

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PRIMOŽ LOKOŠEK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

PRIMOŽ LOKOŠEK

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA NOVIH
POTENCIALNIH ZAVIRALCEV LIGAZE MURF Z
1,5-BENZODIAZEPINSKIM SKELETONOM**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF NEW POTENTIAL
MURF LIGASE INHIBITORS BASED ON A
1,5-BENZODIAZEPINE SCAFFOLD**

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2016

Magistrsko naložko sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sov, mag. farm.. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo in na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. *In vitro* testiranja na encimu MurF so izvedli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm., da sem lahko opravil magistrsko naložko pod njegovim mentorstvom in me pri tem usmerjal ter delil pomembne nasvete. Zahvaljujem se tudi asist. Kaji Rožman, mag. farm. za biokemijsko vrednotenje mojih končnih spojin. Prav tako se zahvaljujem vsem ostalim kolegom na Katedri za farmacevtsko kemijo, ki so mi na kakršenkoli način pomagali pri izdelavi magistrske naloge. Na koncu bi se rad zahvalil še moji družini, prijateljem in punci za vzpodbudne besede in podporo pri študiju ter izdelavi magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložko samostojno izdelal pod vodstvom mentorja doc. dr. Mateja Sov, mag. farm..

Primož Lokošek

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	1
ABSTRACT	2
SEZNAM OKRAJŠAV.....	3
1. UVOD	6
1.1. Antibiotiki.....	6
1.2. Odpornost bakterij	7
1.3. Bakterijska celična stena	8
1.4. Peptidoglikan	10
1.5. Muramil ligaze.....	13
1.6. MurF	14
1.7. Zaviralci MurF.....	15
2. NAMEN DELA	20
3. MATERIALI IN METODE.....	22
3.1. Materiali.....	22
3.2. Metode	22
3.2.1. Kromatografske metode	22
3.2.2. Spektroskopske metode	23
3.2.3. Določanje tališča	23
3.2.4. Poimenovanje in risanje spojin	23
3.2.5. Testiranje na izoliranem encimu MurF.....	23
4. EKSPERIMENTALNI DEL.....	25
4.1. Sinteza derivatov 2-(((2-aminofenil)amino)metilen)malononitrila (4a-c)	25
4.1.1. Neuspele reakcije	27
4.2. Sinteza derivatov 4-amino-1H-benzo[b][1,4]diazepin-3-karbonitrila (5a-c)	27
4.3 Sinteza 5-kloro-4-(morfolinosulfonil)tiofen-2-karboksilne kisline (9)	30
4.4. Sinteza 2,4-dikloro-5-(morfolinosulfonil)benzoidske kisline (12).....	31

4.5. Končni produkti	33
4.5.1. Sinteza 2,4-dikloro- <i>N</i> -(3-ciano-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]diazepin-4-il)-5-(morpholinosulfonil)benzamida (13a).....	33
4.5.2. Sinteza 5-kloro- <i>N</i> -(3-ciano-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]diazepin-4-il)-4-(morpholinosulfonil)tiofen-2-karboksamida (14a).....	34
4.5.3. Sinteza 2,4-Dikloro- <i>N</i> -(7,8-dikloro-3-ciano-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]diazepin-4-il)-5-(morpholinosulfonil)benzamid (13b)	35
4.5.4. Sinteza metil 3-ciano-4-(2,4-dikloro-5-(morpholinosulfonil)benzamido)-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]diazepin-7-karboksilata (13c).....	37
4.5.5. Sinteza metil 4-(5-kloro-4-(morpholinosulfonil)tiofen-2-karboksamid)-3-ciano-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]diazepin-7-karboksilata (14c).....	38
4.5.6. Sinteza 4-(5-kloro-4-(morpholinosulfonil)tiofen-2-karboksamid)-3-ciano-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]diazepin-7-karboksilne kisline (15c)	40
5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	42
5.1. Komentar sinteznih postopkov	42
5.1.1. Sinteza 1,5-benzodiazepinov za pridobitev spojin 5a , 5b in 5c	42
5.1.2. Klorosulfoniranje za pridobitev spojin 7 in 11	43
5.1.3. Tvorba sulfonamida za pridobitev spojin 9 in 12	44
5.1.4. Tvorba amida za pridobitev spojin 13a , 13b , 13c , 14a in 14c	45
5.1.5. Hidroliza estra za pridobitev spojine 15c	47
5.2. Rezultati vrednotenja zaviralne aktivnosti in komentar	48
6. SKLEP	51
7. LITERATURA	52

KAZALO SLIK

Slika 1: Struktura celične stene gram-pozitivne membrane.....	9
Slika 2: Struktura celične stene gram-negativne bakterije.....	9

Slika 3: Struktura peptidoglikana bakterije <i>E. coli</i>	10
Slika 4: Shema glavnih korakov sinteze peptidoglikana v <i>E. coli</i>	12
Slika 5: Mehanizem reakcije pri muramil ligazah	13
Slika 6: MurF bakterije <i>E. coli</i>	15
Slika 7: Načrtovane spremembe molekule 1b	21
Slika 8: Struktura barvila malahit zeleno.	24
Slika 9: Sinteza 1,5-benzodiazepinov po korakih.	43
Slika 10: Nastanek benzensulfonilklorida preko sulfonske kisline.	44
Slika 11: Nastanek benzensulfonilklorida preko elektrofila ^+SOCl	44
Slika 12: Mehanizem nastanka sulfonamida iz sulfonil klorida in amina.....	45
Slika 13: Nastanek izocianata in kasneje amina pri visokih temperaturah.	46
Slika 14: Mehanizem nastanka amidne vezi preko acil azida.	47
Slika 15: Hidroliza estra katalizirana z bazo.	48

KAZALO TABEL

Tabela 1: Zaviralci MurF.	17
Tabela 2: Rezultati zaviralne aktivnosti končnih spojin	48

POVZETEK

V obdobju pred antibiotiki so bile bakterije največji krivec za smrtnost ljudi. Z odkritjem antibiotikov je prišlo do revolucije v medicini in veliko življenj se je rešilo. Vendar pa so se z uporabo »čudežnih zdravil« hitro pojavili odporni sevi, ki se vztrajno širijo zaradi prekomerne in neustrezne rabe zdravil. Razvoj novih protibakterijskih učinkovin, ki vplivajo na bakterijske esencialne mehanizme, je postala pomembna naloga, da se ubranimo pred njihovimi boleznimi. Biosinteza peptidoglikana ponuja veliko ključnih tarč, pri čemer so encimi citoplazemskega dela sinteze slabo izkoriščeni. To so predvsem encimi Mur, ki so odlični kandidati za razvoj novih učinkovin, saj z zaviranjem njihove encimske aktivnosti dosežemo smrt bakterij.

V magistrski nalogi smo sintetizirali nove zaviralce ligaze MurF z namenom izboljšanja zaviralnega delovanja. MurF je citoplazemski encim, ki s pomočjo ATP-ja pripenja D-Ala-D-Ala na monomerni gradnik peptidoglikana. Nove zaviralce smo načrtovali na osnovi že znanega cianotiofenskega zaviralca brez protibakterijskega delovanja. Zato smo se odločili, da cianotiofensi del zamenjamo z 1,5-benzodiazepinskim, na katerega smo pripenjali različne substituente. Na kislinskem delu pa smo izmenično uporabljali s klori substituirana benzen in tiofen.

Končnim spojinam smo nato določili zaviralno aktivnost na MurF iz *S. pneumoniae* in *E. coli* in ugotovili, da je spojina **14a** zavirala encim bakterije *E. coli* z IC₅₀ vrednostjo 106 µM. Spojina **14c** je tudi zavirala delovanje encima MurF iz *E. coli*, vendar slabše kot **14a**, saj je bila njena rezidualna aktivnost 58 % pri koncentraciji 100 µM. Aktivnost vseh spojin na MurF iz bakterije *S. pneumoniae* je bila nesignifikantna.

Ključne besede: MurF, *E. Coli*, 1,5- benzodiazepin, protibakterijsko delovanje

ABSTRACT

In the era before antibiotics, bacteria were the main cause of mortality. Discovery of antibiotics has brought a revolution in medicine and many lives have been saved. Unfortunately, the use of these »miracle remedies« has also developed resistant strains, which persistently expand due to excessive and inappropriate use of antibiotics. Development of new antibacterial agents, which interact with bacterial essential mechanisms, has become an important strategy to prevent the spread of diseases caused by bacteria. Peptidoglycan biosynthesis still remains a rich source of antibacterial targets, especially enzymes from cytoplasmic part of synthesis are unexploited. These are mainly Mur enzymes, which present perfect candidates for development of new agents, because their inhibition causes bacterial death.

In this thesis we synthesized new inhibitors of MurF ligase in order to improve inhibitory activity. MurF is a cytoplasmic enzyme, which adds D-Ala-D-Ala on a building block of peptidoglycan in the presence of ATP. The design of novel compounds was based on a structure of known cyanothiophene inhibitor with no antibacterial activity. Therefore, the cyanothiophene part was replaced by 1,5-benzodiazepine moiety with different substituents. At acid part we alternately used with chlorine substituted benzene and thiophene. Benzene and thiophene are bioisosters.

The inhibitory activity of synthesized compounds was determined on MurF from *S. pneumoniae* and *E. coli*. Compound **14a** inhibited the enzyme from *E. coli* with IC₅₀ of 106 µM. Compound **14c** showed weaker potency on the enzyme from *E. coli* than **14a** because its residual activity at 100 µM concentration was 58 %. None of the final compounds showed significant activity against MurF from bacteria *S. pneumoniae*.

Keywords: MurF, *E. Coli*, 1,5- benzodiazepine, antibacterial activity

SEZNAM OKRAJŠAV

AcCoA	acetil koencim A
ADP	adenozin difosfat
ATP	adenozin trifosfat
Ala	alanin
D-Ala-D-Ala	dipeptid D-alanil-D-alanin
D-Lac	D-laktat
Ddl	D-alanin:D-alanin ligaza
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO- <i>d</i> ₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPPA	difenilfosforil azid
ESI	ionizacija z razprševanjem ionov (»elektrospray ionization«)
FAD	flavin adenin dinukleotid
G+	po Gramu pozitivne bakterije
G-	po Gramu negativne bakterije
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
GlcNAc-1-P	<i>N</i> -acetilglukozamin-1-fosfat
GlmM	fosfoglukozamin mutaza
GlmS	glukozamin-6-fosfat sintaza
GlmU	encim glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza in <i>N</i> -acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferaza
Glu	glutaminska kislina
Gly	glicin
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HRMS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
Hz	Hertz
IC ₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
IR	infrardeči spekter
<i>J</i>	sklopitvena konstanta v Hertzih
Ki	inhibitorna konstanta

L-Ala	L-alanin
LPS	lipopolisaharid
L-Lys	L-lizin
<i>m</i> -A2pm	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
MF	mobilna faza
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
Mpl	muropeptidna ligaza
MraY	fosfo-MurNAc-pentapeptid translokaza
Mur	muramil ligaza
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruvil transferaza
MurB	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat L-alanin ligaza
MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanil D-glutamat ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamil <i>m</i> -diaminopimelat/L-lizin ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat- <i>m</i> -diaminopimelat/L-lizin D-alanil-D-alanin ligaza
MurF _{Sp}	MurF bakterije <i>S. pneumoniae</i>
MurF _{Ec}	MurF bakterije <i>E. coli</i>
MurG	<i>N</i> -acetilglukozamin transferaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NADP	nikotin amid adenin dinukleotid fosfat
NMR	jedrska magnetna resonanca
PBP	penicilin vezujoči protein (»penicillin binding protein«)
P _i	anorganski fosfat
ppm	število delcev na milijon (»parts per million«)
RA	rezidualna aktivnost
Rf	retencijski faktor
SAR	odnos med strukturo in delovanjem
Ser	serin
T _{tal}	temperatura tališča
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija (»Thin Layer Chromatography«)

TMS	tetrametilsilan
Tr	retencijski čas
UDP	uridin difosfat
UDP-GlcNAc	uridildifosfat- <i>N</i> -acetilglukozamin
UDP-MurNac	uridildifosfat- <i>N</i> -acetilmuraminska kislina
UMP	uridin monofosfat
UTP	uridin trifosfat
UV	ultravijolično
UV-VIS	ultravijolični-vidni

1. UVOD

1.1. *Antibiotiki*

Izraz antibiotik, ki se uporablja kot sinonim za protibakterijske učinkovine, označuje vsako kategorijo organskih molekul, ki zavira ali uniči bakterije zaradi specifičnih interakcij z bakterijskimi tarčami, pri čemer pa zaradi selektivne toksičnosti ne predstavlja resne nevarnosti za uporabnika. Izraz ne upošteva izvora spojin, kar pomeni, da se tako naravne kot popolnoma sintetične spojine klasificirajo kot antibiotiki. V velikem številu primerov so s kemijsko manipulacijo strukture naravnih antibiotikov izboljšali njihovo uporabnost tako, da so razširili spekter delovanja, povečali učinkovitost, zmanjšali toksičnost in olajšali aplikacijo zdravila (1, 2).

Boj proti bakterijami z antibiotiki se je začel z odkritjem sulfonamidov leta 1936 s pomočjo prejšnjih dognanj in teorij Paula Erlicha. Odkritje je bilo izrednega pomena, zato je bilo dve leti kasneje tudi nagrajeno z Nobelovo nagrado. Naslednje veliko odkritje je sledilo, ko je Robert Fleming leta 1929 opazil čisto območje v bakterijski koloniji okoli plesni *Penicillium* in tako je penicilin leta 1941 prestal klinično študijo ter postal najbolj uporabljen antibiotik. Kasneje so z namernim iskanjem mikrobnih metabolitov odkrili še tirotricin (1939), streptomycin (1943), kloramfenikol (1947), klortetraciklin (1948), neomicin (1949), eritromycin (1952) in druge, kar je sprožilo obdobje antibiotikov (1).

Protibakterijske učinkovine delimo lahko na bakteriostatične (učinkovina prepreči rast bakterij oziroma jih zadrži v stacionarni fazi rasti) in bakteriocidne (učinkovina uniči bakterije), čeprav v realnosti meja med njimi ni čisto jasna (3). Naslednja delitev je glede na kemijsko strukturo in obsega veliko skupin, ki pa jih bomo podali v oklepaju pri delitvi glede na bakterijsko tarčo oziroma mehanizem delovanja. Ti mehanizmi delovanja so:

1. Zaviranje bakterijske sinteze folata- folat je pomemben za sintezo DNA pri bakterijah in človeku, vendar človek pridobi folat s prehrano (sulfonamidi).
2. Zaviranje sinteze peptidoglikana v celični steni- peptidoglikan imajo samo bakterije, zaradi njegovega pomanjkanja pa celične stena ne vzdrži visokega notranjega osmotskega tlaka ter celica poči (β -laktami, glikopeptidi).
3. Poškodovanje struktur bakterijske zunanje membrane- poškodba zunanje membrane, ki je značilna samo za gram-negativne bakterije, povzroči smrt bakteriji (polimiksini).

4. Zaviranje bakterijske sinteze proteinov- ribosomi, ki so nujni za sintezo proteinov, se pri človeku in bakteriji razlikujejo, kar zagotovi osnovo za selektivno toksičnost (tetraciklini, aminoglikozidi, makrolidi, oksazolidini, amfenikoli, streptogramini).
5. Preprečevanje bakterijske DNA sinteze- z zaviranjem DNA giraze, ki jo imajo samo bakterije, se prepreči transkripcija in replikacija DNA (kinoloni).
6. Drugi mehanizmi (antimikrobakterijske učinkovine) (4).

