exceeded 95 %. Melting points of the synthesized compounds were determined by differential scanning calorimetry.

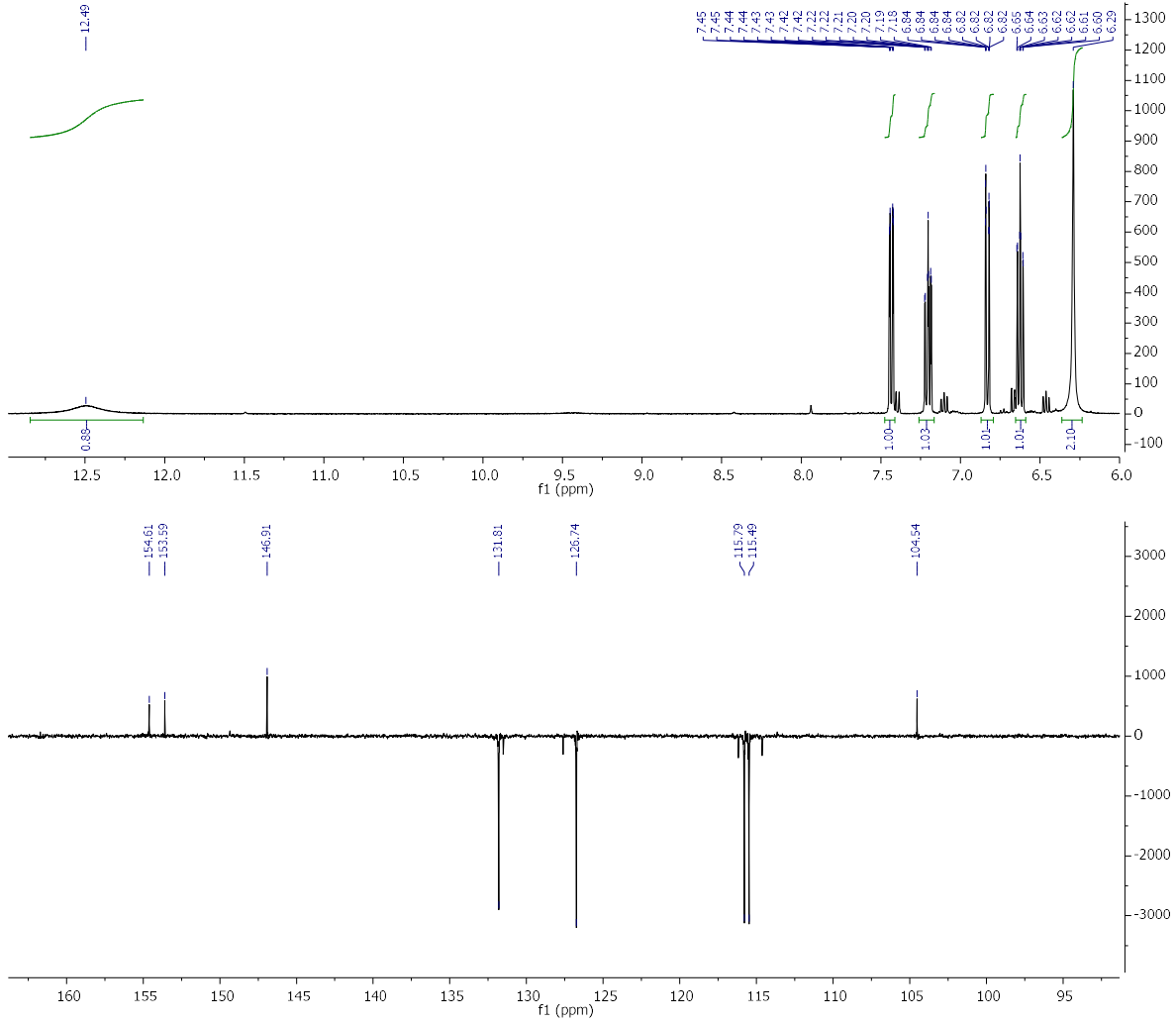
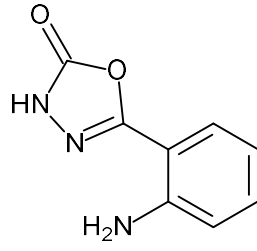
The calculation of the compounds' physicochemical descriptors, along with their pharmacokinetical parameters was performed using a free web tool called SwissADME. Based on the results, it can be concluded that the compounds show satisfactory properties in terms of solubility and permeability, which indicates high oral bioavailability.

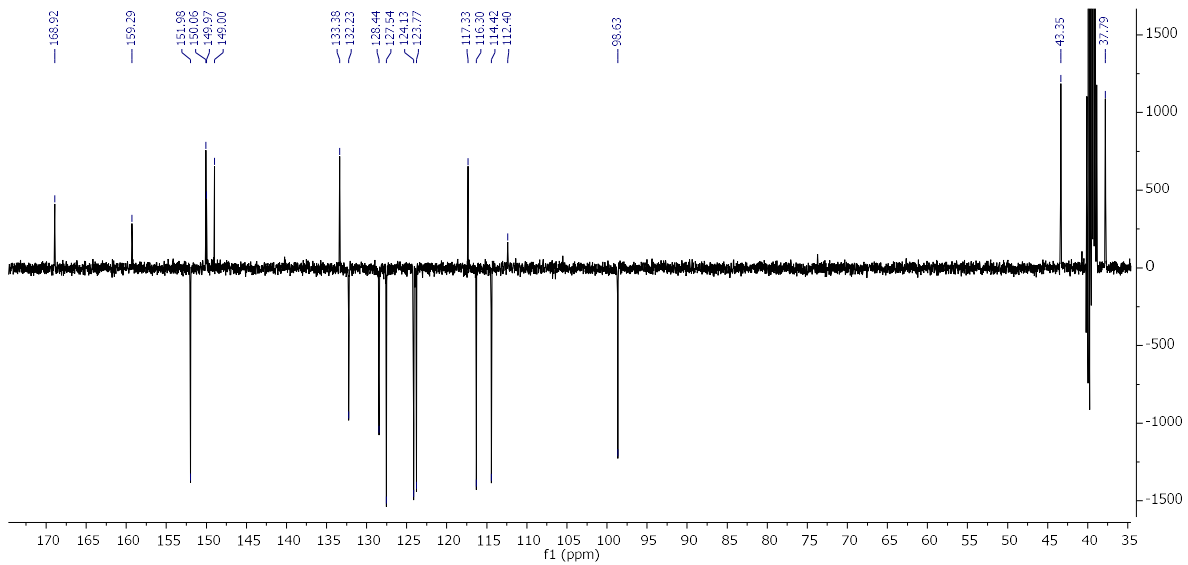
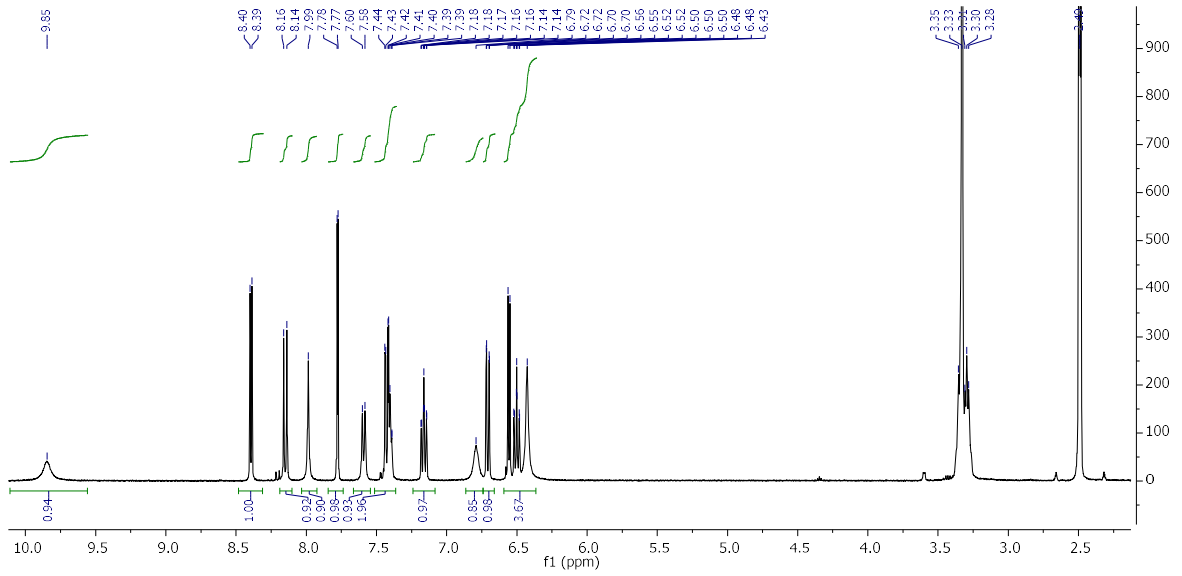
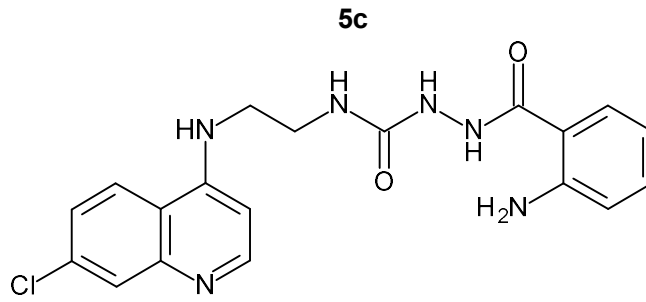
Biological screening of the synthesized compounds is beyond the scope of this paper, and will be performed in the future.