1.2. Odpornost bakterij

Odpornost bakterij pomeni, da antibiotik, ki je prej uspešno zaustavljal rast in razvoj bakterij, zdaj na njih nima več učinka. Bakterije pridobijo odpornost na antibiotik z genetskimi spremembami, včasih tudi preko negenetskih mehanizmov, kot je zadrževanje bakterije v tkivih, ki ga antibiotik ne doseže, ali pa se pretvorijo v L obliko, ki ima malo celične stene in tako niso občutljive na protibakterijska sredstva z delovanjem na celično steno. Genetska odpornost nastane zaradi mutacije v kromosomalni DNA ali pa s pridobitvijo zunajkromosomalne DNA, prenaša pa se lahko horizontalno ali vertikalno. Zunajkromosomalna DNA je navadno v obliki plazmidov z odpornostjo ali R faktorjev, ki so večinoma krožne in dvoverižne oblike DNA sestavljene iz dveh komponent: faktor prenosa odpornosti in genov za odpornost, od katerih vsak podeli bakteriji odpornost za specifičen antibiotik. Prenos genetskega materiala med bakterijami poteka s konjugacijo, transformacijo in transdukциjo. Konjugacija, ki poteka preko formacije pilusa med dvema bližnjima bakterijama, je najpomembnejša in najpogostejsa za prenos plazmidov z odpornostjo. Pri transformaciji bakterija prosto DNA, ki običajno izvira iz odmrle bakterije, prevzame v citoplazmo in vgradi v lastno DNA. Pri tretjem načinu, transdukciiji, se genetski prenos ustvari preko bakteriofaga, ki okuži bakterijo s svojim genetskim materialom, kateri lahko vsebuje gen za odpornost. Bakteriofag v večini primerov prevzame bakterijski reprodukcijski sistem za lastno namnožitev (5, 6).

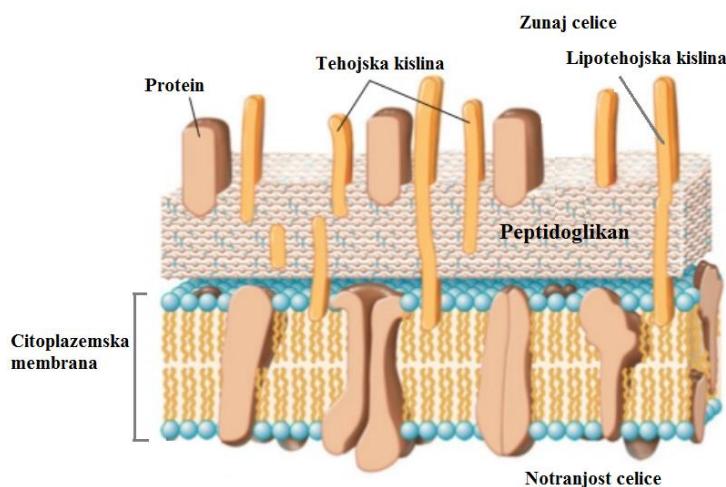
Odkritih je šest različnih mehanizmov, s pomočjo katerih bakterije kljubujejo antibiotikom. Bakteriji lahko manjka katera od struktur, ki jo antibiotik zavira, kot na primer pri mikoplazmah, ki so brez celične stene, kar zagotavlja odpornost proti β -laktamom. Naslednja lastnost je nepermeabilnost antibiotika v notranjost celice, predvsem pri gram-negativnih bakterijah zaradi dodatne zunanje celične membrane. Tretji mehanizem je pretvorba antibiotika v neaktivno obliko s pomočjo encimov, pri čemer so najbolj znane β -laktamaze, ki razcepijo β -laktamski obroč pri večini penicilinov. Bakteriji se lahko preko mutacij DNA

spremenijo proteini in vezavna mesta za antibiotike niso več primerna. Peti način je vzpostavitev nove biokemijske poti, ko so določeni mikroorganizmi namesto samostojne sinteze folne kisline, ki jo zavirajo sulfonamidne učinkovine, začeli privzemati folno kislino iz okolja. Zadnji mehanizem je sposobnost bakterij, da antibiotike, ki vstopijo v celico, prečrpavajo nazaj v okolje (7).

Glavni razlog za hiter razvoj odpornosti je neprimerna uporaba protimikrobnih učinkovin v medicini, veterini in agrikulturi, kar ustvari visoko selektivne pogoje za razširitev R-plazmidov. Ocenjenih je več milijonov ton antibiotikov, ki so bili sproščeni v biosfero v zadnjih petdesetih letih s komercialno proizvodnjo, kar naredi količino antibiotikov proizvedeno z organizmi v naravi nepomembno. V medicinske namene se še vedno uporablja preveč antibiotikov, saj so predpisani do 80 % z infekcijo obolenim posameznikom, čeprav jih je samo 20 % upravičenih. Poleg tega je do 50 % primerov, ko predpisani odmerki in trajanje zdravljenja nista ustrezna, vse skupaj pa še podkrepi nekomplianca pacienta, ki preneha z jemanjem antibiotika ob boljšem počutju, kar ohrani najbolj odporne bakterije in omogoči, da se razširijo. Okoli 50 % vseh antibiotikov po svetu je uporabljenih v živalski agrikulturi kot dodatki v prehrani za pospešeno rast in preventivo pred pojavom bolezni poleg njihove tradicionalne rabe za zdravljenje infekcij. Tudi raba v ribogojstvu in sadjarstvu ni tuja, kar je dokazan vzrok za zastrupitev s hrano zaradi selekcije patogenov odpornih na antibiotike. Krivdo tudi nosijo nekateri proizvajalci, ki svoje toksične odpadke, razkužila in ostanke pri procesih v velikih količinah sproščajo v okolje. Eden od ekstremnih primerov je bil v srednji Indiji, ko so farmacevtski proizvajalci dnevno v reko odvrgli 50 kg ciprofloxacin, vendar je lahko takih primerov še veliko neodkritih (2, 7).

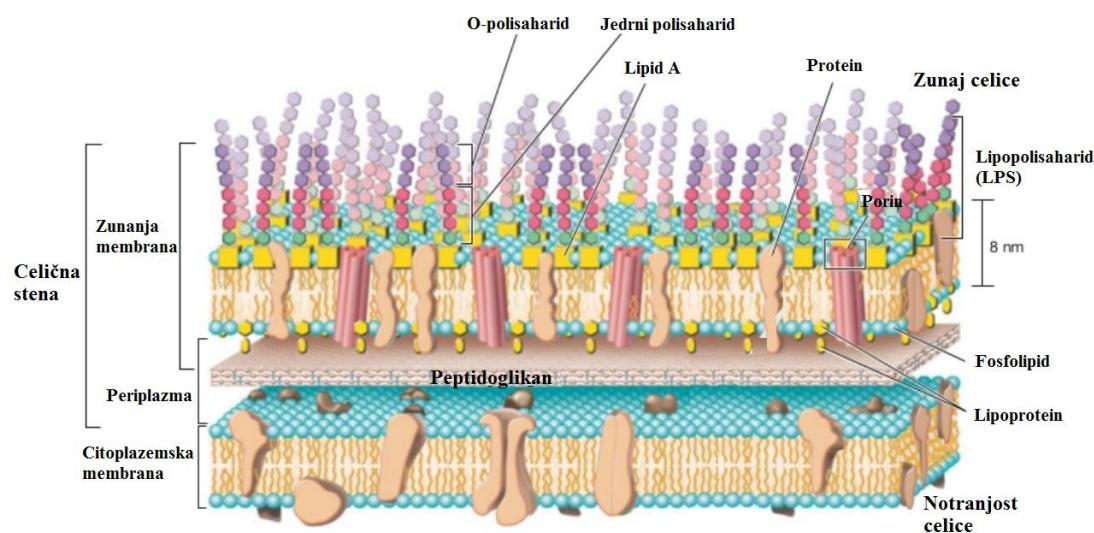
1.3. Bakterijska celična stena

Celična stena se nahaja na zunanjji strani membrane in je veliko močnejša plast kot membrana, kar daje celici obliko in struktorno moč. Organizmi iz vseh treh filogenetskih domen *Bacteria*, *Archea* in *Eukarya* imajo lahko celično steno, vendar se razlikujejo po molekuli v celični steni, ki daje to trdnost. V domenu *Bacteria* spadajo vsi znani patogeni prokarionti in njihova signaturna molekula je peptidoglikan, razen pri mikoplazmah, ki celične stene nimajo. Bakterijske vrste razdelimo v dve glavni skupini imenovani gram-pozitivne in gram-negativne bakterije, pri čemer jih ločimo po razlikah v strukturi celične stene, kar nam prikaže reakcija pri barvanju po Gramu (6, 7).



Slika 1: Struktura celične stene gram-pozitivne membrane (Prizrejeno po (8)).

Pri gram-pozitivnih bakterijah celično steno (Slika 1) sestavlja v 90 % peptidoglikan, ki je naložen po plasteh drug nad drugega do okoli 25 plasti. Večina teh bakterij ima v svoji celični steni vstavljenje tehojske kisline, ki vsebujejo glicerolfosfat ali ribitolfosfat. Polialkoholi so povezani preko fosfatnih estrov in imajo v strukturi pritrjene še druge sladkorje in D-alanin. Tehojska kislina je kovalentno vezana na muraminsko kislino peptidoglikana, v nekaterih primerih pa tudi na membranske lipide, zato se ta imenuje lipotehojska kislina. Zaradi negativnega naboja tehojske kisline je posledično tudi celična stena negativno nabita, tako se lahko vežeta kalcijev in magnezijev kation, ki se preneseta v celico (6, 7).



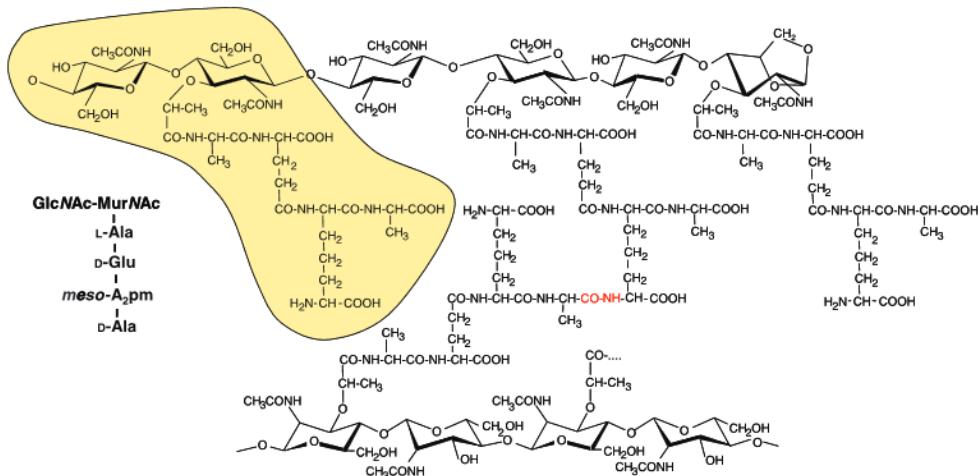
Slika 2: Struktura celične stene gram-negativne bakterije (Prizrejeno po (8)).

Pri gram-negativnih bakterijah celično steno (Slika 2) sestavlja samo 10 % peptidoglikana, saj večinski delež zavzema zunanja membrana. Zunanja membrana je tako kot citoplazemska

sestavljeni iz lipidnega dvošloja in proteinov, hkrati pa še vsebuje porine in polisaharide. Polisaharidi so povezani z lipidi na zunanjji strani membrane in tako tvorijo komplekse imenovani lipopolisaharidi. Lipopolisaharidi, ki so sestavljeni iz O-polisaharida, jedrnega polisaharida in lipida A, zamenja večino fosfolipidov v zunanjji polovici zunanje membrane, medtem ko so na notranji polovici prisotni lipoproteini, ki držijo zunanjou membrano in peptidoglikan skupaj. Zunanja membrana ima strukturno funkcijo, preprečuje uhajanje proteinov iz periplazme in lastnost, da je toksična za živali. Toksičnost je povezana s plastjo LPS, natančneje s komponento lipid A, ki lahko povzroči neprijetne simptome pri ljudeh, predvsem probleme s prebavo (driska, bruhanje) (6, 7).

1.4. Peptidoglikan

Peptidoglikan je kompleksen heteropolimer (Slika 3) in nujna komponenta bakterijske celične stene, saj daje mehansko odpornost, ki vzdrži visok notranji osmotski pritisk, in vzdržuje obliko celice. Značilen je samo za večino prokarionskih celic iz domene *Bacteria*, zato z uporabo učinkovin, ki zavirajo njegovo biosintezo in sestavljanje, selektivno ciljamo na bakterije, ne da bi pri tem ogrožali človeka ali živali (9,10).



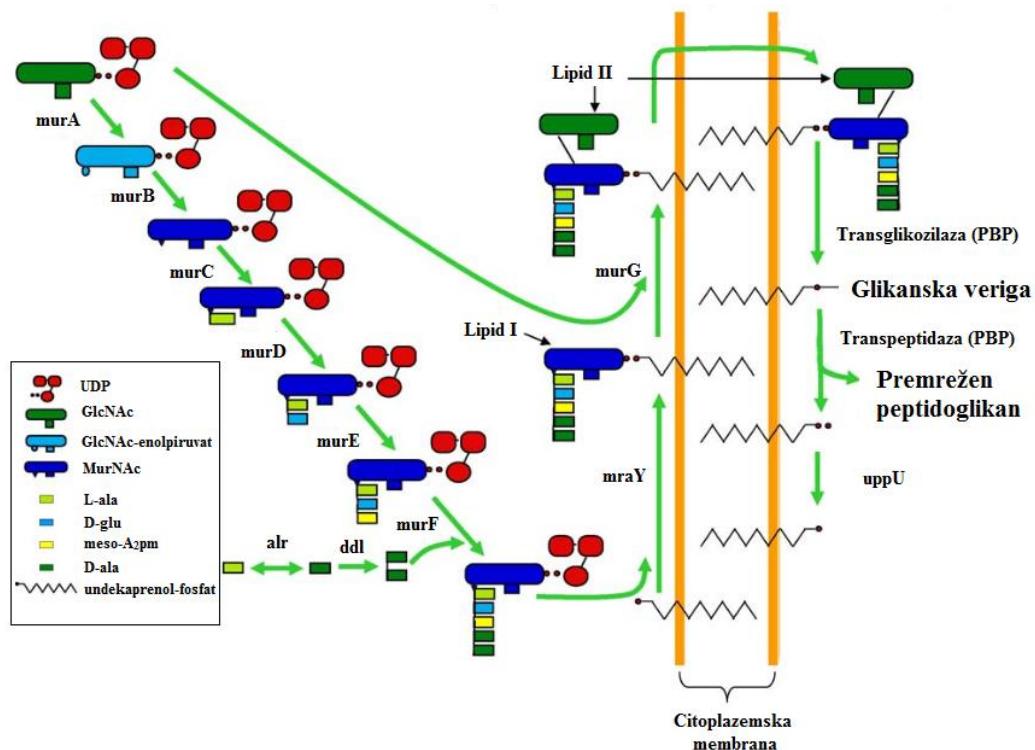
Slika 3: Struktura peptidoglikana bakterije *E. coli*. Rumeno označen del predstavlja osnovni disaharidni tetrapeptidni monomer. Srednji del prikazuje premrežen peptid, kjer je z rdečo označena amidna vez med alaninom ene verige in mezo-diaminopimelinsko kislino druge verige (Prizadeno po (11)).

Sestavljen je iz linearnih polisaharidov, ki so prečno premreženi s kratkimi peptidi. Polisaharidi so alternirajoča zaporedja *N*-acetilglukozamina in *N*-acetilmuramske kisline povezana z β 1 \rightarrow 4 glikozidno vezjo, pri čemer je na muramski del preko D-laktoilne skupine

pripet kratek pentapeptid, ki je najpogosteje v zaporedju L-Ala- γ -D-Glu-*mezo*-A₂pm (ali L-Lys)-D-Ala-D-Ala. Na koncu se odcepi zadnja aminokislina tako, da se lahko vzpostavi direktna povezava ali povezava preko drugega kratkega peptida med karboksilno skupino D-Ala na poziciji 4 prve verige ter amino skupino diaminokisline na poziciji 3 druge verige. Pri gram-negativnih bakterijah povezave potekajo direktno med D-Ala in ϵ -amino skupino *mezo*-A₂pm, medtem ko se pri gram-pozitivnih bakterijah na ϵ -amino skupino L-Lys veže peptid petih glicinov, ki se tvori preko homolognih neribosomskih glicinil-tRNA peptidiltransferaz femX, femA ter femB, in nastane most z vezavo peptida na D-Ala. V nekaterih gram-pozitivnih bakterijah je lahko most narejen iz serina, treonina, asparaginske kisline, lizina ali ornitina. Te mrežne povezave združijo polisaharide v makromolekularno mrežo z visoko natezno močjo in rigidnostjo (9, 10, 12).

Biosinteza peptidoglikana je kompleksen proces (Slika 4) in reakcije potekajo na različnih lokacijah. Sinteza nukleotidnih prekurzorjev poteka v citoplazmi, na notranji strani citoplazemske membrane nastane intermedijat vezan na lipid, medtem ko na zunanjih strani potekajo polimerizacijske reakcije. Začne se s pretvorbo D-fruktoze-6-fosfata v D-glukozamin-6-fosfat, katero katalizira dimerna amidotransferaza glukozamin-6-fosfat sintaza (GlmS) z uporabo L-glutamina kot vira dušika. Nato fosfoglukozamin mutaza (GlmM), ki je aktivna v fosforilizirani obliki, prenese fosfatno skupino iz mesta 6 na mesto 1. Bifunkcionalen encim *N*-acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferaza (GlmU) prevzame glukozamin-1-fosfat in najprej katalizira prenos acetila iz AcCoA na GlcN-1-P ter nastane *N*-acetilglukozamin-1-fosfat. Njegova naslednja funkcija je prenos uridildifosfata iz uridintrifosfata na GlcNAc-1-P ob prisotnosti Mg²⁺ tako, da nastane anorganski pirofosfat in eden od osnovnih gradnikov peptidoglikana UDP-GlcNAc. Ta del reakcije poteka tudi v evkariontskih celicah, ker je GlcNAc pomembna gradbena enota mnogih biomolekul kot na primer hitina in glikoproteina, vendar se sintezna pot močno razlikuje: za prenos acetila in uridildifosfata sta potrebna dva monofunkcionalna encima ter prenos acetila se zgodi na GlcN-6-P (10).

Naslednja stopnja je sinteza UDP-*N*-acetilmuraminske kisline iz UDP-GlcNAc s pomočjo MurA in MurB. MurA pripne enolpiruvat iz fosfoenolpiruvata na 3-hidroksi skupino začetne molekule, da nastane tetraedrični intermedijat, nato pa sledi eliminacija anorganskega fosfata. Nastali UDP-GlcNAc-enolpiruvat se reducira s pomočjo MurB preko dveh polovičnih reakcij: najprej se FAD, ki je stehiometrično vezan na protein, reducira v FADH₂ preko NADPH, nato pa še poteče redukcija substrata, da nastane laktilni eter UDP-MurNAc (10).



Slika 4: Shema glavnih korakov sinteze peptidoglikana v *E. coli* (Prirejeno po (13)).

Sledi pripenjanje pentapeptida po stopnjah na D-laktilno skupino UDP-MurNAc s pomočjo štirih esencialnih encimov znanih kot muramil ligaze (MurC, MurD, MurE in MurF), ki se po strukturi in mehanizmu delovanja skoraj ne razlikujejo, zato bodo kasneje v svojem poglavju podrobneje opisani. MurC pripne L-alanin, MurD D-glutaminsko kislino, sledi pripenjanje diaminokislina, ki je lahko *mezo*-diaminopimelinska kislina pri gram-negativnih bakterijah ali L-lizin pri gram-pozitivnih, s pomočjo MurE ter MurF, ki je temelj te naloge, pripne substrat D-Ala-D-Ala ter se tako konča sinteza v citoplazmi. Obstaja tudi peta ligaza Mpl, ki sodeluje pri recikliranju peptidoglikana in lahko pripenja direktno tripeptid L-Ala- γ -D-Glu-*mezo*-A₂pm (ali L-Lys) direktno na UDP-MurNAc. Sicer je neesencialen encim, ki se nahaja v nekaterih gram-negativnih bakterijah, zato ga ne bomo posebej poudarjali (10).

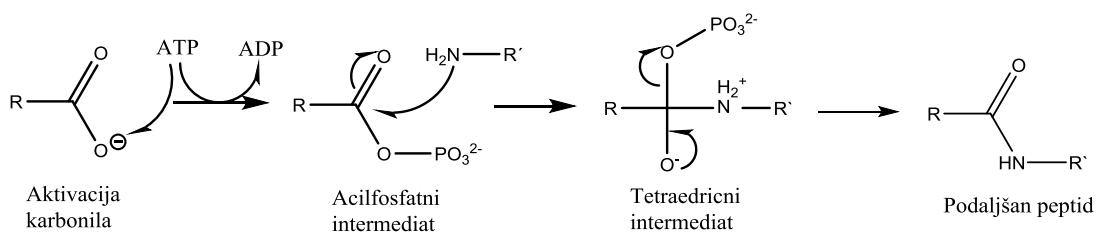
Dogajanje se preseli na citoplazemske membrano, natančneje na notranjo stran membrane, kjer se UDP-MurNAc-pentapeptid veže na membrano vezan lipidni prenašalec imenovan undekaprenol-fosfat (spojava iz 55 ogljikovih atomov, ki vsebuje 11 izoprenoidnih enot) s pomočjo integriranega membranskega proteina MraY. Odpade UMP in nastane Lipid I. V naslednji stopnji glikoziltransferaza MurG pripravi UDP-GlcNAc, kateremu odstrani UDP ter GlcNAc prenese na Lipid I, da se tvori β 1→4 povezan disaharid, ki se imenuje GlcNAc-MurNAc-pentapeptid in se skupaj z lipidnim prenašalcem imenuje Lipid II. Lipid II se nato premesti preko membrane in se s pomočjo penicilin-vezočih proteinov vgradi v nastajajočo

plast peptidoglikana preko tvorbe glikozidne vezi med disaharidnimi enotami in premreževanjem peptidnih repov, pri čemer se terminalni alanin odstrani. Na koncu še penicilin-vezoči proteini odcepijo lipidni prenašalec, ta pa se regenerira z odcepom anorganskega fosfata preko specifičnega lipidnega pirofosforilaznega encima UppU (12).

1.5. Muramil ligaze

Pod to poimenovanje spadajo encimi MurC, MurD, MurE in MurF, ki imajo med 15 % in 22 % podobnost aminokislinskega zaporedja. Pri sintezi peptidoglikana si pri gradnji peptidnega dela sledijo eden za drugim. Delijo si naslednje karakteristike:

- Imajo enak mehanizem delovanja (Slika 5), za katerega potrebujejo dva divalentna kationa, Mg^{2+} ali Mn^{2+} , pri čemer je eden med ATP in nukleotidnim substratom, drugi pa med β - in γ -fosfatno skupino ATP-ja. Tako se ustvari most med negativnimi skupinami, kar olajša vezavo substrata in potek reakcije, pri kateri se preko ATP-ja aktivira karboksilna skupina UDP-prekurzorja tako, da nastane intermedijat acil fosfat in ADP. Nastali intermedijat je dober elektrofil, zato podleže $S_{N}2$ nukleofilnemu napadu aminske skupine aminokisline ali dipeptida, da nastane tetraedrični intermedijat z visoko energijo, kar vodi do razpada na amid in anorganski fosfat. Za nastanek peptidne vezi je potrebna tudi katalitična baza, da sprejme proton iz nabite amino skupine kondenzirajoče aminokisline. Prenos protona na γ -fosfat ATP-ja ali Mur ligazo je malo verjetno zaradi prevelike porabe energije, zato predvidevajo, da aminokislinski substrat vstopa v encimsko reakcijo v deprotonirani obliki (10, 14).



Slika 5: Mehanizem reakcije pri muramil ligazah (Prirejeno po (14)).

- Poleg enotne primarne strukture vezavnega mesta za ATP imajo še drugih šest delov aminokislinskega zaporedja, ki so enaka, zato spadajo v novo družino encimov, katere del so še trije z biosintezo peptidoglikana nepovezani encimi (10).
- Tridimenzionalna struktura je pri vseh encimih enaka, sestavljena je iz treh domen, in sicer iz N-terminalne domene za vezavo UDP-prekurzorja, centralne domene za vezavo ATP-ja ter C-terminalne domene, ki je odgovorna za vezavo aminokisline ali

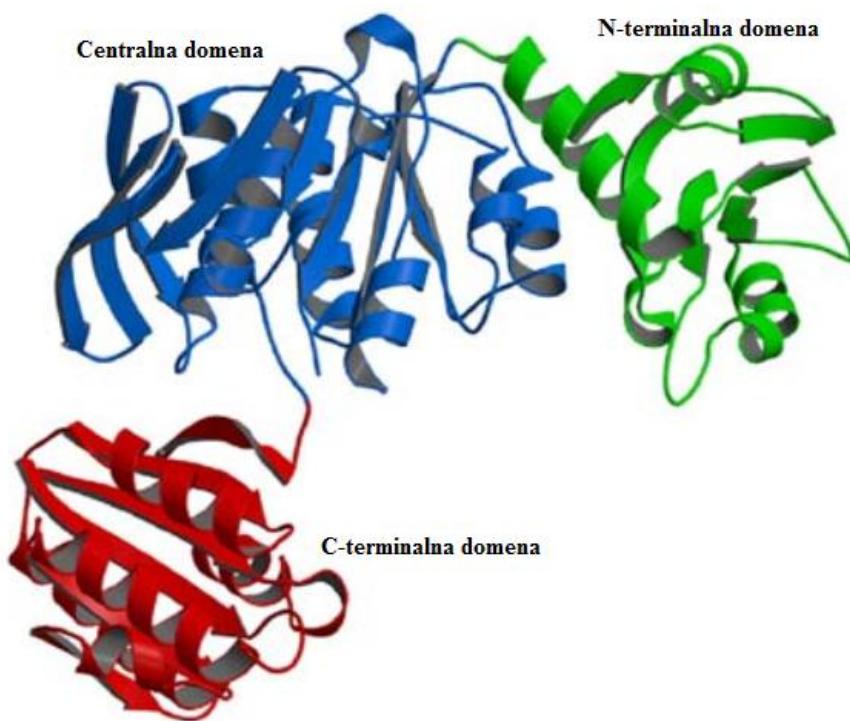
dipeptida. Topologija centralne in C-terminalne domene je zelo podobna pri vseh encimih, medtem ko se pri topologiji N-terminalne domene opazijo razlike. Razlika je zaradi različnih dolžin UDP-prekurzorja, pri čemer sta si podobna MurC in MurD na eni strani, na drugi pa MurE in MurF. Po vezavi liganda nastane zaprta konformacija encima (10).

1.6. *MurF*

MurF zaključi citoplazemske sinteze prekurzorja UDP-MurNAc-pentapeptida s pripajanjem dipeptida na produkt encima MurE. Reakcija je izrednega pomena pri sestavljanju peptidoglikana, saj je energija amidne vezi dipeptida nujna za premreževanje glikanskih verig v periplazmičnem prostoru, kjer ni ATP-ja. MurF ekskluzivno uporablja dipeptidne substrate sestavljene iz D-aminokislin in ima najširši razpon substratov izmed vseh ostalih Mur ligaz, pri čemer je D-Ala-D-Ala je najpogosteji. Pogosti kombinaciji sta tudi D-Ala-D-Ser in D-Ala-D-Lac pri sevih, ki so odporne na vankomicin, v stresnem okolju pa lahko integrirajo tudi nekanonične D-aminokisline kot na primer D-metionin. Obe obliki UDP-MurNAc-tripeptida, ki se na zadnji aminokislini razlikujeta (*mezo*-A₂pm ali L-Lys), sta enako učinkoviti kot substrata. MurF ima visoko stopnjo specifičnosti za C-terminalno aminokislino, kar je komplementarno specifičnosti na N-terminalno aminokislino D-Ala:D-Ala ligaze (Ddl), ki je pomembna za nastanek dipeptida iz dveh D-Ala. To ustvari mehanizem dvojnega preverjanja kar zagotovi, da se peptidni del večinoma konča z D-Ala-D-Ala (10, 14).

Encim je sestavljen iz treh domen (Slika 6), ki imajo strukturo odprte α/β -ploskovne domene. Pri *E. coli* ima MurF v zgradbi 452 aminokislin. Aminokisline 1 do 81 tvorijo topološko unikatno N-terminalno domeno, ki jo sestavlja β -ploskev iz petih paralelnih β -verig, ta pa je obkrožena s tremi α -heliksi. Zraven še spada zelo kratka β -ploskev iz dveh antiparalelnih verig pravokotno na glavno ploskev. Centralno domeno, ki jo sestavljajo aminokisline 82-310, gradi β -ploskev iz šestih paralelnih β -verig, katero obdaja osem α -heliksov, domeno pa s strani obdaja manjša β -ploskev iz treh antiparalelnih β -verig. Heliksi niso v interakciji samo s centralno β -ploskvijo, ampak tvorijo tudi dva snopa iz treh heliksov na vsaki strani ploskve. Pregib centralne domene spominja na običajen mononukleotiden-vezavni pregib kot pri večini proteinov, ki vežejo ATP. C-terminalno domeno iz aminokislin 311 do 447 gradi β -ploskev iz šestih β -verig, od katerih je ena antiparalelna in pet paralelnih, obkrožena pa je s petimi α -heliksi. Domene vsebuje dinukleotidni-vezavni pregib znan kot Rossmann-ov pregib. Domene se pri encimu brez vezanega liganda postavijo v obliko srpa, pri čemer sta N in C-terminalna

domena zadostno oddaljena, da se med njima ustvari površina dostopna za topilo in substrate (15). Da postane aktivno mesto učinkovito, se mora takšna oblika encima preurediti ob vezavi substrata v zaprto konformacijo, kjer se C-terminalna domena približa N-terminalni in centralni domeni. Substrati se vežejo po določenem zaporedju kot pri ostalih muramil ligazah, pri čemer se najprej veže ATP v centralni domeni, kar inducira zaprtje domen in dovoli ustrezeno vezavo UDP-MurNAc-tripeptida v N-terminalni domeni in na koncu še dipeptida, ki se ugnezdi v vezavno mesto C-terminalne domene (14).



Slika 6: MurF bakterije *E. coli* (Prirejeno po (12)).

1.7. Zaviralci MurF

Prvi zaviralci MurF bakterije *E. coli* so bili objavljeni leta 1998 v obliki psevdo-tri- in tetrapeptidov aminoalkilfosfinske kisline z osnovno strukturo X-Lys-PO2H-Gly-Ala. Ti tetraedrični analogi prehodnega stanja kažejo povečano vezavno afiniteto na aktivno mesto encima in delujejo kot reverzibilni kompetitivni zaviralci s Ki vrednostmi 200-700 μM , vendar imajo pomanjkanje protibakterijskega delovanja (16).