8. PRILOZI

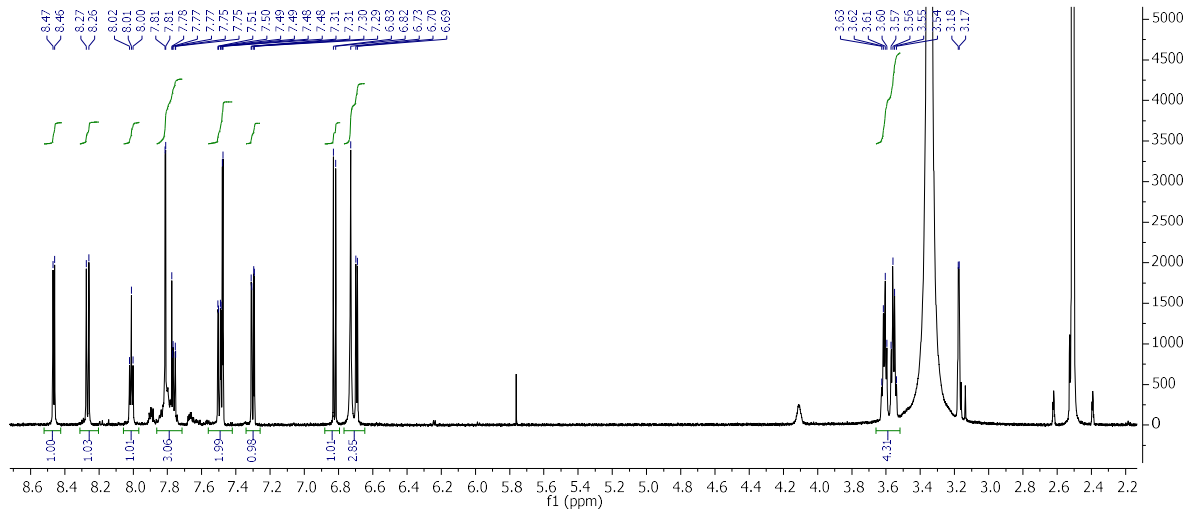
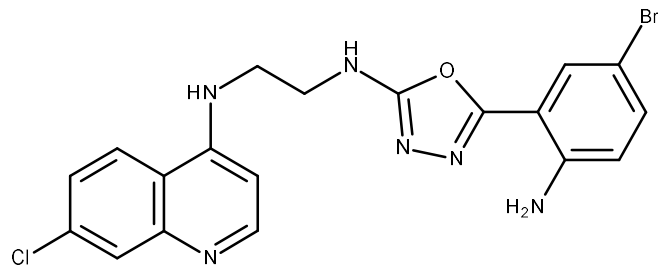


3c

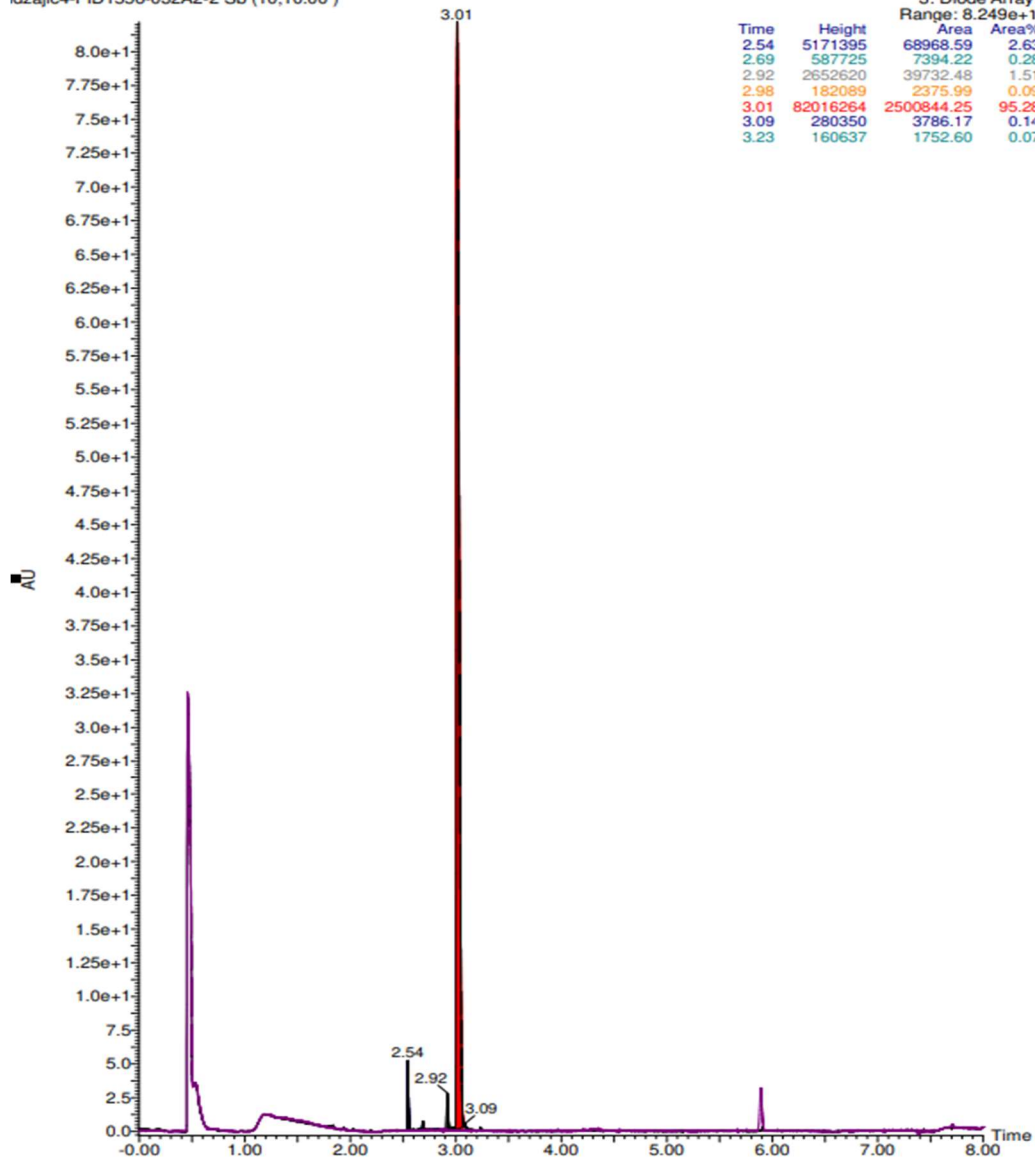




6a

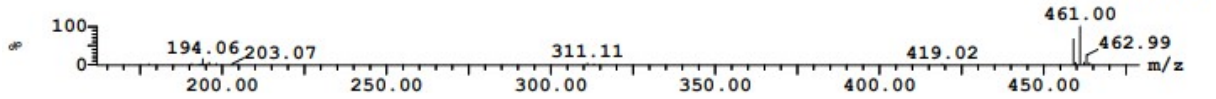


idzajic4-FID1556-032A2-2 Sb (10,10.00)

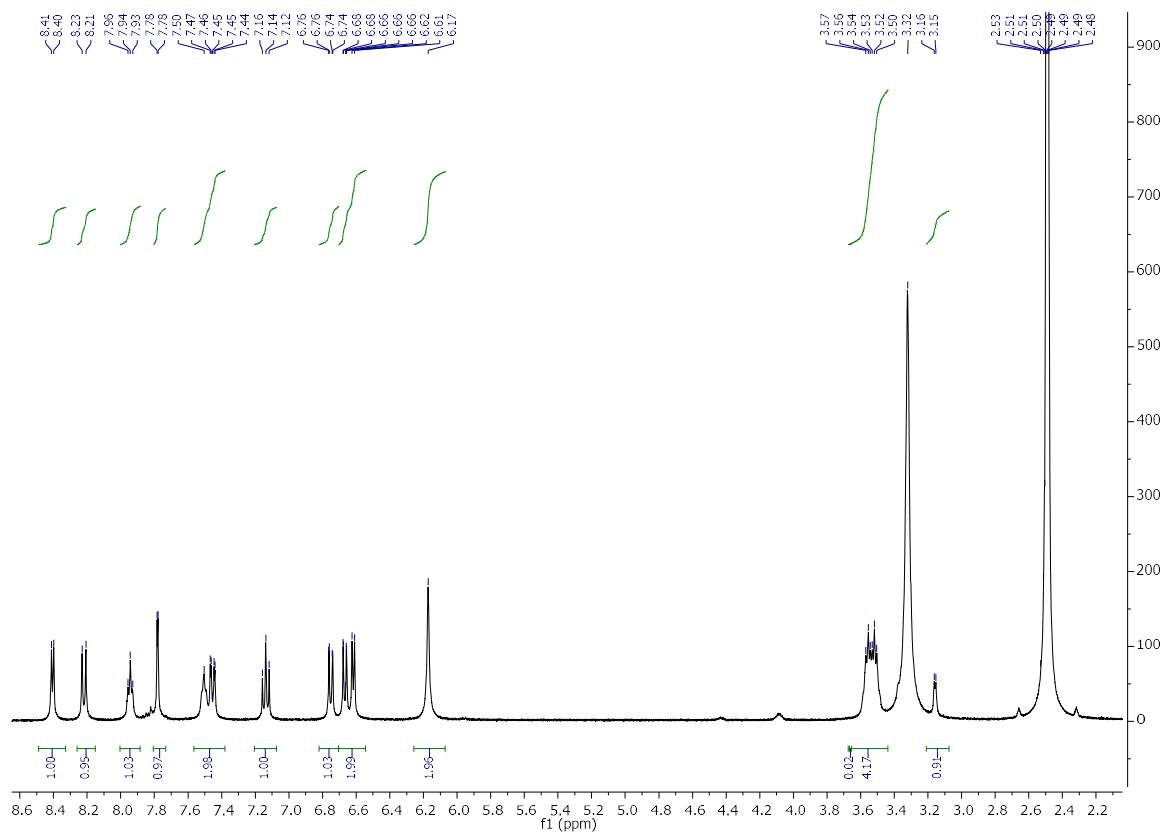
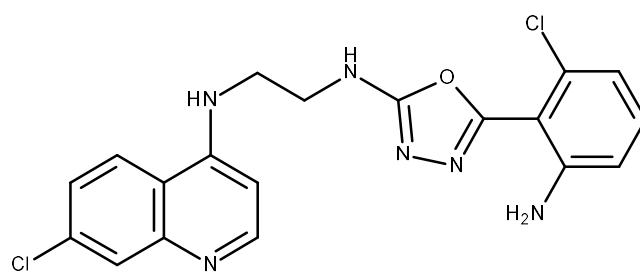