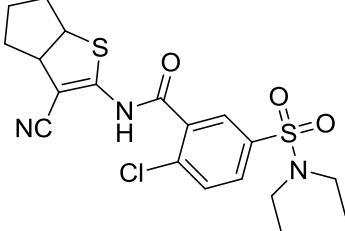
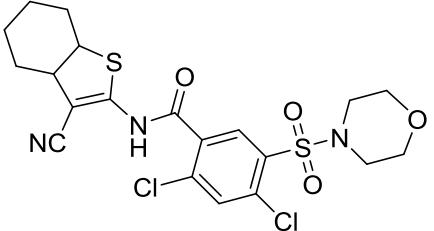
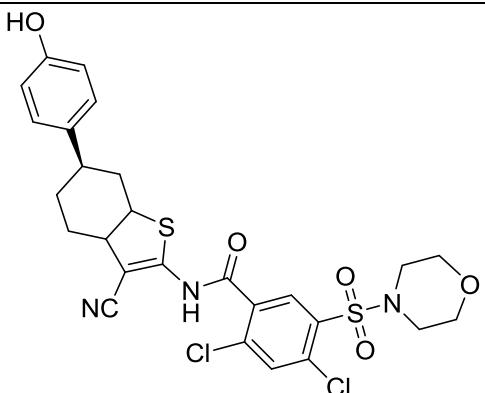
Z metodo visoko-zmogljivostnega afinitetnega rešetanja so v Abbott Laboratories odkrili dve obetavni spojini **1a** in **1b** cianotiofenskega skeleta z IC_{50} vrednostmi 8 μM in 1 μM za MurF. Strategija je vključevala rešetanje večjih mešanic različnih majhnih organskih molekul na tarčnem proteinu na osnovi ravnotežne vezave, ultrafiltriranja in identifikacije liganda z

masno spektroskopijo (17). Določili so kokristalne strukture teh dveh ligandov z encimom bakterije *S. pneumoniae* in ugotovili, da se vežeta v regijo za vezavo substrata in inducirata zaprtje domen, kar ustvari topološko kompaktno stanje, ki spominja na zaprto obliko prehodnega stanja sorodnih encimov s podobnim katalitičnim mehanizmom (18). Pridobljeno znanje je bilo osnova za strukturno optimizacijo, ki je obrodilo najmočnejši MurF zaviralec z IC_{50} 22 nM - **1c**. Vendar tudi najbolj potentne spojine iz te serije niso kazale signifikantnega protibakterijska učinka, niti v prisotnosti permeabilizatorja in niti pri mutiranih *E. coli*, ki imajo pomanjkljivo črpanje tujih snovi iz celice. Problem je lahko še zaradi neselektivne intracelularne vezave na druge proteine ali drugih neidentificiranih razlogov (19). Kljub pomanjkanju protibakterijskega delovanja se je iskanje novih cianotiofenskih analogov nadaljevalo. S strukturnimi modifikacijami spojin **1b** in **1c** so pridobili nanomolarne zaviralce MurF bakterije *S. pneumoniae* in mikromolarne zaviralce MurF bakterij *E. coli* in *S. aureus*. Nekatere so pokazale tudi protibakterijsko delovanje proti *S. pneumoniae* v koncentracijah od 16 µg/mL do 64 µg/mL (npr. **1d**), vendar nobena ni bila aktivna proti *E. coli* in *S. aureus* (20). Nedavno so sintetizirali drugo generacijo derivatov s povečano polarnostjo, ki so imeli enakovredne zaviralne lastnosti proti MurF bakterij *S. pneumoniae* in *E. coli*. Spojina **1e** ima tudi obetavno protibakterijsko delovanje proti določenim bakterijam, vendar je del baktericidnega delovanja posledica poškodovanja bakterijske citoplazemske membrane (21). Sledilo je še več zaviralcev MurF, ki so jih našli z različnimi metodami. Optimizacija zadetka strukturno podprtrega virtualnega rešetanja na MurF je prineslo odkritje srednje učinkovitih 1,3,5-triazinov – spojina **1f** (22), nedavno pa je virtualno rešetanje na osnovi liganda odkrilo zaviralec (spojava **1g**) na mikromolarnem nivoju proti encimu bakterij *S. pneumoniae* in *E. coli* (23). Pri podjetju Johnson&Johnson so odkrili vrsto MurF zaviralcev za *E. coli* na osnovi tiazolaminopirimidina, pri čemer je bila najbolj učinkovita spojina **1h** z IC_{50} 2,5 µM, vendar ta in ostale iz serije niso imele protibakterijskega učinka (24). Preko MurF vezavnega testa so identificirali več derivatov 8-hidroksikinolina, ki se vežejo na encim bakterije *E. coli* in eden od teh (spojava **1i**) je izkazal očitno protibakterijsko aktivnost (25). Kasneje so na osnovi 8-hidroksikinolinov konstruirali farmakoforni model in s pomočjo modela ustvarili dva diarilnakinolina, pri čemer je spojina **1j** imela MIK 8 µg/mL proti sevom *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* in meticilin odpornemu ter neodpornemu *S. aureus* (26).

Bakterijsko rast lahko ustavimo, če močno zaviramo posamezne Mur ligaze. Ker pa imajo vse štiri ligaze enak katalitičen mehanizem in si delijo ohranjena aminokislinska zaporedja ter strukturne elemente, lahko to izkoristimo za načrtovanje zaviralcev z delovanjem na več encimov, ki bi z delnim zaviranjem vsakega encima v koraku povzročili bakteriostatičen ali

bakteriolitičen učinek. Poleg tega bi razvoj odpornosti na zaviralce, ki delujejo na več ligaz hkrati, težje potekal, saj bi se morale mutacije, ki podelijo odpornost, zgoditi v isti bakterijski generaciji (14). Primer takšnega razmišljanja so fosforilirani hidroksietilamini, ki zavirajo MurC-F v mikromolarnih koncentracijah, in so obetavne spojine še za nadaljnjo strukturno optimizacijo. Spojina **1k** je pokazala najboljšo uravnoveženo zaviranje na vse štiri Mur encime (27). Nedavno so sintetizirali več hidroksi-substituiranih 5-benzilidenetiazolidin-4-onov, od katerih je najbolj učinkovit (spojina **1l**) aktiven proti MurD-F z uravnoveženimi IC₅₀ vrednostmi med 2 μM in 6 μM. Na žalost so spojine šibki zaviralci bakterijske rasti *in vitro* (28).

Tabela 1: Zaviralci MurF (Prirejeno po (17-28)).

Spojina	Struktura	IC ₅₀
1a		8 μM (<i>E. coli</i>)
1b		1 μM (<i>E. coli</i>)
1c		22 nM (<i>E. coli</i>)

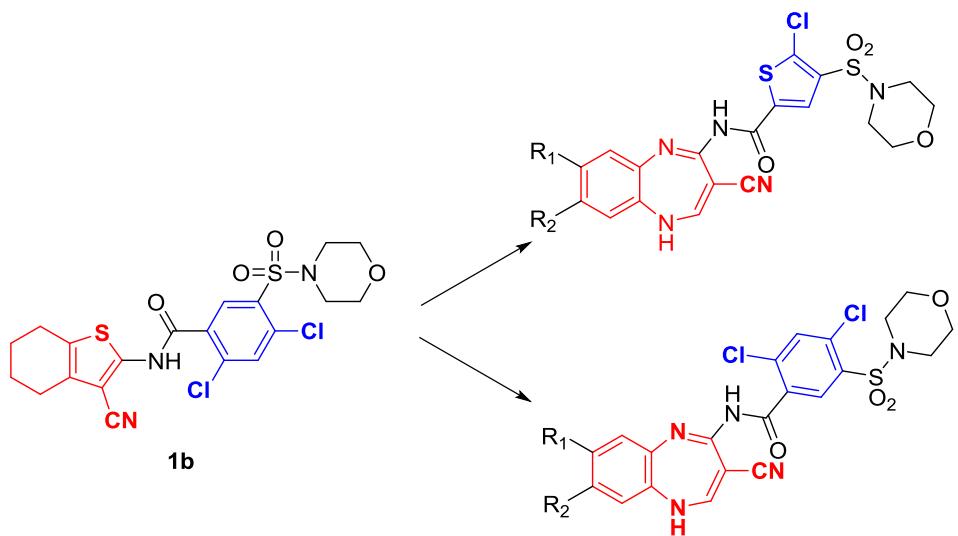
1d		420 nM (<i>S. pneumoniae</i>) 81 µM (<i>E. coli</i>)
1e		20 µM (<i>S. pneumoniae</i>) 25 µM (<i>E. coli</i>)
1f		450 µM (<i>E. coli</i>)
1g		126 µM (<i>S. pneumoniae</i>) 56 µM (<i>E. coli</i>)
1h		2,5 µM (<i>E. coli</i>)

<u>1i</u>	<p>Chemical structure of compound 1i: 2-(4-methoxyphenyl)-6-methoxy-3-hydroxy-N-phenylquinalidine.</p>	16 μM (<i>E. coli</i>)
<u>1j</u>	<p>Chemical structure of compound 1j: 2-(4-methoxyphenyl)-6-((S)-1-((S)-1-phenylpropyl)propan-2-yl)quinalidine.</p>	29 μM (<i>E. coli</i>)
<u>1k</u>	<p>Chemical structure of compound 1k: 2-(4-(trifluoromethyl)benzyl)-N-(2-hydroxyethyl)-N-(2-hydroxyethyl)-N-methylpiperazine-1-sulfonamide.</p>	240 μM (<i>E. coli</i>)
<u>1l</u>	<p>Chemical structure of compound 1l: 2-hydroxy-3-(4-hydroxyphenyl)-5-thioxo-3,5-dihydro-1H-pyrazine-4-carboxamide.</p>	2 μM (<i>E. coli</i>)

2. NAMEN DELA

Namen te magistrske naloge je sinteza novih zaviralcev ligaze MurF z močnejšo zaviralno aktivnostjo na osnovi že znanega cianotiofenskega zaviralca **1b**. Postavili smo si sledeče cilje:

1. Večjo jakost zaviralnega delovanja encima MurF želimo doseči z vključitvijo 1,5-benzodiazepinskega skeleta, ki je vsestranski farmakofor s širokim spektrom bioloških aktivnosti in terapevtskih učinkov, ugotovili pa so tudi, da poseduje tudi izjemno protiglivno in protibakterijsko delovanje z nizko toksičnostjo na celice gostitelja (29, 30). 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-3-karbonitril bomo zamenjali z 1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-3-karbonitrilom (Slika 7), saj je obetaven farmakofor ter po velikosti in orientaciji ciano in amino skupine podoben prvotnemu delu, zaradi česar ne bi smeli zmanjšati učinkovitosti. Prisotnost in pravilna orientacija ciano in amino skupine, ki tvori amidno vez s preostalim delom molekule, je nujna za aktivnost spojine zaradi tvorbe vodikovih vezi z encimom (19).
2. Razvili bomo sintezni postopek za pripravo spojin z 1,5-benzodiazepinskim skeletom. Na 7. in 8. mesto 1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-3-karbonitrila bomo pripenjali različne substituente, s čimer bomo poskušali povečati zaviranje encima. Pri nekaterih končnih spojinah bomo namesto 1,3-diklorobenzena uporabili 2-klorotiofen (Slika 7), saj sta benzen in tiofen bioizosterno zamenljiva (1), ohranili pa bomo en klor, ki je pomemben za učinkovitost zaviralca, ker sili aromat v nekoplarnarno pozicijo z amidnim povezovalcem (19). Morfolin bomo obdržali pri vseh končnih spojinah, saj dokazano najbolje vpliva na aktivnost (20).
3. Po končani sintezi bomo končnim spojinam ovrednotili zaviralno aktivnost na encimih MurF iz bakterij *S. pneumoniae* in *E.coli*. Aktivnim spojinam bomo tudi določili vrednost IC₅₀. S pomočjo rezultatov bomo vrednotili vpliv 1,5-benzodiazepinskega skeleta na zaviralno delovanje.



Slika 7: Načrtovane spremembe molekule **1b**, kjer rdeča in modra barva predstavlja dele molekul, ki jih bomo spremenjali.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

V laboratoriju smo pri delu uporabljali reagente, topila in snovi različnih proizvajalcev (Fluka, Acros, Sigma-Aldrich, Merck Apollo Scientific). Brezvodni dimetilformamid in diklorometan smo pripravili s pomočjo molekularnih sit, ki smo jih skupaj s topilom pustili v steklenici čez noč. Raztopine, ki smo jih uporabili pri ekstrahiranju, smo pripravili z ustreznim raztopljanjem in redčenjem koncentrirane HCl, citronske kisline, NaOH, NaHCO₃ in NaCl.

3.2. Metode

3.2.1. Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija: Za spremljanje poteka reakcij smo uporabljali plošče TLC-Silica gel 60 GF₂₅₄ z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Spojine smo opazovali pod UV svetlobo valovnih dolžin 254 nm in 366 nm. Za boljšo identifikacijo smo uporabili orositvena reagenta ninhidrin in bromkrezol zeleno. Izbrali smo mobilno fazo, pri kateri so se spojine dobro ločile, da smo lahko ugotovili nastanek produkta.

Kolonska »flash« kromatografija: Nekatere spojine smo dodatno očistili s pomočjo kolonske »flash« kromatografije. Stacionarna faza je bila silikagel 60 proizvajalca Merck (velikost delcev 0,04-0,063 mm). Mobilna fazo smo izbrali glede na ustrezeno retencijo in ločbo spojin.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC): Za določanje retencijskega časa (pomeben za identifikacijo) smo uporabili napravo Agilent Technologies HP 1100 z G1365 UV-VIS spektrofotometrom (220 nm, 254 nm), pri čemer smo 10 µL vzorca injicirali na 25 °C termostatirano kolono Agilent Eclipse Plus C18 (5 µm, 4,6 × 150 mm). Mobilna faza je bila mešanica 0,1 % trifluorocetne kisline vodi in acetonitrila. V času 0 do 19 minut se je koncentracija acetonitrila gradientno povečala od 20 % na 90 %, med 19 in 20 minuto pa je bila konstantno 90 %.

3.2.2. Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR): ^1H -NMR in ^{13}C -NMR spektre smo posneli s pomočjo spektrometra Brucker Avance III na Fakulteti za farmacijo pri frekvenci 400 MHz ozziroma 100 MHz. Pred analizo je bilo potrebno raztavljanje vzorcev, za kar smo uporabili devterirana topila TFA in DMSO- d_6 . Kot interni standard smo uporabili TMS, glede na katerega smo določili kemijske premike v enotah ppm. Sklopitvene konstante so podane v Hz. Signali so poimenovani glede na število in obliko vrhov: singlet (s), razširjen singlet (rs), dublet (d), dublet dubleta (dd), dublet tripla (dt), tripla (t), tripla dupleta (td) in multiplet (m). Spektre smo obdelali s programom MestReNova 8.1 proizvajalca Mestreclab Research.

Masna spektroskopija: Masne spektre so posneli v Centru za masno spektroskopijo z masnim spektrometrom Waters Micromass Q-ToF Premier™ (Manchester, Velika Britanija) na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani. Na spojinah so opravili ESI-HRMS meritve.

Infrardeča spektroskopija: Spektre smo posneli na napravi Perkin-Elmer, FT-IR System, Spectrum BX na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

3.2.3. Določanje temperature tališča

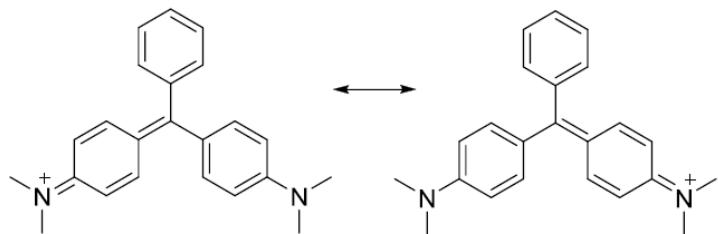
Spojinam smo določili nekorigirano temperaturo tališča s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

3.2.4. Poimenovanje in risanje spojin

Spojine smo risali in poimenovali s pomočjo programa ChemBioDraw Ultra 13.0 proizvajalca Cambridge Soft.

3.2.5. Testiranje na izoliranem encimu MurF

Končnim spojinam so določili zaviralno aktivnost na izoliranem encimu MurF iz bakterij *S. pneumoniae* in *E. coli*. Pri testu se določa sproščeni anorganski fosfat s pomočjo barvila malahit zeleno (Slika 8). Anorganski fosfat pa nastane z MurF katalizirano tvorbo amidne vezi med karboksilno kislino UDP-tripeptida in amino skupino D-Ala-D-Ala.



Slika 8: Struktura barvila malahit zeleno.