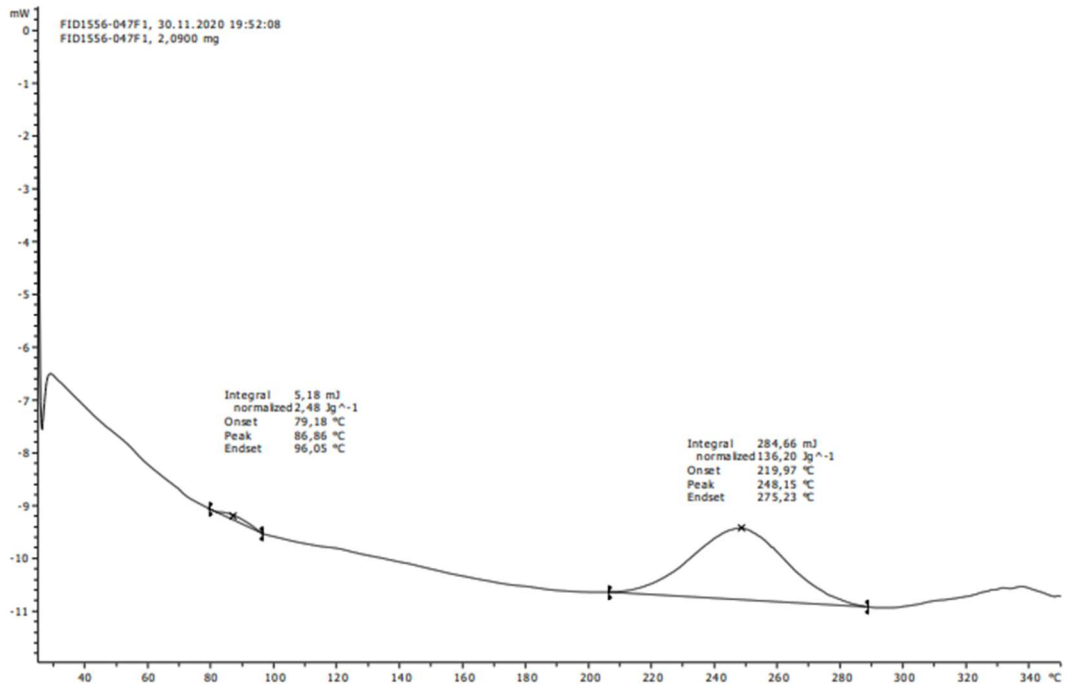
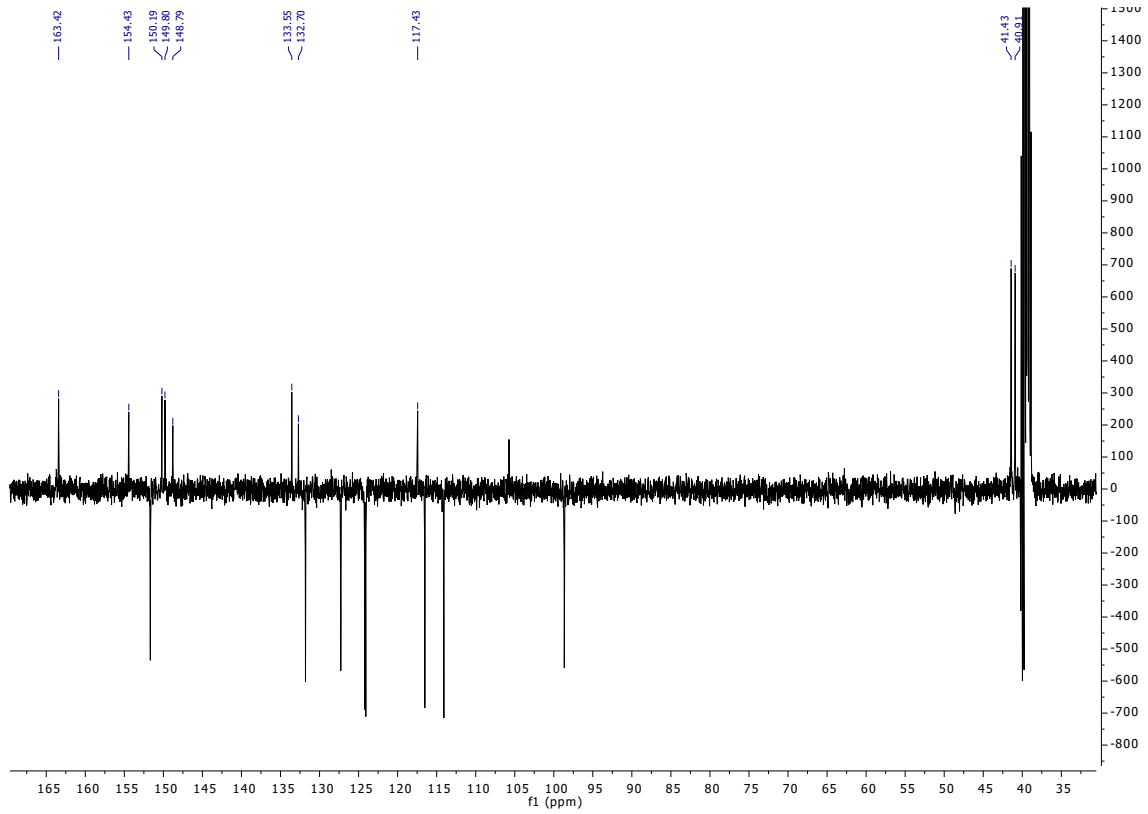
Peak ID Compound Time Mass Found

5 3.05
 SAMPLE: 1:6 Combine (357:369-(339:344+382:387))

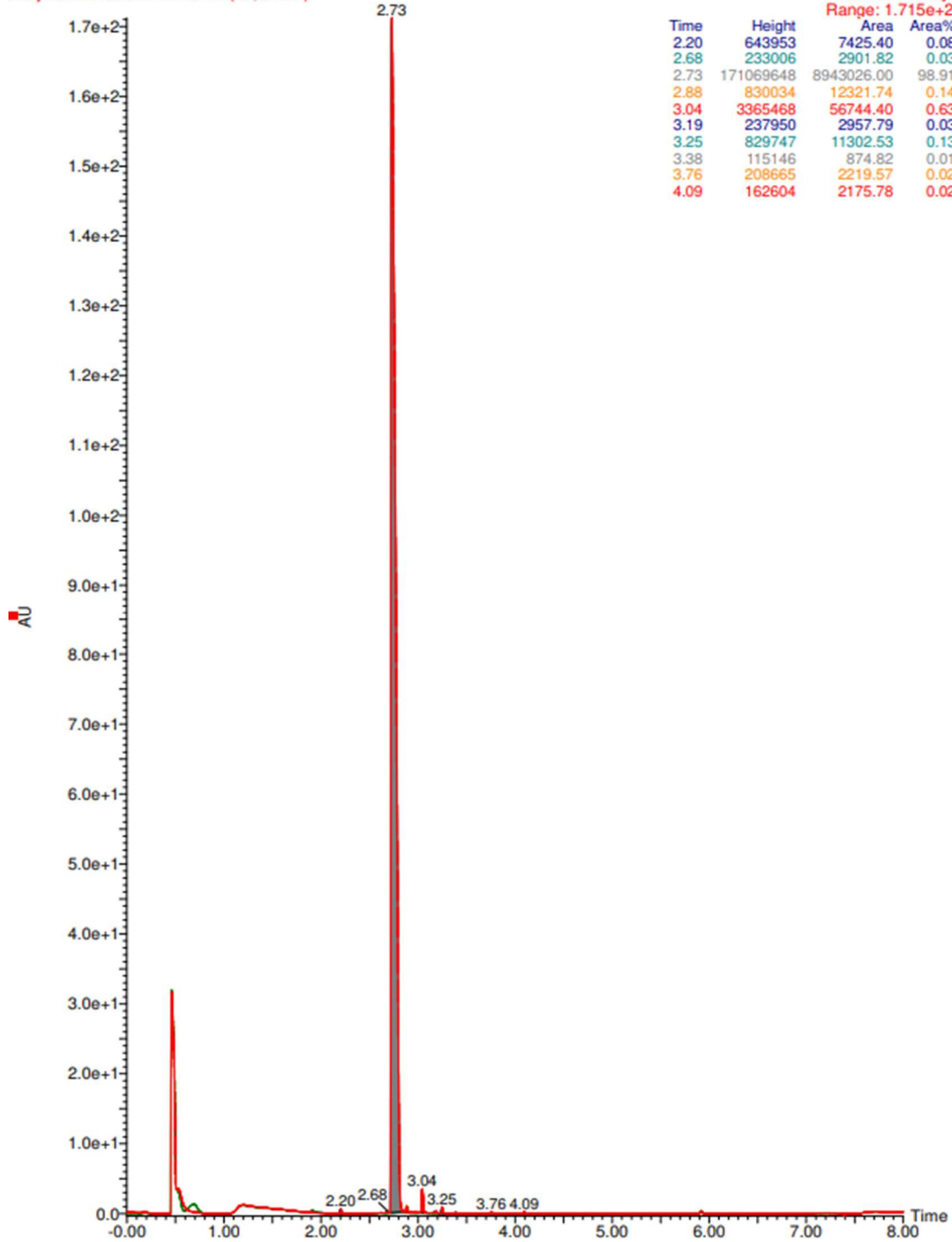


6b





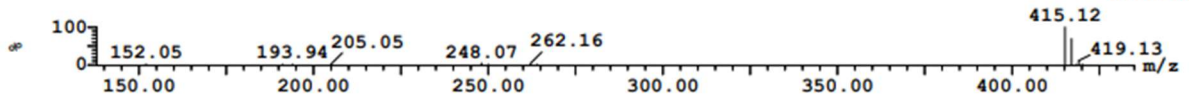
ldzajic8-FID1556-047F1-2 Sb (10,10.00)



Peak ID Compound Time Mass Found

3 2.75
SAMPLE: 2:16 Combine (322:334-(304:309+347:352))

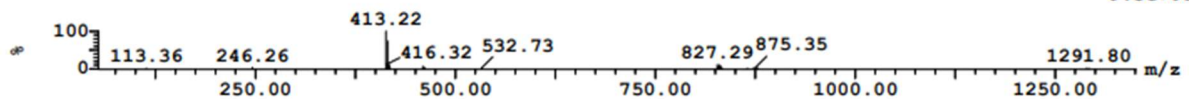
1:MS ES+
2.3e+007



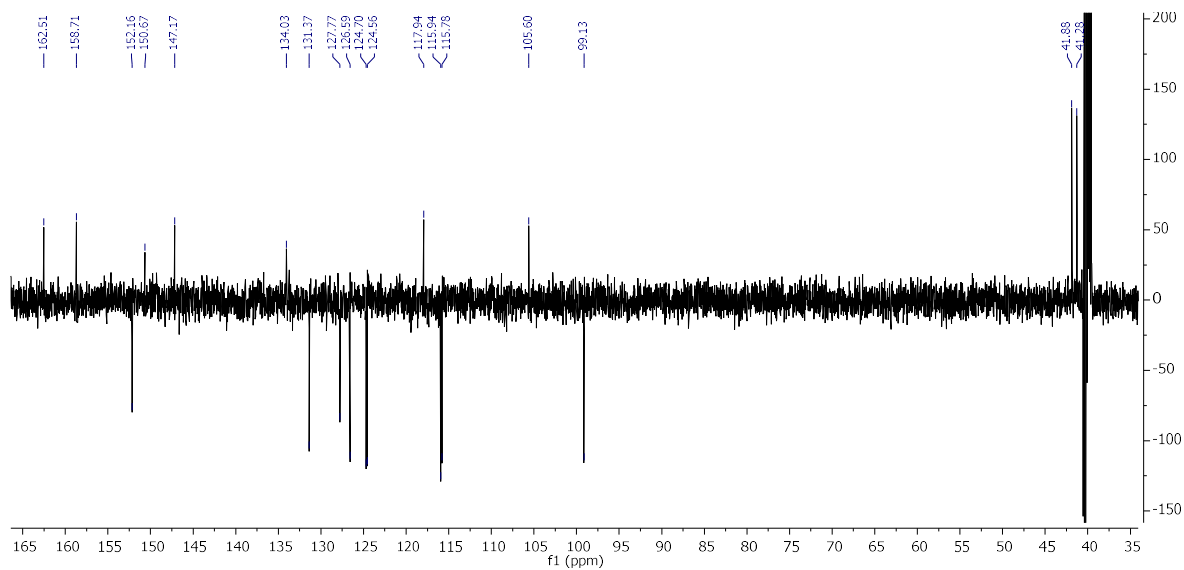
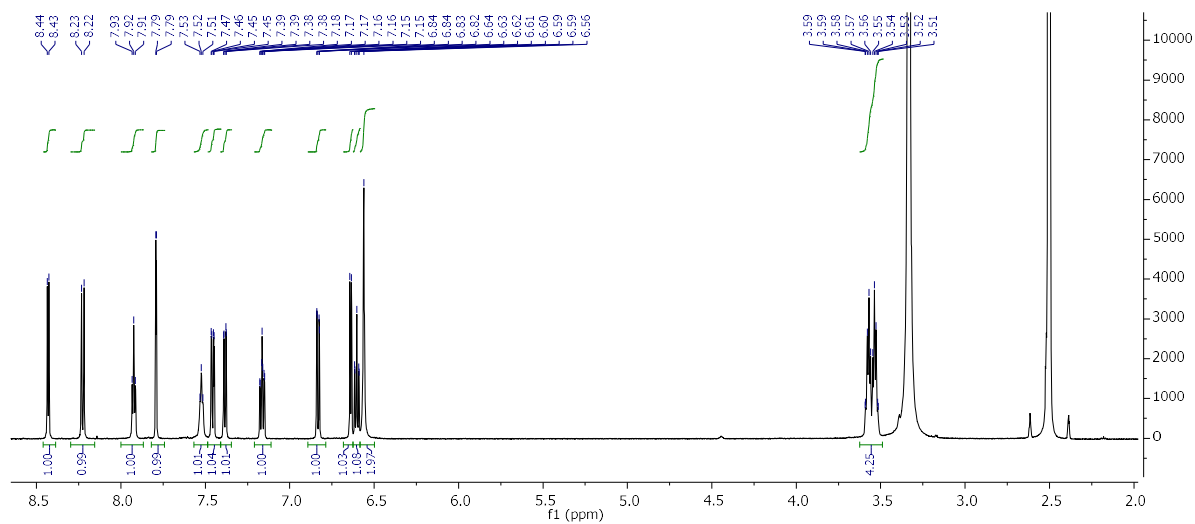
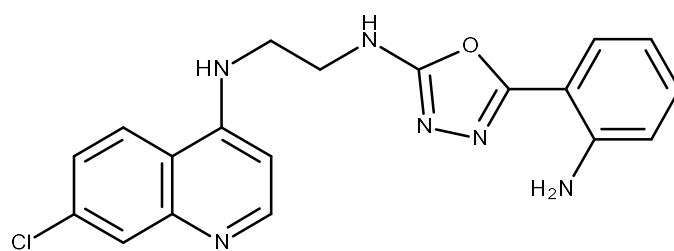
Peak ID Compound Time Mass Found

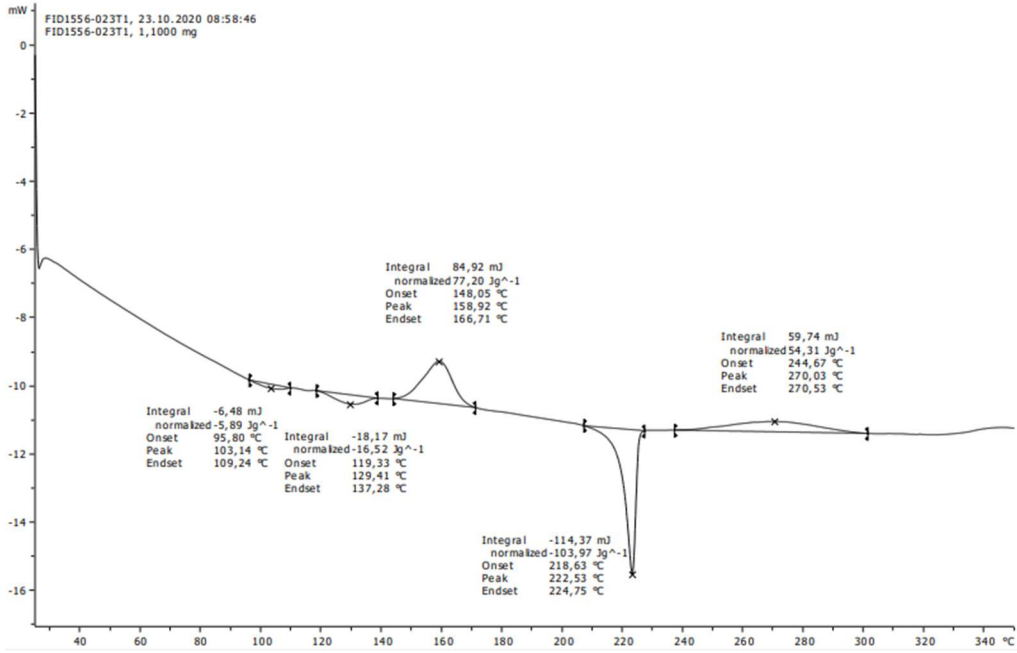
3 2.75
SAMPLE: 2:16 Combine (324:336-(306:311+349:354))