Reakcijska zmes za inkubacijo encima, ki je imela volumen 50 µL, je vsebovala:

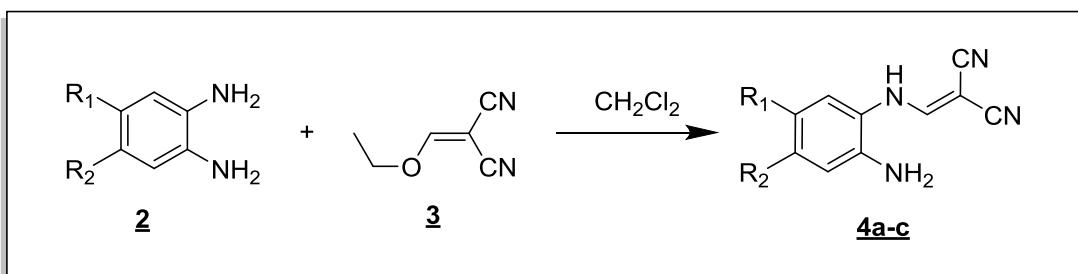
1. MurF iz *S. pneumoniae*: pufer mM Hepes, pH 8,0; 50 mM MgCl₂; 0,005 % Triton X-114; 100 µM D-Ala-D-Ala; 50 µM UDP-tripeptid-L-Lys; 250 µM ATP; očiščen MurF_{Sp} in 100 µM testirane spojine raztopljene v DMSO.
2. MurF iz *E. coli*: pufer 50 mM Hepes; pH 8,0; 50 mM MgCl₂; 0,005 % Triton X-114; 600 µM D-Ala-D-Ala; 100 µM UDP-tripeptid-*mezo*-A₂pm; 500 µM ATP; očiščen MurF_{Ec} in 100 µM testirane spojine raztopljene v DMSO.

V obeh primerih je bila koncentracija DMSO 5 % (v/v). Encimsko reakcijo, ki je potekala pri 37 °C, so ustavili z dodatkom reagenta Biomol® po 15 minutni inkubaciji. Sproščen anorganski fosfat tvori z molibdatom fosfomolibdat, ta pa se s tremi molekulami malahit zelenega poveže v obarvan kompleks, ki se ga določi spektrofotometično pri 650 nm. Z dodatkom zaviralca se aktivnost encima zmanjša in posledično se zmanjša tudi količina sproščenega anorganskega fosfata v primerjavi s kontrolnim vzorcem brez dodatka zaviralca. Razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti zaviralca in aktivnostjo brez zaviralca imenujemo rezidualna aktivnost (RA) in je izražena v odstotkih. Rezidualne aktivnosti so določili pri koncentraciji 100 µM zaviralca, aktivnim spojinam pa so določili še vrednost IC₅₀, to je koncentracija spojine, pri kateri je rezidualna aktivnost 50 %.

Testiranje na izoliranem encimu MurF je opravila asist. Kaja Rožman, mag. farm. na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. Sinteza derivatov 2-(((2-aminofenil)amino)metilen)malononitrila (4a-c)



produkt	R ₁	R ₂
4a	H	H
4b	Cl	Cl
4c	COOMe	H

Ustrezen derivat 1,2-diaminobenzena (20 mmol) (**2**) smo s segrevanjem raztopili v brezvodnem diklorometanu (30 mL) in v bučki zagotovili argonovo atmosfero. Po ohladitvi na sobno temperaturo smo počasi dodali etoksimetilenmalononitril (2,44 g; 20,0 mmol) (**3**) v roku 5 minut. Reakcijsko zmes smo mešali 3 ure pri sobni temperaturi.

Nastalo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, spirali z ohlajenim diklorometanom ter na koncu posušili v vakuumu v eksikatorju s P₂O₅ čez noč.

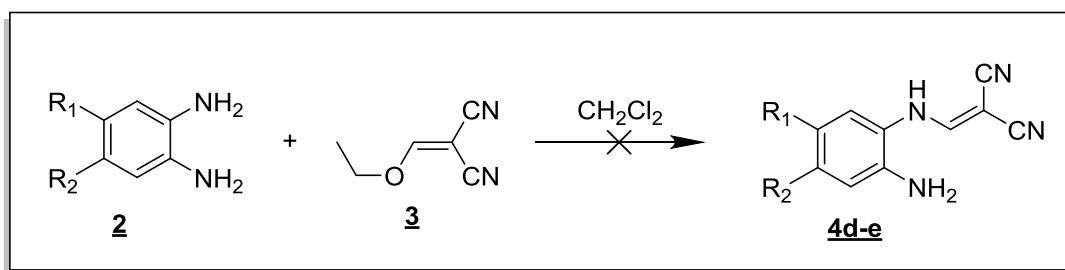
2-(((2-Aminofenil)amino)metilen)malononitril (Spojina 4a)	
Izkoristek reakcije	79 %
Izgled	Bledo rumena amorfnna snov
Retencijski faktor	0,71 (EtOAc)
Temperatura tališča	99-102 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm)= 5,31 (rs, 2H, NH ₂); 6,57-6,61 (m, 1H, Ar-H); 6,75 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,0 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,3 Hz, 1H, Ar-H); 6,98-7,02 (m, 1H, Ar-H); 7,07 (dd, <i>J</i> ₁ = 7,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,4 Hz, 1H, Ar-H); 8,06 (s, 1H, N-CH=C); 10,25 (d, <i>J</i> = 7,5 Hz, 1H, NH).

IR: ν_{max} (cm⁻¹)	3431, 3357, 3262, 2204, 1627, 1503, 1460, 1439, 1315, 1284, 1219, 1184, 995, 934, 748, 688.
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₁₀ H ₇ N ₄ [M-H] ⁻ (m/z): 183,0671
	Izmerjena vrednost (m/z): 183,0676

2-(((2-Amino-4,5-diklorofenil)amino)methilen)malononitril (Spojina 4b)	
Izkoristek reakcije	76 %
Izgled	Rjava amorfna snov
Retencijski faktor	0,74 (EtOAc)
Temperatura tališča	148-152 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ (ppm)= 5,71 (rs, 2H, NH ₂); 6,93 (s, 1H, Ar-H); 7,43 (s, 1H, Ar-H); 8,11 (rs, 1H, N-CH=C); 10,34 (rs, 1H, NH).
IR: ν_{max} (cm⁻¹)	3455, 3370, 3186, 3035, 2228, 2212, 1653, 1493, 1448, 1400, 1359, 1331, 1293, 1260, 1177, 1142, 1002, 961, 893, 872, 849, 739, 682.
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₁₀ H ₅ Cl ₂ N ₄ [M-H] ⁻ (m/z): 250,9891
	Izmerjena vrednost (m/z): 250,9897

Metil 4-amino-3-((2,2-dicianovinil)amino)benzoat (Spojina 4c)	
Izkoristek reakcije	94 %
Izgled	Bledo rumena amorfna snov
Retencijski faktor	0,67 (EtOAc)
Temperatura tališča	127-130 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ (ppm)= 3,77 (s, 3H, COOCH ₃); 6,18 (rs, 2H, NH ₂); 6,75 (d, <i>J</i> = 9,2 Hz, 1H, Ar-H); 7,60-7,66 (m, 2H, 2x Ar-H); 8,13 (d, <i>J</i> = 12,7 Hz, 1H, N-CH=C); 10,26-10,34 (m, 1H, NH).
IR: ν_{max} (cm⁻¹)	3426, 3346, 3239, 2225, 2209, 1704, 1634, 1608, 1581, 1519, 1431, 1308, 1266, 1192, 1154, 1112, 983, 926, 829, 763, 710.
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₁₂ H ₉ N ₄ O ₂ [M-H] ⁻ (m/z): 241,0726
	Izmerjena vrednost (m/z): 241,0721

4.1.1. Neuspele reakcije

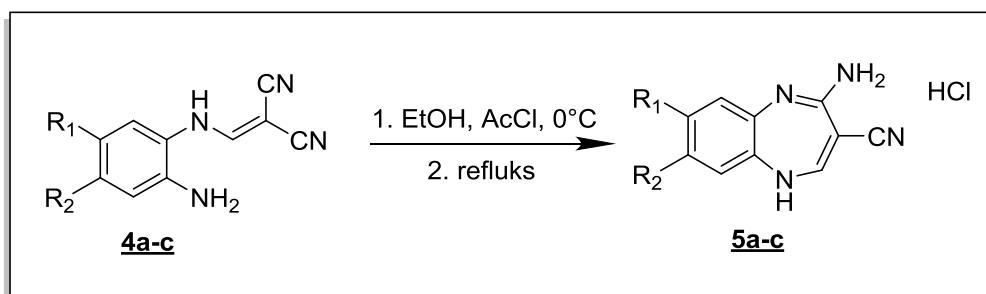


produkt	\mathbf{R}_1	\mathbf{R}_2
4d		
4e	H	NO_2

Sinteza 2-((3-aminonaftalen-2-il)amino)metilen)malononitril (**4d**) ni uspela, saj se 2,3-diaminonaftalen ni topil v diklorometanu. Topilo smo zamenjali z mešanico topil tetrahidrofurana, dimetilformamida in diklorometana v razmerju 10: 3: 5, pri čemer se je reagent dobro topil, vendar reakcija kljub temu ni potekla. Predvidevamo, da je bil razlog star in nečist reagent.

Sinteza 2-((2-amino-4-nitrofenil)amino)metilen)malononitrila (**4e**) ni uspela, čeprav sta reagenta bila dobro topna v diklorometanu. Sumimo zmanjšano nukleofilnost amino skupine 4-nitro-1,2-diaminobenzena zaradi negativnega induktivnega efekta nitro skupine.

4.2. Sinteza derivatov 4-amino-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-3-karbonitrila (**5a-c**)



produkt	\mathbf{R}_1	\mathbf{R}_2
5a	H	H
5b	Cl	Cl
5c	COOMe	H

Etanol (45 mL) smo odmerili v bučko, v kateri smo nato zagotovili argonovo atmosfero ter jo postavili na ledeno kopel. Med mešanjem smo po kapljicah v roku 10 minut dodali acetil klorid (1,27 mL; 17,4 mmol). Nato smo bučko prestavili na oljno kopel in pri temperaturi 35 °C dodali ustrezni derivat 2-(((2-aminofenil)amino)metilen)malononitrila (15,9 mmol) (**4a-c**). Bučko smo opremili z vodnim povratnim hladilnikom in nastalo suspenzijo segrevali pri temperaturi 90 °C čez noč.

Naslednji dan smo bučko postavili na led, da se je ohladila. Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, spirali z ohlajenim etanolom ter posušili v vakuumu v eksikatorju s P₂O₅ čez noč.

4-Amino-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]diazepin-3-karbonitril hidroklorid (Spojina 5a)	
Izkoristek reakcije	84 %
Izgled	Živo oranžna amorfna snov
Retencijski faktor	0,43 (DKM: MeOH: EtN ₃ = 9: 1: 0,5)
Temperatura tališča	>300 °C (razpad spojine)
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ (ppm)= 6,82 (dd, <i>J</i> ₁ = 7,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,4 Hz, 1H, Ar-H); 6,88 (dd, <i>J</i> ₁ = 7,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,5 Hz, 1H, Ar-H); 7,01 (td, <i>J</i> ₁ = 7,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,5 Hz, 1H, Ar-H); 7,09 (td, <i>J</i> ₁ = 7,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,5 Hz, 1H, Ar-H); 7,41 (s, 1H, CH); 8,87 (rs, 1H, NH); 8,98 (rs, 1H, NH); 10,89 (rs, 1H, NH); 11,15 (rs, 1H, NH).
IR: ν_{max} (cm⁻¹)	3295, 2831, 2211, 1658, 1630, 1610, 1590, 1566, 1510, 1469, 1365, 1275, 1246, 1167, 1095, 935, 847, 801, 754, 654.
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₁₀ H ₉ N ₄ [M+H] ⁺ (m/z): 185,0827 Izmerjena vrednost (m/z): 185,0831

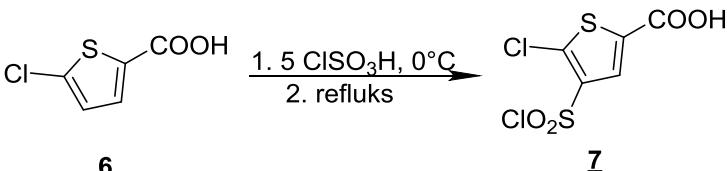
4-Amino-7,8-dikloro-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-3-karbonitril hidroklorid (Spojina **5b**)

Izkoristek reakcije	43 %
Izgled	Rjava amorfna snov
Retencijski faktor	0,49 (DKM: MeOH: EtN ₃ = 9: 1: 0,5)
Temperatura tališča	>300 °C (razpad spojine)
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ (ppm)= 7,00 (s, 1H, Ar-H); 7,10 (s, 1H, Ar-H); 7,48 (s, 1H, CH); 9,08 (rs, 1H, NH); 9,16 (rs, 1H, NH); 11,33 (rs, 2H, NH ₂).
IR: ν_{max} (cm⁻¹)	3033, 2222, 1672, 1629, 1608, 1588, 1562, 1498, 1459, 1361, 1288, 1260, 1152, 1103, 960, 884, 750, 691, 625.
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₁₀ H ₅ Cl ₂ N ₄ [M-H] ⁻ (m/z): 250,9891
	Izmerjena vrednost (m/z): 250,9886

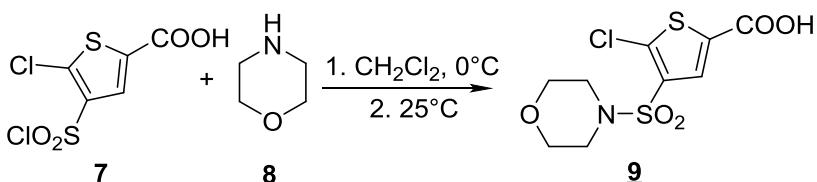
Metil 4-amino-3-ciano-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-7-karboksilat hidroklorid (Spojina **5c**)

Izkoristek reakcije	75 %
Izgled	Oranžna amorfna snov
Retencijski faktor	0,60 (DKM: MeOH: EtN ₃ = 9: 1: 0,5)
Temperatura tališča	>300 °C (razpad spojine)
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ (ppm)= 3,82 (s, 3H, COOCH ₃); 6,91 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 1H, Ar-H); 7,44 (s, 1H, CH); 7,46 (d, <i>J</i> = 1,9 Hz, 1H, Ar-H); 7,62 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,9 Hz, 1H, Ar-H); 9,15 (rs, 2H, NH ₂); 11,19 (rs, 2H, NH ₂).
IR: ν_{max} (cm⁻¹)	2825, 2222, 1716, 1675, 1620, 1576, 1521, 1458, 1435, 1399, 1369, 1292, 1252, 1195, 1141, 1115, 1081, 980, 902, 826, 760, 704, 623.
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₁₂ H ₉ N ₄ O ₂ [M-H] ⁻ (m/z): 241,0726
	Izmerjena vrednost (m/z): 241,0719

4.3 Sinteza 5-kloro-4-(morfolinosulfonil)tiofen-2-karboksilne kislino (**9**)



Bučko smo ohladili na ledeni kopeli, v katero smo nato odmerili klorosulfonsko kislino (4,12 mL; 61,2 mmol). Med mešanjem smo počasi dodali 5-klorotiofen-2-karboksilno kislino (2,0 g; 12,3 mmol) (**6**). Po dodatku smo bučko opremili z vodnim povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter segrevali pri temperaturi $140\text{ }^\circ\text{C}$ čez noč. Naslednji dan smo bučko ohladili na ledu, nato pa vsebino zlili v čašo z 10 g ledu. Nastalo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, spirali z ledeno vodo in jo takoj uporabili v naslednji stopnji.