2:MS ES-
9.5e+005



6c

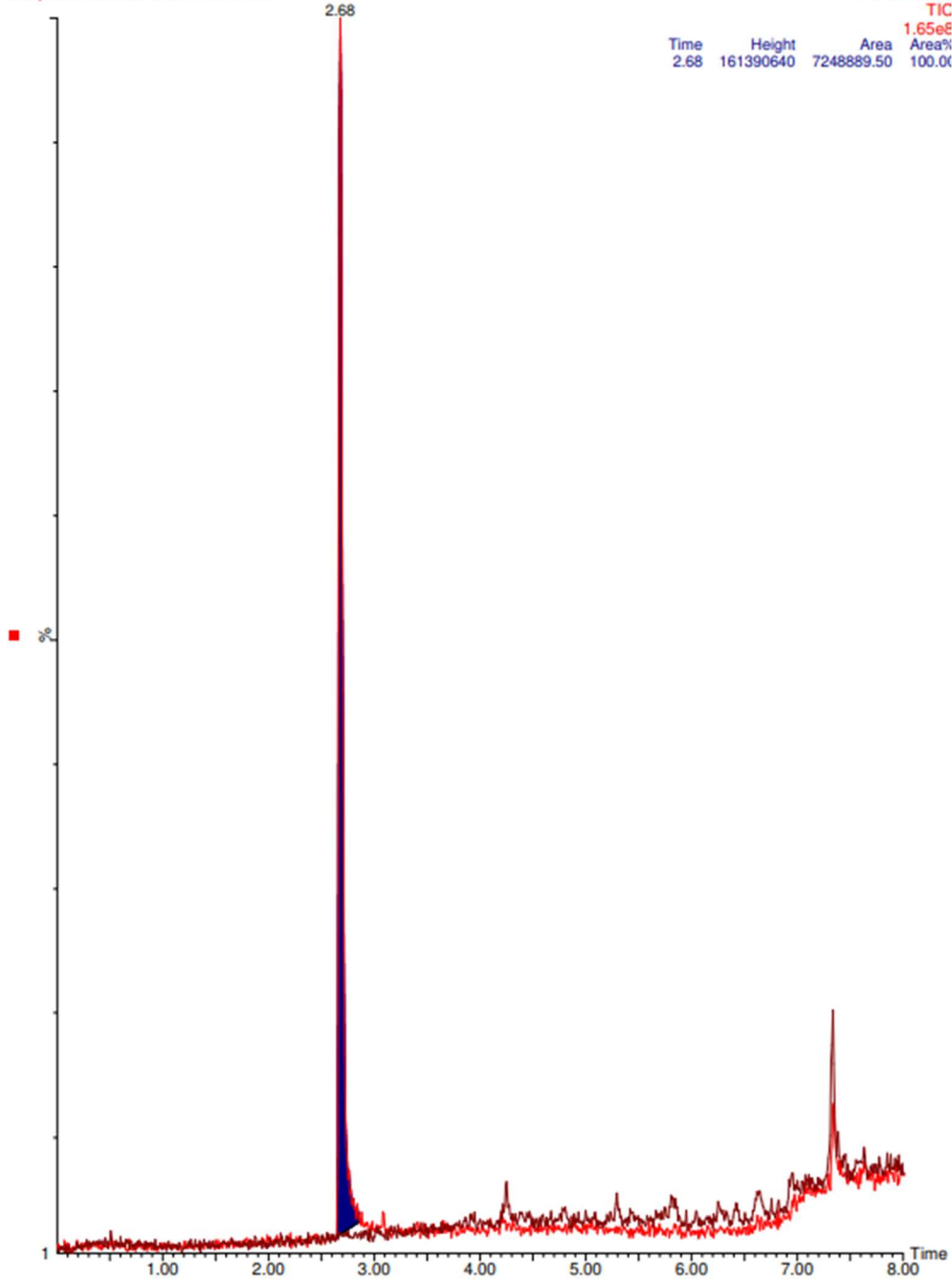




idzajic82-FID1556-023F1-2-UPLC2

1: Scan ES+
TIC

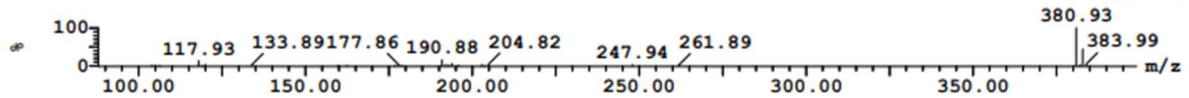
Time	Height	Area	Area%
2.68	161390640	7248889.50	100.00



Peak ID	Compound	Time	Mass Found
3		2.68	

SAMPLE: 1:25 Combine (313:325-(295:300+338:343))

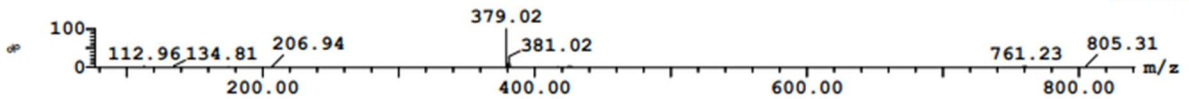
1:MS ES+
2.6e+007



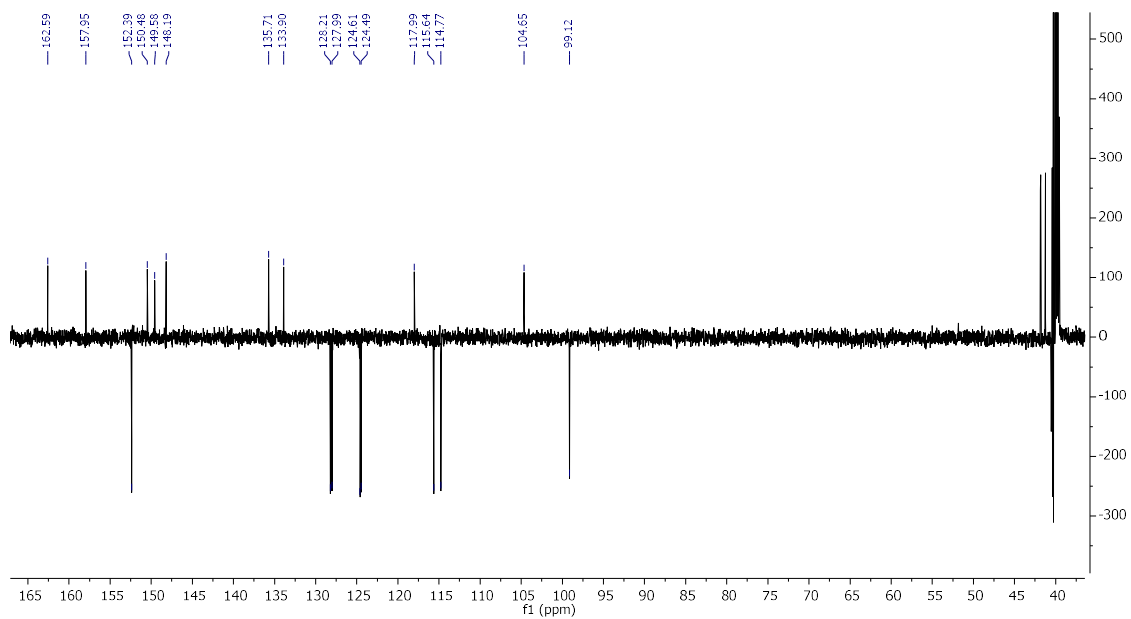
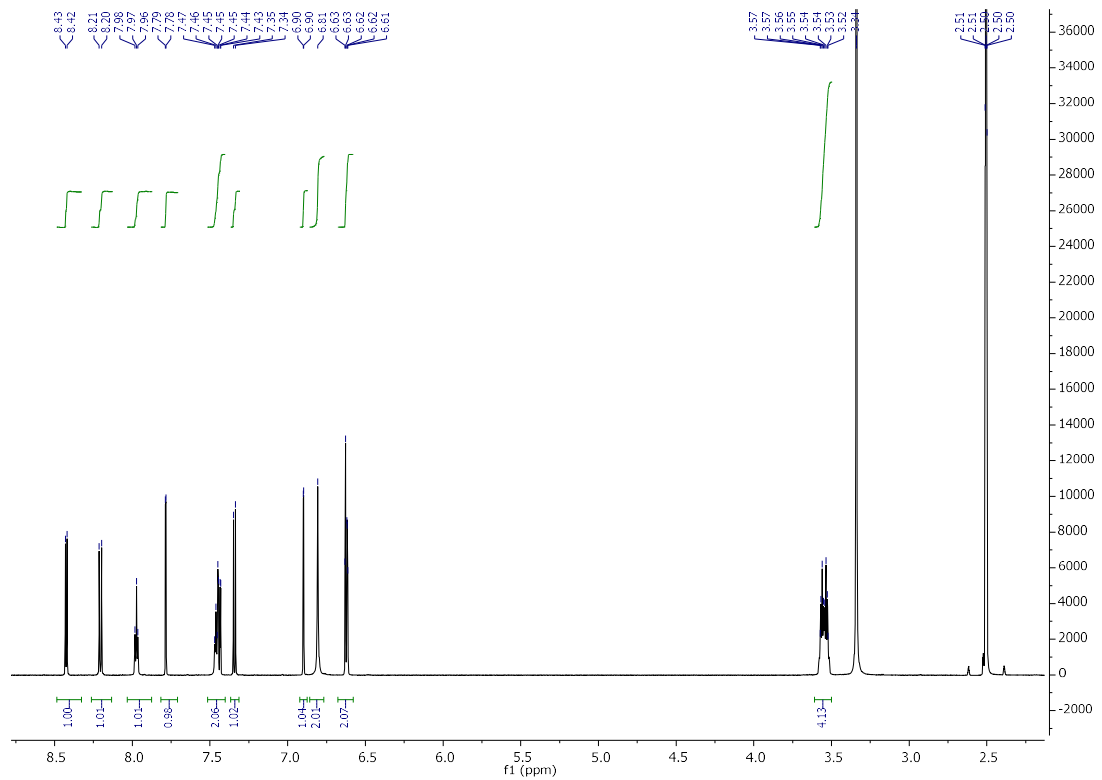
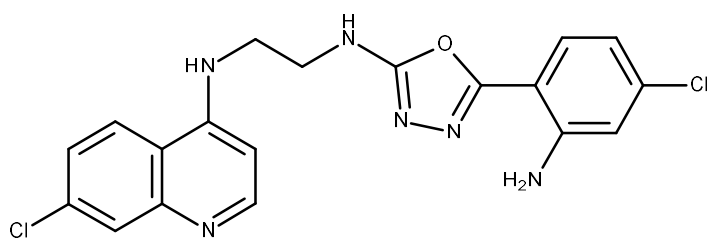
Peak ID	Compound	Time	Mass Found
3		2.68	