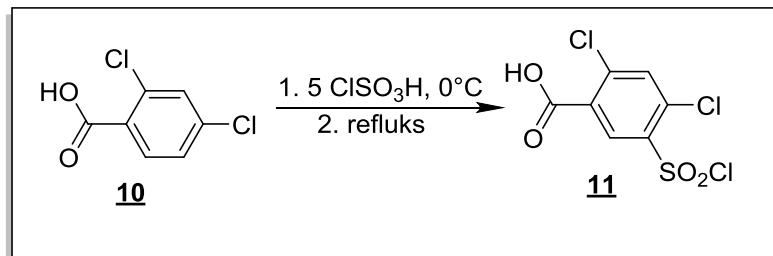


5-Kloro-4-(klorosulfonil)tiofen-2-karboksilno kislino (0,70 g; 2,7 mmol) (**7**) smo raztopili v 10 mL diklorometana ter bučko postavil na ledeno kopel. Po kapljicah smo med mešanjem dodajali morfolin (0,82 mL; 9,4 mmol) (**8**) in reakcijsko zmes mešali še 15 minut na ledeni kopeli, nato pa še 2 uri pri sobni temperaturi. Potem smo dodali še enkrat morfolin (0,47 mL; 5,4 mmol) (**8**) in mešali pri sobni temperaturi še nadaljnjo uro.

Pri izolaciji smo reakcijski zmesi dodali 10 mL 3 M HCl in s pomočjo lij ločnika ločili fazi. Vodno fazo smo nato še spirali z diklorometanom (4 x 10 mL) in združili organske faze. Združene organske faze smo spirali z 20 ml nasičene raztopine NaCl, sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali in odparili topilo.

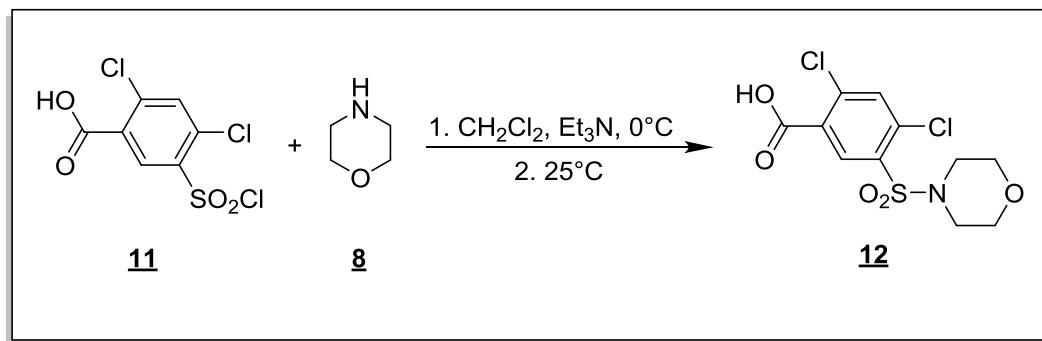
5-Kloro-4-(morfolinosulfonil)tiofen-2-karboksilna kislina (Spojina 9)	
Izkoristek reakcije	68 %
Izgled	Bela amorfna snov
Retencijski faktor	0,26 (EtOAc: MeOH= 3: 1)
Temperatura tališča	186-188 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm)= 3,01-3,04 (m, 4H, 2x CH ₂ -N); 3,63-3,66 (m, 4H, 2x CH ₂ -O); 7,24 (s, 1H, Ar-H). (1H od COOH je izmenjan)
IR: ν _{max} (cm ⁻¹)	2966, 2855, 2360, 1679, 1531, 1425, 1403, 1356, 1302, 1261, 1173, 1152, 1111, 1073, 1043, 941, 870, 846, 766, 750, 724, 643.
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₉ H ₁₀ ClNO ₅ S ₂ [M+H] ⁺ (m/z): 311,9767 Izmerjena vrednost: 311,9770

4.4. Sintesa 2,4-dikloro-5-(morfolinosulfonil)benzojske kisline (**12**)



Bučko smo ohladili na ledeni kopeli, v katero smo nato odmerili klorosulfonsko kislino (8,75 mL; 131,6 mmol). Med mešanjem smo počasi dodali 2,4-diklorobenzojsko kislino (5,0 g; 26,3 mmol) (**10**). Po dodatku smo bučko opremili z vodnim povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter segrevali pri temperaturi 140 °C čez noč. Naslednji dan smo bučko ohladili na ledo, nato pa vsebino zlili v čašo z 20 g ledu.

Nastalo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, spirali z ledeno vodo in jo takoj uporabili v naslednji stopnji.



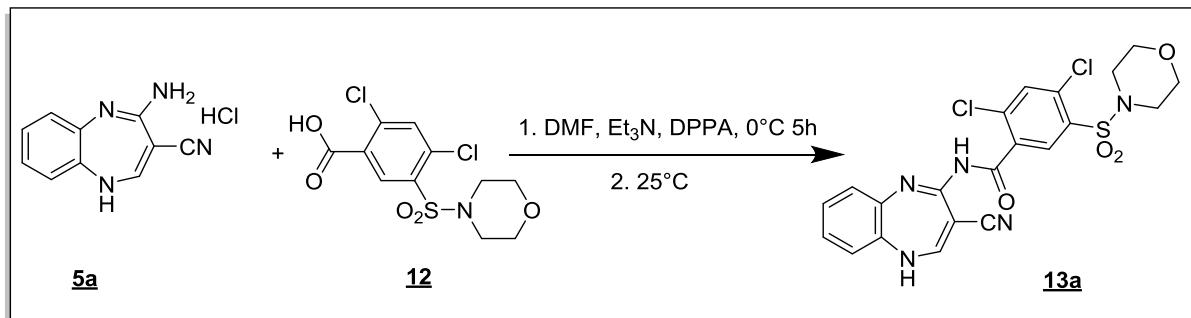
2,4-Dikloro-5-(klorosulfonil)benzojsko kislino (6,0 g; 20,7 mmol) (**11**) smo raztopili v diklorometanu (40 mL) in nato še dodali trietilamin (6,8 mL, 48,8 mmol). Nastalo reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli, nato pa smo ji med mešanjem počasi dodajali morfolin (2,0 mL; 22,9 mmol) (**8**) po kapljicah. Reakcijo smo pustili potekati čez noč pri sobni temperaturi.

Pri izolaciji smo reakcijsko zmes nakisali z 1 M HCl do pH=1-2 in s pomočjo lij ločnika ločili faze. Nastalo vodno fazo smo nato spirali z diklorometanom (3 x 30 ml) in etilacetatom (2 x 50 ml). Organske faze smo združili, spirali s 50 ml nasičene raztopine NaCl, sušili nad Na₂SO₄, filtrirali ter odparili topilo.

2,4-Dikloro-5-(morpholinosulfonil)benzojska kislina (Spojina 12)	
Izkoristek reakcije	40 %
Izgled	Bela kristalinična snov
Retencijski faktor	0,44 (EtOAc: MeOH = 3: 1)
Temperatura tališča	211-214 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ (ppm)= 3,18-3,21 (m, 4H, 2x CH ₂ -N); 3,60-3,63 (m, 4H, 2x CH ₂ -O); 8,07 (s, 1H, Ar-H); 8,33 (s, 1H, Ar-H); 14,04 (rs, 1H, COOH).
IR: ν _{max} (cm ⁻¹)	2856, 1686, 1579, 1539, 1424, 1353, 1296, 1258, 1164, 1113, 1083, 1067, 953, 896, 859, 761, 723, 653.
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₁₁ H ₁₀ Cl ₂ NO ₅ S [M-H] ⁺ (m/z): 337,9657 Izmerjena vrednost (m/z): 337,9649

4.5. Končni produkti

4.5.1. Sinteza 2,4-dikloro-N-(3-ciano-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-4-il)-5-(morfolinosulfonil)benzamida (13a)



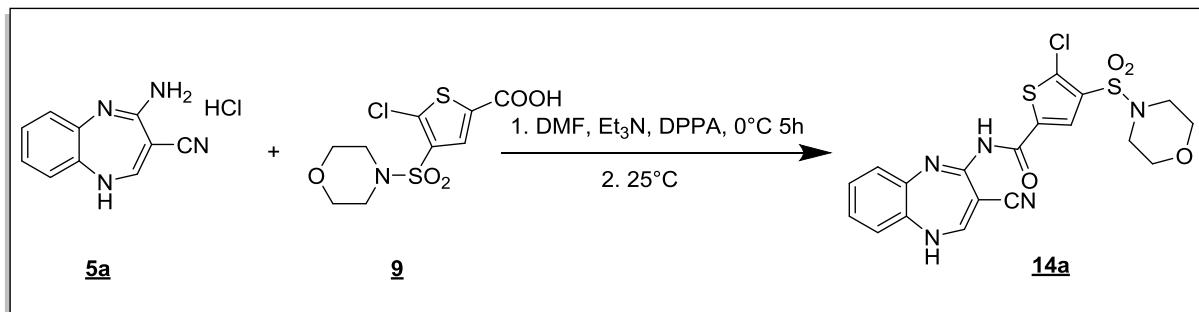
4-Amino-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-3-karbonitril hidroklorid(0,36 g; 1,6 mmol) (**5a**) in 2,4-dikloro-5-(morfolinosulfonil)benzojsko kislino (0,51 g; 1,5 mmol) (**12**) smo raztopili v 7,5 mL brezvodnega dimetilformamida in ohladili na 0°C na ledeni kopeli. V bučki smo zagotovili argonovo atmosfero in dodali difenilfosforil azid (0,38 mL; 1,8 mmol) ter trietylamin (0,70 mL; 5,0 mmol). Nato smo mešali 5 ur na ledeni kopeli, čez noč pa še pri sobni temperaturi.

Reakcijski zmesi smo dodali 50 mL etilacetata, nato pa smo organsko fazo spirali v naslednjem vrstnem redu: z 10 % citronsko kislino (2 x 25 mL), z destilirano vodo (25 mL), z nasičeno raztopino NaHCO_3 (25 mL), z destilirano vodo (25 mL) in z nasičeno raztopino natrijevega klorida (2 x 25 mL). Med spiranjem se je v organski fazi pojavila oborina, ki se je izkazala za produkt, zato smo jo odfiltrirali z odsesavanjem. Organsko fazo smo nato sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali, odparili topilo in preostanek prekristalizirali iz etanola.

2,4-Dikloro-N-(3-ciano-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]diazepin-4-il)-5-(morfolinosulfonil)benzamid (Spojina <u>13a</u>)	
Izkoristek reakcije	40 %
Izgled	Rdeča amorfna snov
Retencijski faktor	0,45 (EtOAc)
Temperatura tališča	229-233 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ (ppm)= 3,14-3,17 (m, 4H, 2x CH ₂ -N); 3,59-3,62 (m, 4H, 2x CH ₂ -O); 6,62-6,65 (m, 1H, Ar-H); 6,73-6,76 (m, 1H, Ar-H); 6,92-6,99 (m, 2H, 2x Ar-H); 7,21 (s, 1H, CH); 7,98 (s, 1H, Ar-H); 8,51 (s, 1H, Ar-H); 10,31 (rs, 1H, NH); 11,43 (s, 1H, NH).
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆)	δ (ppm)= 45,60; 65,52; 81,10; 118,22; 122,33; 122,95; 126,59; 127,75; 128,86; 132,21; 132,96; 133,60; 134,06; 134,44; 135,02; 137,29; 155,97; 163,94; 175,21.
IR (KBr): v_{max} (cm⁻¹)	2981, 2207, 2113, 1622, 1589, 1562, 1512, 1446, 1420, 1330, 1300, 1265, 1215, 1157, 1131, 1101, 1057, 951, 898, 874, 802, 757, 719, 681.
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₂₁ H ₁₆ Cl ₂ N ₅ O ₄ S [M-H] ⁻ (m/z): 504,0300 Izmerjena vrednost (m/z): 504,0307
HPLC	Tr= 15,594 min

4.5.2. Sinteza 5-kloro-N-(3-ciano-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-4-il)-4-(morfolinosulfonil)tiofen-2-karboksamida (**14a**)

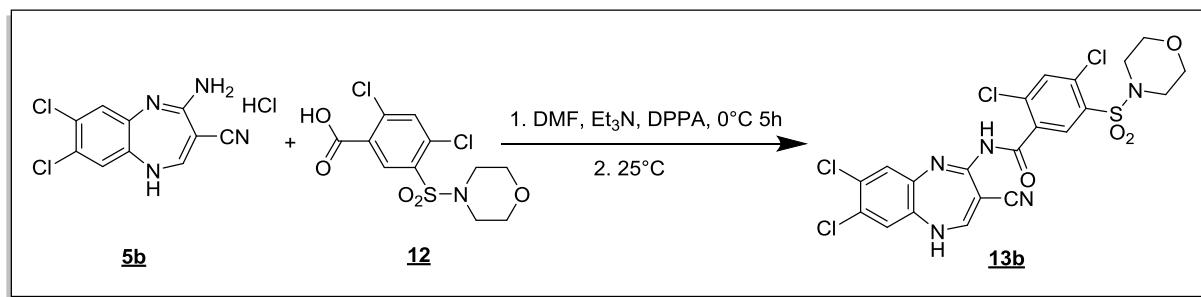


4-Amino-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-3-karbonitril hidroklorid (0,27 g; 1,2 mmol) (**5a**) in 5-kloro-4-(morfolinosulfonil)tiofen-2-karboksilno kislino (0,34 g; 1,1 mmol) (**9**) smo raztopili v 7 mL brezvodnega dimetilformamida in ohladili na ledeni kopeli. V bučki smo zagotovili argonovo atmosfero in dodali difenilfosforil azid (0,26 mL; 1,2 mmol) ter trietylamin (0,47 mL; 3,4 mmol). Nato smo mešali 5 ur na ledeni kopeli, čez noč pa še pri sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo dodali 40 mL etilacetata, nato pa smo organsko fazo spirali v naslednjem vrstnem redu: z 10% citronsko kislino (2 x 15 mL), z destilirano vodo (15 mL), z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 15 mL), z destilirano vodo (15 mL) in z nasičeno raztopino natrijevega klorida (2 x 15 mL). Organsko fazo smo nato sušili nad Na₂SO₄, filtrirali ter

odparili topilo. Spojino smo dokončno očistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo uporabili mobilno fazo, sestavljeno iz etilacetata in heksana v razmerju 9: 1.

5-Kloro-N-(3-ciano-1 <i>H</i> -benzo[b][1,4]diazepin-4-il)-4-(morfolinosulfonil)tofen-2-karboksamid (Spojina 14a)	
Izkoristek reakcije	56 %
Izgled	Rdeča amorfna snov
Retencijski faktor	0,41 (EtOAc)
Temperatura tališča	163-168 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm)= 3,03-3,09 (m, 4H, 2x CH ₂ -N); 3,63-3,66 (m, 4H, 2x CH ₂ -O); 6,53-6,56 (m, 1H, Ar-H); 6,69-6,72 (m, 1H, Ar-H); 6,88-6,97 (m, 2H, 2x Ar-H); 7,21 (d, J= 8,6 Hz, 1H, CH); 7,63 (s, 1H, Ar-H); 10,26 (t, J= 8,2 Hz, 1H, NH); 11,46 (s, 1H, NH).
¹³ C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm)= 45,64; 65,32; 80,85; 117,97; 122,38; 122,77; 126,64; 127,82; 128,73; 130,20; 131,92; 132,74; 138,02; 140,20; 155,97; 164,01; 170,40.
IR: ν _{max} (cm ⁻¹)	3317, 2965, 2212, 2116, 1623, 1590, 1518, 1442, 1389, 1345, 1297, 1261, 1221, 1140, 1109, 1072, 943, 872, 850, 795, 752, 722, 644.
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₁₉ H ₁₅ ClN ₅ O ₄ S ₂ [M-H] ⁻ (m/z): 476.0254 Izmerjena vrednost (m/z): 476.0251
HPLC	Tr= 14,477 min

4.5.3. Sinteza 2,4-Dikloro-N-(7,8-dikloro-3-ciano-1*H*-benzo[b][1,4]diazepin-4-il)-5-(morfolinosulfonil)benzamid (**13b**)

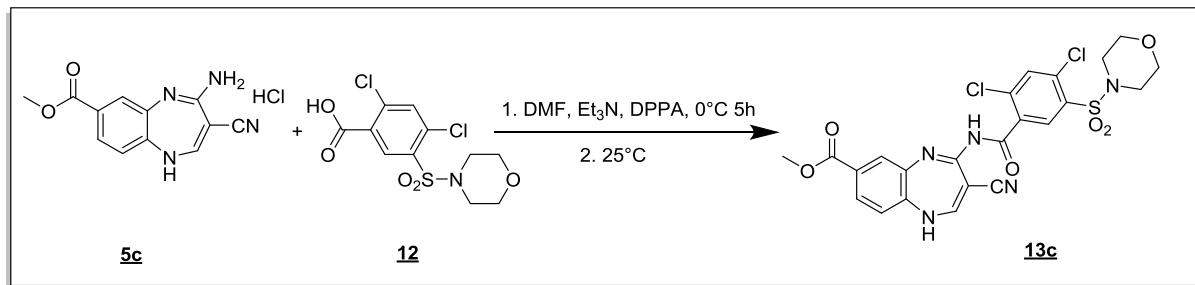


4-Amino-7,8-dikloro-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-3-karbonitril hidroklorid (0,35 g; 1,2 mmol) (**5b**) in 2,4-dikloro-5-(morfolinosulfonil)benzojsko kislino (0,37 g; 1,1 mmol) (**12**) smo raztopili v 5 mL brezvodnega dimetilformamida in postavili na ledeno kopel. V bučki smo zagotovili argonovo atmosfero in dodali difenilfosforil azid (0,26 mL; 1,2 mmol) ter trietilamin (0,47 mL; 3,4 mmol). Nato smo mešali 5 ur na ledeni kopeli, čez noč pa še pri sobni temperaturi.

Reakcijski zmesi smo dodali 40 mL etilacetata, nato pa smo organsko fazo spirali v naslednjem vrstnem redu: z 10 % citronsko kislino (2 x 15 mL), z destilirano vodo (15 mL), z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 15 mL), z destilirano vodo (15 mL) in z nasičeno raztopino natrijevega klorida (2 x 15 mL). Organsko fazo smo nato sušili nad Na₂SO₄, filtrirali ter odparili topilo. Spojino smo dokončno očistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo uporabili mobilno fazo sestavljeno iz diklorometana in metanola v razmerju 20: 1, ter s prekristalizacijo iz mešanice etanola in acetona v razmerju 1: 1.

2,4-Dikloro- <i>N</i> -(7,8-dikloro-3-ciano-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]diazepin-4-il)-5-(morfolinosulfonil)benzamid (Spojina 13b)	
Izkoristek reakcije	6 %
Izgled	Svetlo roza amorfna snov
Retencijski faktor	0,24 (DKM: MeOH= 20: 1)
Temperatura tališča	235-239 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ (ppm)= 3,15-3,18 (m, 4H, 2x CH ₂ -N); 3,59-3,62 (m, 4H, 2x CH ₂ -O); 6,96 (s, 1H, Ar-H); 7,05 (s, 1H, Ar-H); 7,36 (s, 1H, CH); 8,02 (s, 1H, Ar-H); 8,52 (s, 1H, Ar-H); 10,37 (rs, 1H, Ar-NH); 10,94 (rs, 1H, NH).
¹³C NMR (100 MHz, CF₃COOD)	δ (ppm)= 47,64; 68,60; 74,78; 128,65; 128,99; 129,17; 130,90; 132,01; 136,94; 137,28; 137,58; 138,29; 138,34; 140,03; 141,62; 143,88; 163,10; 165,42; 170,11.
IR: ν_{max} (cm⁻¹)	2918, 2212, 1628, 1565, 1523, 1497, 1431, 1372, 1315, 1260, 1216, 1156, 1114, 1076, 1060, 953, 912, 877, 805, 720, 617.
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₂₁ H ₁₆ Cl ₄ N ₅ O ₄ S [M+H] ⁺ (m/z): 573,9677 Izmerjena vrednost (m/z): 573,9662
HPLC	Tr= 18,927 min

4.5.4. Sinteza metil 3-ciano-4-(2,4-dikloro-5-(morfolinosulfonil)benzamido)-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-7-karboksilata (13c)



Metil 4-amino-3-ciano-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-7-karboksilat hidroklorid (2,0 g; 7,2 mmol) (**5c**) in 2,4-dikloro-5-(morfolinosulfonil)benzojsko kislino (2,22 g; 6,5 mmol) (**12**) smo raztopili v 30 mL brezvodnega dimetilformamida in postavili na ledeno kopel. V bučki smo zagotovili argonovo atmosfero in dodali difenilfosforil azid (1,59 mL; 7,4 mmol) ter trietylamin (3,0 mL; 21,5 mmol). Nato smo mešali 5 ur na ledeni kopeli, čez noč pa še pri sobni temperaturi.

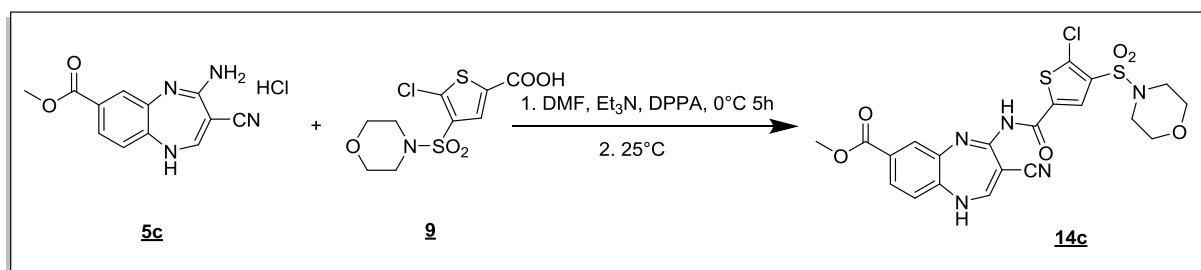
Reakcijski zmesi smo dodali 200 mL etilacetata, nato pa smo organsko fazo spirali v naslednjem vrstnem redu: z 10 % citronsko kislino (2 x 60 mL), z destilirano vodo (60 mL), z nasičeno raztopino NaHCO_3 (2 x 60 mL), z destilirano vodo (15 mL) in z nasičeno raztopino natrijevega klorida (2 x 60 mL). Organsko fazo smo nato sušili nad Na_2SO_4 , filtrirali ter odparili topilo. Spojino smo dokončno očistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo uporabili mobilno fazo, sestavljeno iz etilacetata in heksana v razmerju 9: 1. V določenih frakcijah je spojina kristalizirala, zato smo jo odfiltrirali z odsesavanjem, spirali s hladnim acetonom in posušili.

Metil 3-ciano-4-(2,4-dikloro-5-(morfolinosulfonil)benzamido)-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-7-karboksilat (Spojina **13c**)

Izkoristek reakcije	9 %
Izgled	Rdeča amorfna snov
Retencijski faktor	0,27 (EtOAc: heksan= 9: 1)
Temperatura tališča	249-254 °C

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ (ppm)= 3,15-3,18 (m, 4H, 2x CH ₂ -N); 3,60-3,63 (m, 4H, 2x CH ₂ -O); 3,81 (s, 3H, COOCH ₃); 6,77 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 1H, Ar-H); 7,28 (s, 1H, CH); 7,37 (d, <i>J</i> = 1,6 Hz, 1H, Ar-H); 7,50 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,7 Hz, 1H, Ar-H); 8,01 (s, 1H, Ar-H); 8,53 (s, 1H, Ar-H); 10,44 (rs, 1H, NH); 11,31 (s, 1H, NH).
¹³C NMR (100 MHz, CF₃COOD)	δ (ppm) = 47,62; 55,56; 68,59; 74,91; 128,23; 128,43; 133,47; 133,68; 134,39; 134,67; 135,27; 136,93; 137,29; 137,59; 138,89; 140,04; 141,64; 163,07; 165,67; 168,90; 170,12.
IR: ν_{max} (cm⁻¹)	3081, 2206, 1725, 1627, 1561, 1519, 1427, 1343, 1307, 1261, 1216, 1162, 1134, 1100, 1075, 1057, 957, 905, 803, 763, 724, 616.
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₂₃ H ₁₈ Cl ₂ N ₅ O ₆ S [M-H] ⁻ (m/z): 562,0355 Izmerjena vrednost (m/z): 562,0352
HPLC	Tr= 16,298 min

4.5.5. Sinteza metil 4-(5-kloro-4-(morfolinosulfonil)tiofen-2-karboksamid)-3-ciano-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-7-karboksilata (**14c**)

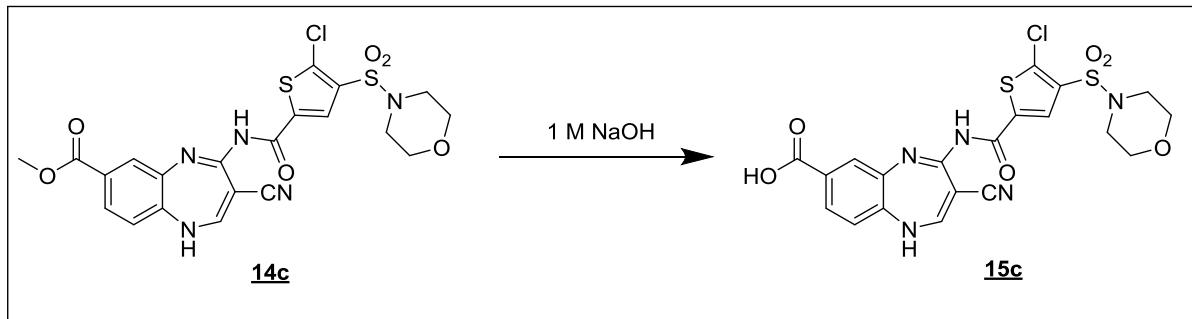


V eno bučko smo natehtali metil 4-amino-3-ciano-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-7-karboksilat hidroklorid (0,38 g; 1,4 mmol) (**5c**) ter dodali trietilamin (0,58 mL; 4,2 mmol) in del brezvodnega dimetilformamida (4 mL). V drugi bučki smo zagotovili argonovo atmosfero in natehtali 5-kloro-4-(morfolinosulfonil)tiofen-2-karboksilno kislino (0,39 g; 1,3 mmol) (**9**), dodali difenilfosforil azid (0,31 mL; 1,4 mmol) in preostali brezvodni dimetilformamid (2 mL) ter jo ohladili na 0 °C na ledeni kopeli. Nato smo počasi z iglo dodajali raztopino iz prve bučke z aminom v drugo bučko s kislino. Nato smo mešali 5 ur na ledeni kopeli, čez noč pa še pri sobni temperaturi.

Reakcijski zmesi smo dodali 50 mL etilacetata, nato pa smo organsko fazo spirali v naslednjem vrstnem redu: z 10 % citronsko kislino (2 x 15 mL), z destilirano vodo (15 mL), z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 x 15 mL), z destilirano vodo (15 mL) in z nasičeno raztopino natrijevega klorida (2 x 15 mL). Organsko fazo smo nato sušili nad Na₂SO₄, filtrirali ter odparili topilo. Spojino smo dokončno očistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo uporabili mobilno fazo, sestavljeno iz etilacetata in heksana v razmerju 9: 1.

Metil 4-(5-kloro-4-(morfolinosulfonil)tiofen-2-karboksamid)-3-ciano-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]diazepin-7-karboksilat (Spojina 14c)	
Izkoristek reakcije	11 %
Izgled	Rdeča amorfna snov
Retencijski faktor	0,44 (EtOAc)
Temperatura tališča	294-297 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ (ppm)= 3,07-3,10 (m, 4H, 2x CH ₂ -N); 3,64-3,67 (m, 4H, 2x CH ₂ -O); 3,80 (s, 3H, COOCH ₃); 6,69 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 1H, Ar-H); 7,26 (rs, 1H, CH); 7,34 (d, <i>J</i> = 1,9 Hz, 1H, Ar-H); 7,48 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,9 Hz, 1H, Ar-H); 7,66 (s, 1H, Ar-H); 10,46 (rs, 1H, NH); 11,47 (s, 1H, NH) ppm.
¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆)	δ (ppm)= 45,63; 52,26; 65,28; 81,20; 117,65; 122,92; 127,06; 128,55; 129,36; 130,58; 131,99; 132,90; 136,06; 138,38; 139,86; 155,70; 163,05; 164,44; 170,47.
IR: ν_{max} (cm⁻¹)	3299, 3121, 2217, 1694, 1623, 1565, 1518, 1431, 1402, 1349, 1299, 1264, 1223, 1160, 1136, 1109, 1076, 955, 875, 841, 802, 765, 723, 643.
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₂₁ H ₁₇ ClN ₅ O ₆ S ₂ [M-H] ⁻ (m/z): 534,0309 Izmerjena vrednost (m/z): 534,0295
HPLC	Tr= 15,170 min

4.5.6. Sinteza 4-(5-kloro-4-(morfolinosulfonil)tiofen-2-karboksamido)-3-ciano-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-7-karboksilne kisline (**15c**)



Metil-(5-kloro-4-(morfolinosulfonil)tiofen-2-karboksamido)-3-ciano-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-7-karboksilat (0,05 g; 0,1 mmol) (**14c**) smo natehtali v bučko in dodali 1 M NaOH (6 mL). Reakcijsko zmes smo močno mešali 6 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo vsebino s 3 M HCl nakisali na pH 2 in v lij ločniku ekstrahirali z 20 mL etilacetata. Pri ekstrahiranju se je pojavila oborina, ki se je izakazala za produkt, zato smo jo odfiltrirali z odsesavanjem in shranili. Vodno fazo smo nato še ekstrahirali z etilacetatom (2 x 20 mL). Združene organske faze smo sušili nad Na₂SO₄, filtrirali in odparili topilo. Zaostanek smo združili s prej pridobljeno oborino, nato pa smo raztopili v tetrahidrofuranu in pustili na sobni temperaturi, da je topilo počasi izhlapevalo in pri tem je izpadel produkt.