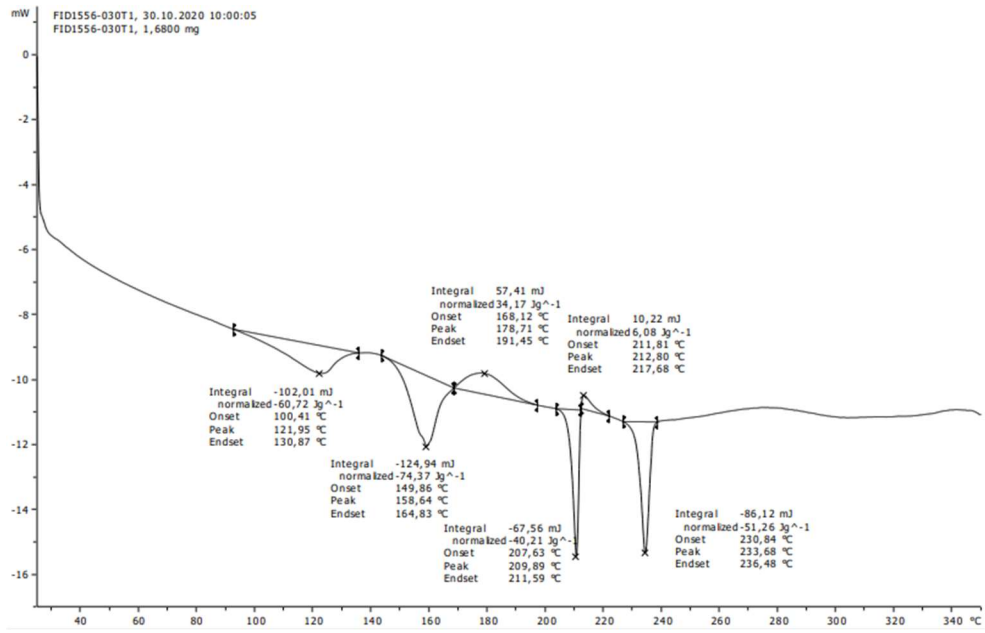
SAMPLE: 1:25 Combine (313:325-(295:300+338:343))

2:MS ES-
8.7e+005

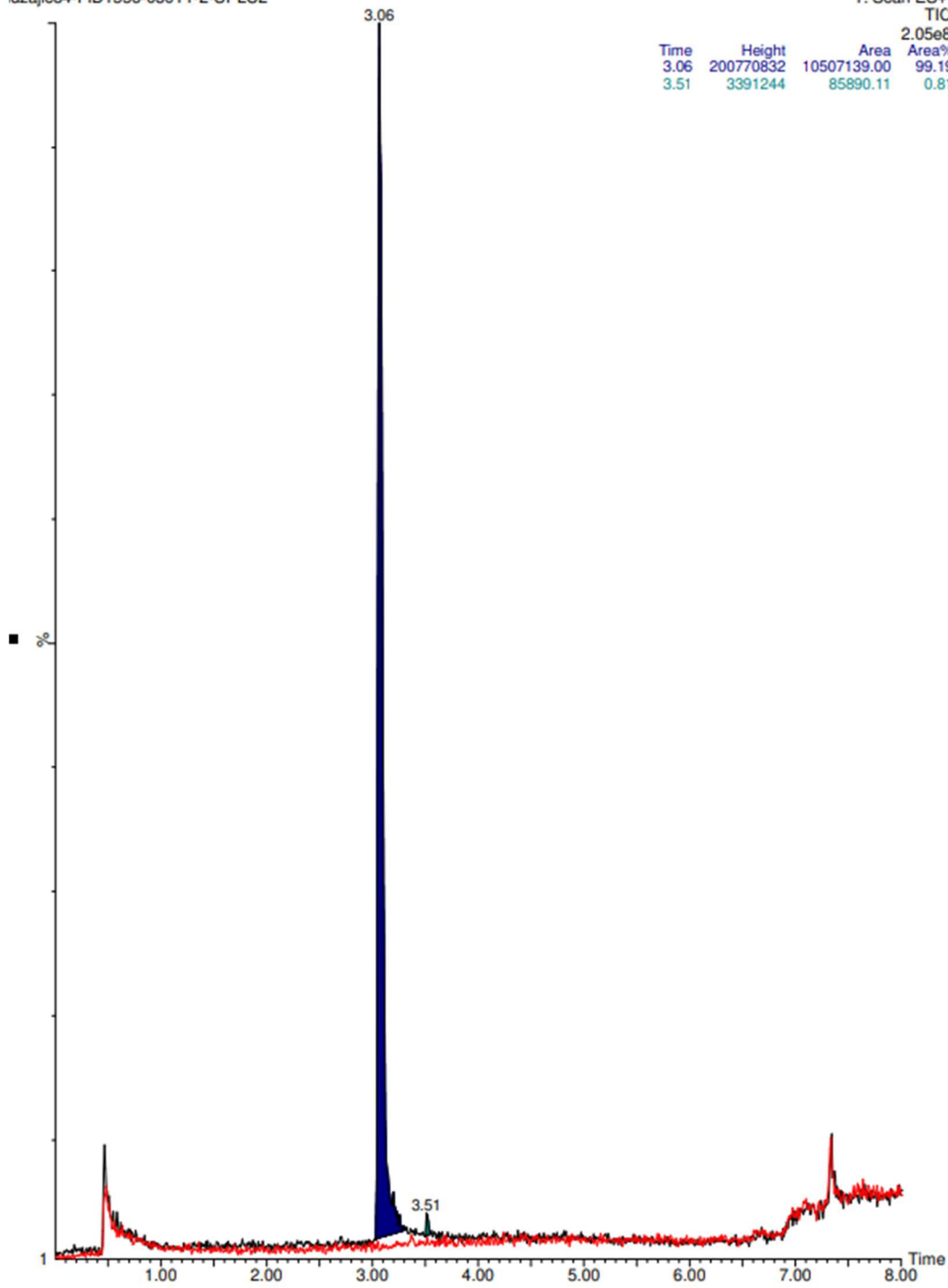


6d





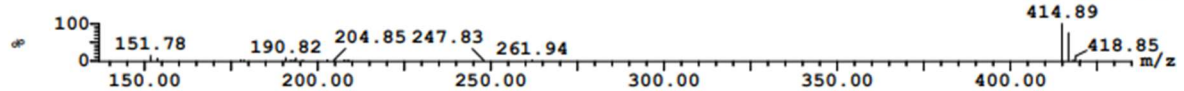
Time	Height	Area	Area%
3.06	200770832	10507139.00	99.19
3.51	3391244	85890.11	0.81



Peak ID	Compound	Time	Mass Found
3		3.07	

SAMPLE: 1:9 Combine (360:372-(342:347+385:390))

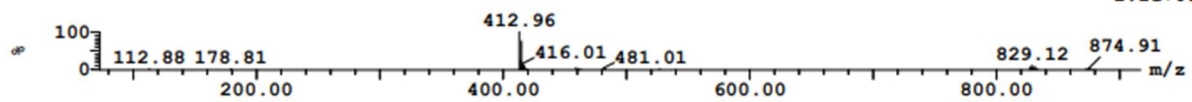
1:MS ES+
3.3e+007



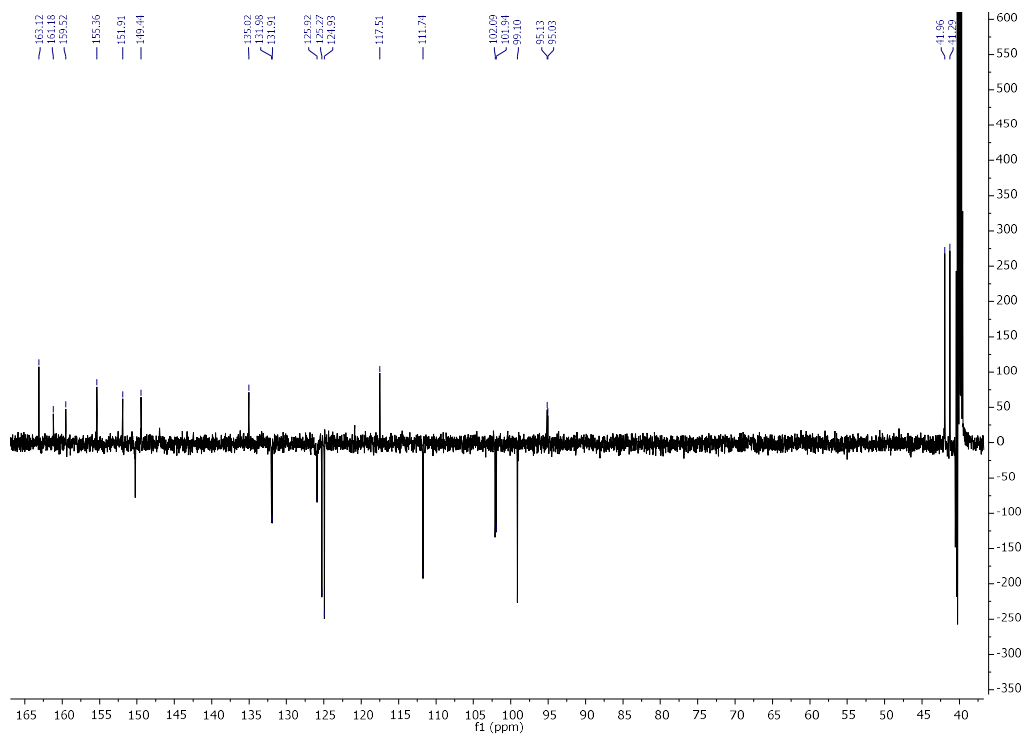
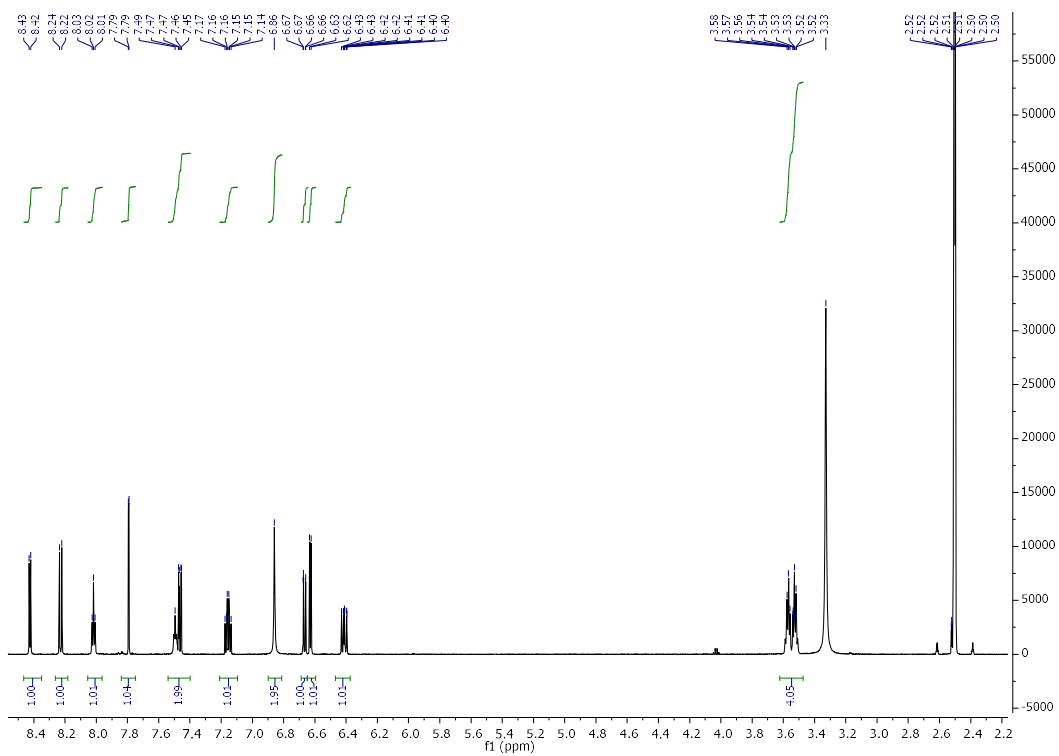
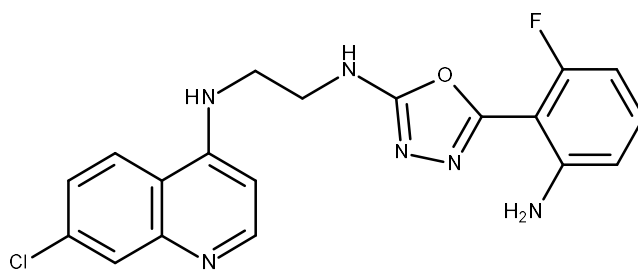
Peak ID	Compound	Time	Mass Found
3		3.07	

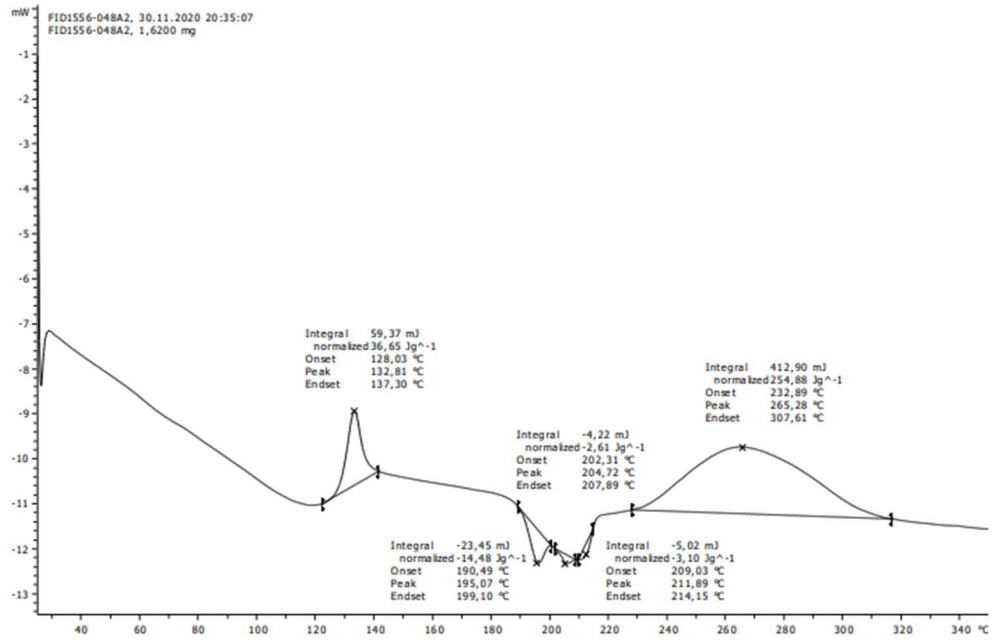
SAMPLE: 1:9 Combine (359:371-(341:346+384:389))

2:MS ES-
1.1e+006

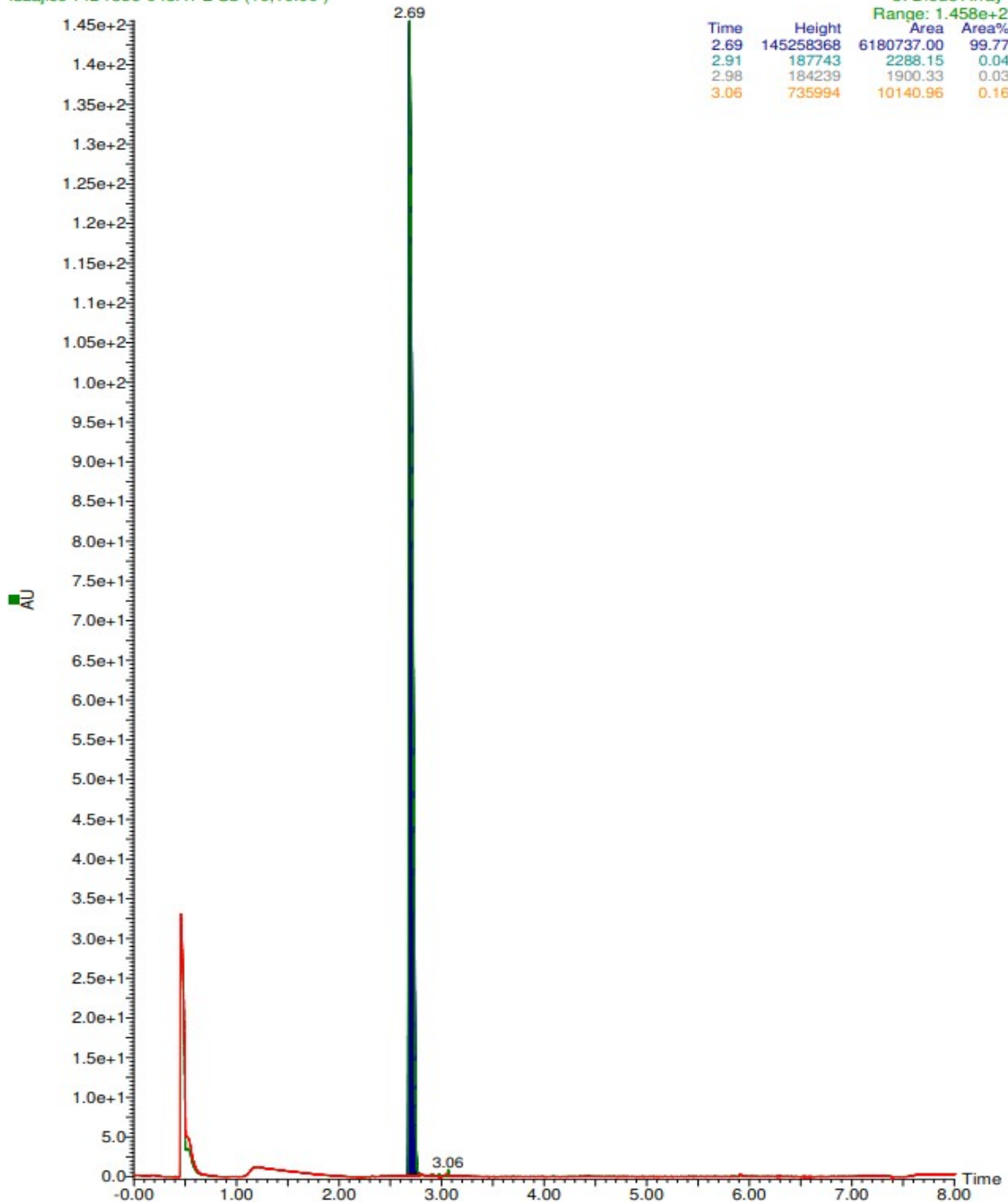


6e



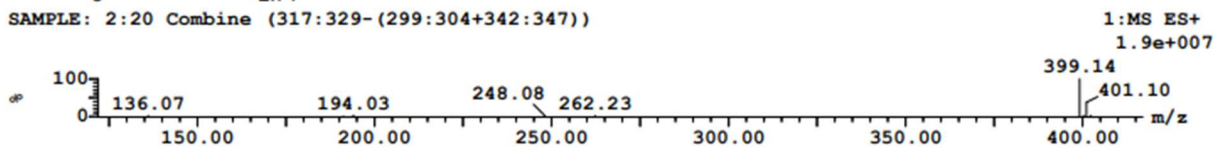


idzajic9-FID1556-048A1-2 Sb (10,10.00)

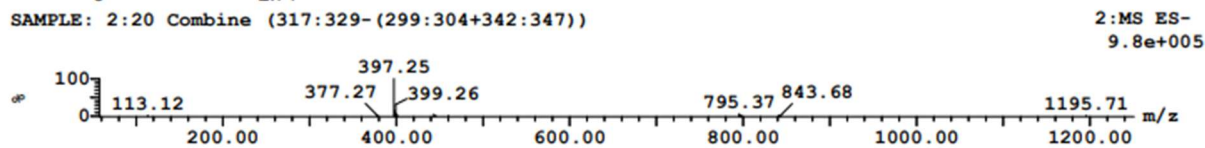


3: Diode Array
Range: 1.458e+2

Peak ID Compound Time Mass Found
3 2.71
SAMPLE: 2:20 Combine (317:329-(299:304+342:347))



Peak ID Compound Time Mass Found
3 2.71
SAMPLE: 2:20 Combine (317:329-(299:304+342:347))



9. TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA/BASIC DOCUMENTATION CARD

Temeljna dokumentacijska kartica

Sveučilište u Zagrebu
Farmaceutsko-biokemijski fakultet
Studij: Farmacija
Zavod za farmaceutsku kemiju
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Hrvatska

Diplomski rad

Heterociklički hibridni spojevi, derivati antranilne kiseline i aminokinolina, kao potencijalni agensi u suzbijanju bakterijskih biofilmova

Ivan Džajić

SAŽETAK

U ovom radu sintetizirano je pet novih hibridnih spojeva te su strukturno karakterizirani. Njihove strukture sastoje se od antranilne kiseline i njezinih halogeniranih derivata te derivate 4-amino-7-klorokinolina. Kao poveznica između dva farmakofora izabran je 1,3,4-oksadiazol, peteročlani heterociklički prsten stabilan na enzimsku i kemijsku razgradnju.

Sinteza je započeta amidacijom derivata metilnih estera antranilne kiseline u odgovarajuće hidrazide (**2a-e**) u reakciji s vodenom otopinom hidrazina. Metilni esteri **1a** i **1b** prethodno su priređeni iz odgovarajućih kiselinskih derivata korištenjem tionil-klorida i metanola, dok su preostali esteri bili komercijalno dostupni. Hidrazidi su zatim prevedeni u odgovarajuće 3-*H*-1,3,4-oksadiazol-2-onske derivate (**3a-e**) reakcijom s CDI. Drugi građevni element, aminokinolinski derivat **4** priređen je reakcijom 4,7-diklorokinolina i etilendiamina. 1,4-Disupstituirani semikarbazidi **5a-e** dobiveni su u reakciji kinolinskog derivata **4** i oksadiazola **3a-e**. U zadnjem reakcijskom koraku, u reakciji ciklizacije zatvoren je 1,3,4-oksadiazolni prsten te su dobiveni konačni produkti **6a-e**.

Dobiveni spojevi karakterizirani su uobičajenim analitičkim i spektroskopskim tehnikama: ¹H i ¹³C NMR i MS. Čistoća im je utvrđena UPLC analizom te je kod svih sintetiziranih spojeva iznosila preko 95 %. Tališta sintetiziranih spojeva određivana su diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom.

Izračun fizičko-kemijskih deskriptora spojeva te njihovih farmakokinetičkih parametara napravljen je pomoću besplatne web aplikacije SwissADME. Na temelju rezultata može se zaključiti da bi spojevi trebali imati zadovoljavajuća svojstva topljivosti i permeabilnosti što ukazuje na dobru oralnu bioraspoloživost.

Ispitivanja biološkog djelovanja sintetiziranih spojeva izlaze iz okvira ovog rada te će biti provedena naknadno.

Rad je pohranjen u Središnjoj knjižnici Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.

Rad sadrži: 68 stranica, 18 grafičkih prikaza, 6 tablica i 42 literaturna navoda. Izvornik je na hrvatskom jeziku.

Ključne riječi: antranilna kiselina, aminokinolin, hibrid, PQS, sinteza

Mentor: **Dr. sc. Ivana Perković**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Ocjenjivači: **Dr. sc. Ivana Perković**, *docent Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Dr. sc. Tanja Poljak, *vanjski suradnik, Fidelta d.o.o.*

Dr. sc. Ana Mornar Turk, *redoviti profesor Sveučilišta u Zagrebu Farmaceutsko-biokemijskog fakulteta.*

Rad prihvaćen: srpanj, 2021.

Basic documentation card

University of Zagreb
Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Study: Pharmacy
Department of Medicinal Chemistry
A. Kovačića 1, 10000 Zagreb, Croatia

Diploma thesis

Heterocyclic hybrid compounds, aminoquinoline and anthranilic acid derivatives, as potential inhibitors of bacterial biofilm synthesis

Ivan Džajić

SUMMARY

In the course of this paper, five novel hybrid compounds were synthesized and structurally characterized. Their structures consisted of anthranilic acid and its halogenated derivatives, along with 7-chloro-4-aminoquinoline. 1,3,4-oxadiazole, a five-membered heterocyclic ring resistant to chemical and enzymatic degradation, was used as a linker between the two pharmacophores.

The synthesis began with the amidation of anthranilic acid methyl ester derivatives into their corresponding hydrazides (**2a-e**), in a reaction with an aqueous solution of hydrazine. Methyl ester derivatives **1a** and **1b** were previously obtained from the corresponding acid derivatives, using thionyl chloride and methanol, while the remaining ester derivatives were commercially available. The hydrazides were then converted to the corresponding 3-*H*-1,3,4-oxadiazol-2-one derivatives (**3a-e**) in a reaction with CDI. Another building block, the aminoquinoline derivative **4** was obtained in the reaction between 4,7-dichloroquinoline and ethylenediamine. 1,4-disubstituted semicarbazides **5a-e** were obtained in the reaction between the aminoquinoline derivative **4** and the 3-*H*-1,3,4-oxadiazol-2-one derivatives **3a-e**. During the final reaction step, a 1,3,4-oxadiazole ring was enclosed in a cyclization reaction and the final products **6a-e** were obtained.

The synthesized compounds were characterized using standard analytical and spectroscopic techniques: ¹H and ¹³C NMR and MS. Their purity was determined by UPLC analysis, all of which exceeded 95 %. Melting points of the synthesized compounds were determined by differential scanning calorimetry.

The calculation of the compounds' physicochemical descriptors, along with their pharmacokinetic parameters was performed using a free web tool called SwissADME. Based on the results, it can be concluded that the compounds show satisfactory properties in terms of solubility and permeability, which indicates high oral bioavailability.

Biological screening of the synthesized compounds is beyond the scope of this paper, and will be performed in the future.

The thesis is deposited in the Central Library of the University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry.

Thesis includes: 68 pages, 18 figures, 6 tables and 42 references. Original is in Croatian language.

Keywords: Anthranilic acid, aminoquinoline, hybrid, PQS, synthesis

Mentor: **Ivana Perković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

Reviewers: **Ivana Perković, Ph.D.** Assistant Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry
Tanja Poljak, Ph.D. External associate, Fidelta d.o.o.

Ana Mornar Turk, Ph.D. Full Professor, University of Zagreb Faculty of Pharmacy and Biochemistry

The thesis was accepted: July, 2021.