4-(5-Kloro-4-(morfolinosulfonil)tiofen-2-karboksamid)-3-ciano-1 <i>H</i> -benzo[<i>b</i>][1,4]diazepin-7-karboksilna kislina (Spojina 15c)	
Izkoristek reakcije	55 %
Izgled	Rdečeoranžna amorfna snov
Retencijski faktor	0,57 (EtOAc: MeOH= 1: 1)
Temperatura tališča	>300 °C (razpad spojine)
¹H NMR (400 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ (ppm)= 3,08-3,10 (m, 4H, 2x CH ₂ -N); 3,65-3,67 (m, 4H, 2x CH ₂ -O); 6,68 (d, <i>J</i> = 8,1 Hz, 1H, Ar-H); 7,25 (s, 1H, CH); 7,34 (d, <i>J</i> = 1,5 Hz, 1H, Ar-H); 7,48 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,0 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,5 Hz, 1H, Ar-H); 7,67 (s, 1H, Ar-H); 10,56 (rs, 1H, NH); 11,45 (s, 1H, NH); 13,05 (rs, 1H, COOH).
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-<i>d</i>₆)	δ (ppm)= 45,68; 65,33; 81,03; 117,80; 122,87; 123,22; 128,51; 128,84; 130,58; 131,92; 132,62; 132,93; 138,39; 139,97; 155,75; 163,33; 165,56; 170,49.
IR: ν_{max} (cm⁻¹)	3279, 3114, 2220, 1696, 1625, 1566, 1518, 1404, 1351, 1241, 1218, 1162, 1137, 1108, 1076, 952, 874, 834, 767, 724, 642, 616.
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₂₀ H ₁₅ ClN ₅ O ₆ S ₂ [M-H] ⁻ (m/z): 520,0152
	Izmerjena vrednost (m/z): 520,0160
HPLC	Tr= 12,510 min

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

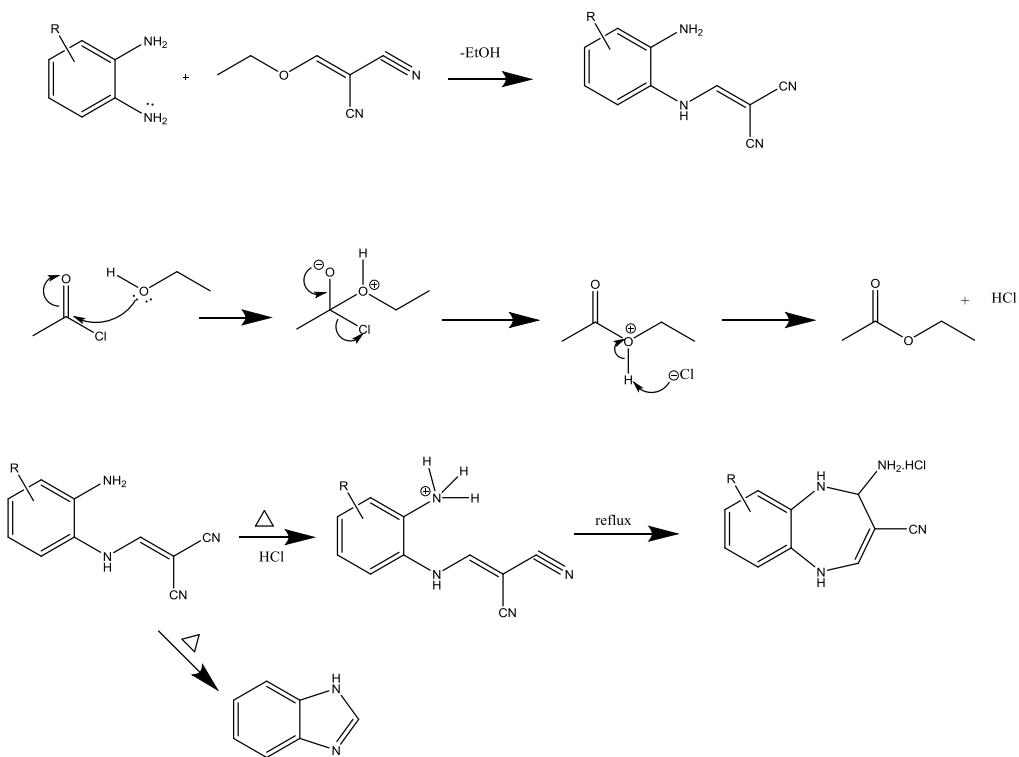
5.1. Komentar sinteznih postopkov

5.1.1. Sinteza 1,5-benzodiazepinov za pridobitev spojin **5a**, **5b** in **5c**

Veliko raziskovanja je potekalo za sintezo 1,5-benzodiazepinov, saj so se nekateri derivati izkazali, da imajo zanimive farmakološke lastnosti. Obstaja več načinov za njihovo pripravo, vendar je najbolj splošen postopek za sintezo dvostopenjska reakcija *o*-fenilediamina z β -dikarbonilnimi spojinami. 4-amino-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-3-karbonitril so prvič sintetizirali leta 1973 po isti poti, ki smo jo uporabili v tej magistrski nalogi (31).

Najprej je potrebna sinteza 2-(((2-aminofenil)amino)metilen)malononitrila iz *o*-fenilediamina in etoksimetilenmalononitrila (Slika 9), ki poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije (32). Ta se kasneje ob samem segrevanju pretvori v benzimidazol. Okamoto in Ueda pa sta odkrila, da refluktiranje kloridne soli 2-(((2-aminofenil)amino)metilen)malononitrila v etanolu povzroči nastanek oranžnih iglic 4-amino-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-3-karbonitrila monohidroklorida s skoraj 100 % izkoristkom, kar nakazuje odvisnost intramolekularne ciklizacije od kislosti reakcijskega medija. Točen mehanizem te reakcije ni znan (31).

Produkt prve stopnje nismo sušili v sušilniku pri visokih temperaturah, ker bi lahko prišlo do nastanka stranskega produkta benzimidazola. Pri drugi stopnji so bili potrebnii brezvodni pogoji, zato smo uporabili acetil klorid, ki se je ob prisotnosti etanola z nukleofilno substitucijo pretvoril v etil acetat.



Slika 9: Sinteza 1,5-benzodiazepina po korakih (Pridobitev spojin 7 in 11).

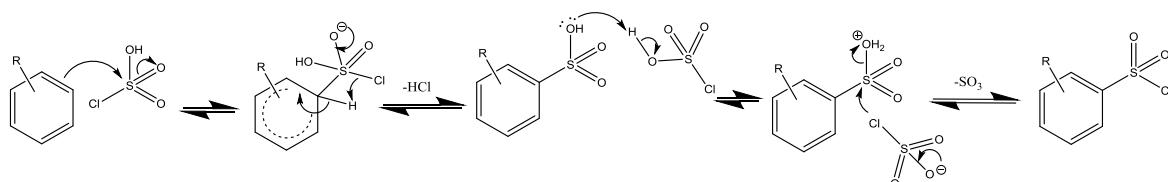
5.1.2. Klorosulfoniranje za pridobitev spojin 7 in 11

Klorosulfoniranje spada med elektrofilne aromatske substitucije, ki veljajo za zelo uporabne reakcije pri arenih zaradi velikih možnosti priprave substituiranih derivatov in so hkrati najbolj raziskane organske reakcije. Gre za reakcijo med areni in elektrofilni, pri čemer se izmenja elektrofil z vodikom na aromatskem obroču. Elektrofilna aromatska substitucija poteka po dvostopenjskem mehanizmu, pri katerem ima nastanek σ -kompleksa odločilno vlogo. Najprej se veže elektrofil, da nastane metastabilen kationski adukt, nato se v σ -kompleksu ponovno vzpostavi aromatsko stanje z eliminacijo vodika in je tako rezultat reakcije substitucija. Predhodni substituenti na benzenovem obroču usmerjajo elektrofilno substitucijo, bodisi na *ortho*, *para* ali pa *meta* položaj. Prav tako vplivajo na hitrost posameznih reakcij (33).

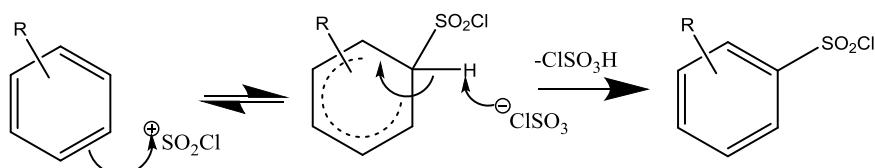
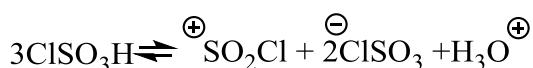
Za reakcijo sta potrebna najmanj dva ekvivalenta klorosulfonske kisline, kar je razvidno iz dveh predlaganih mehanizmov (Slika 10 in 11). Eden poteka preko vezave klorosulfonske kisline, pri čemer pride do odcepitve HCl. Na aromatu dobimo sulfonsko skupino, pri kateri se hidroksi skupina v naslednjem koraku protonira zaradi prisotnosti klorosulfonske kisline tako, da dobimo dobro izstopajočo skupino. Sledi nukleofilni napad klorida na žveplo, odcep

molekule vode in nastanek končne spojine. Drugi poteče posredno z nastankom elektrofila ^+SOCl pri ravnotežni reakciji iz treh klorosulfonskih kislin. Sledi adiranje elektrofila na dvojno vez benzena, nukleofil $^-ClSO_3$ pa kot konjugirana baza odcepi proton in nastane končna spojina (34).

Poleg benzena smo klorosulfonirali tudi tiofen, ki je petčlenski heteroaromat z žveplom. Reakcija s tiofenum je potekala bolje, saj ima benzen večjo resonančno stabilizacijo in višjo energijo σ -kompleksa kot tiofen (33). Pri uporabi klorosulfonske kisline smo morali biti zelo pazljivi, saj je izjemno reaktivna, pri zlivanju v vodo pa poteče burna eksotermna reakcija, pri kateri nastajata žveplova(VI) in klorovodikova kislina. Po koncu reakcije smo zmes zlivali na led, da se zmesi ne bi dvignila temperatura, ker bi v nasprotnem primeru sulfonil klorid hidroliziral do sulfonske kisline (34). Takoj po izolaciji spojine, ki je zaradi reaktivnosti dokaj neobstojna, smo nastavili reakcijo za tvorbo sulfonamida.



Slika 10: Nastanek benzensulfonilklorida preko sulfonske kisline (Prirejeno po (34)).

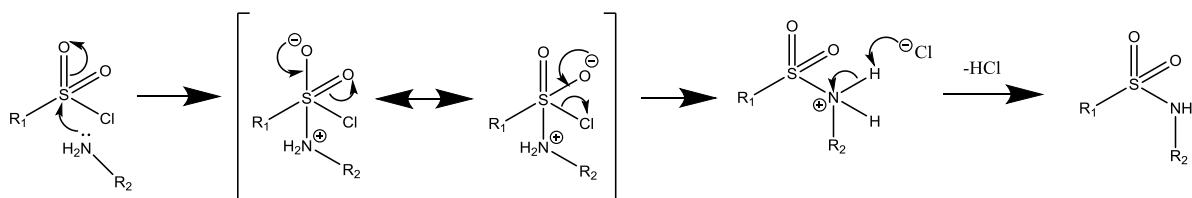


Slika 11: Nastanek benzensulfonilklorida preko elektrofila ^+SOCl (Prirejeno po (34)).

5.1.3. Tvorba sulfonamida za pridobitev spojin **9** in **12**

Sulfonamidi so amidni analogi, pri katerih je karbonilni del zamenjan s sulfonilno skupino. Kot amidi so tudi sulfonamidi lahko klasificirani kot primarni, sekundarni in terciarni, odvisno od stopnje substitucije sulfonamidnega dušika. Skupina je dokaj nereaktivna, dušik pa ni več bazičen, ampak kisel, če je eden izmed radikalov vodik. Vez je močnejša kot pri estru ali amidu, zato jo je težko prekiniti in potrebni so relativno ekstremni pogoji (35).

Reakcija je nukleofilna adicija s sledečo eliminacijo. Najprej nevezni elektronski par amina napade žveplo in prisili π -elektrona, da se umakneta na kisik (Slika 12). Kisik postane negativen in se v naslednjem koraku ponovno tvori dvojna vez med kisikom in žveplom, kar prisili odcepitev klorida. Klorid nato prevzame vodik s pozitivno nabitega dušika, da nastane končni produkt. Nastala HCl se nevtralizira s prisotno bazo.

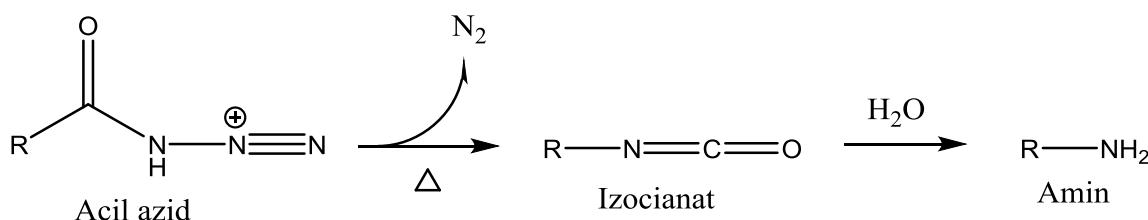


Slika 12: Mehanizem nastanka sulfonamida iz sulfonil klorida in amina.

5.1.4. Tvorba amida za pridobitev spojin 13a, 13b, 13c, 14a in 14c

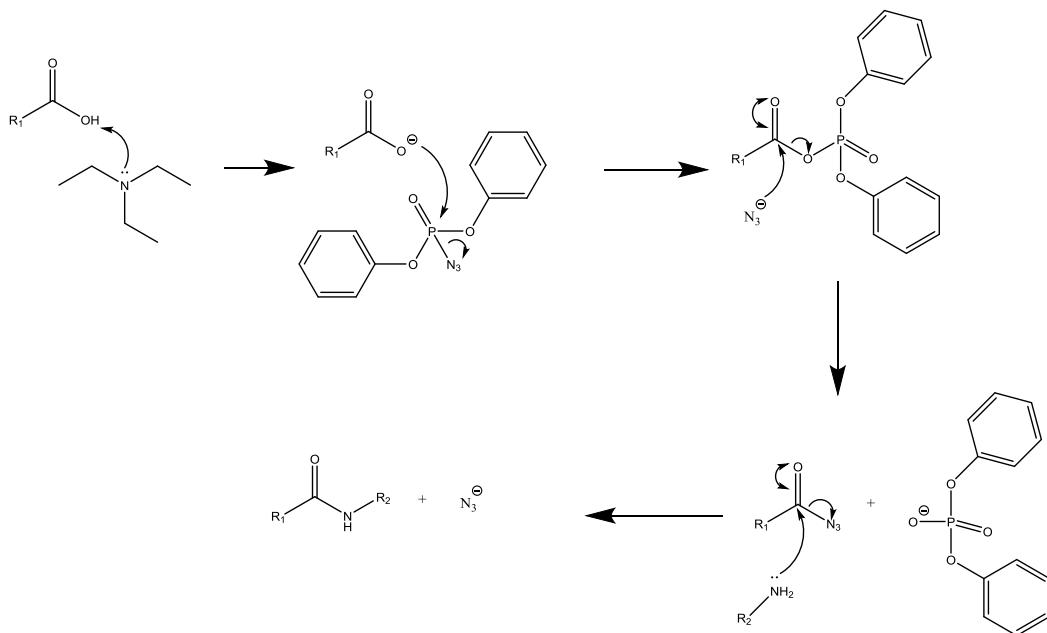
Amidna vez se pojavlja v 25 % vseh znanih zdravilnih učinkov zaradi nevtralnosti, stabilnosti in sposobnosti tvorbe vodikove vezi. Nastane pri reakciji med karbonilnim ogljikom in aminom, ki ima vlogo nukleofila. Karbonilni ogljik je v multipli vezi s kisikom in ima delno pozitivne lastnosti zaradi spremenjene π -elektronske gostote, ki je povečana na heteroatomu. Posledica te polarnosti je povečana kemijska reaktivnost in možnost, da nukleofil napade ta pozitiven ogljik in se tvori kovalentna vez. Ob napadu nastane tetraedrični intermediat, ki ni obstojen in se pretvori dalje v novo spojino z eliminacijo vode (36).

Tvorba amida je težavna, ker je kislina kisla in amin bazičen, zato pri njunem mešanju nastane stabilna sol, iz katere pa težko nastane amid zaradi nasprotovanja termodinamike. Nastanek lahko olajšamo s segrevanjem na 160-180 °C, vendar zaradi občutljivosti molekul na visoke temperature in prisotnosti drugih funkcionalnih skupin (lahko potečejo še druge reakcije) segrevanje ni kompatibilno. Zato se zatekamo k drugim metodam, ki ne zahtevajo veliko energije in temeljijo na aktivaciji kisline tako, da na karbonilni ogljik pripnemo dobro izstopajočo skupino in še bolj povečamo njegovo kemijsko reaktivnost. Kisline so lahko aktivirane kot acil halogenidi, acil azidi, acil imidazoli, anhidridi, estri in drugi. Mi smo aktivirali kislino kot acil azid, saj je priprava reakcije preprosta in omogoča dobre izkoristke (36).



Slika 13: Nastanek izocianata in kasneje amina pri visokih temperaturah (Prirejeno po (36)).

Sinteza amida preko tvorbe acil azida velja za eno izmed prvih metod, ki jo je razvil Curtis. Za tvorbo acil azida obstaja več poti, mi smo uporabili pot preko difenilfosforil azida (DPPA). Potrebna je še baza (trietilamin), da iz kisline nastane karboksilatni anion, ki ima večjo nukleofilnost in lažje napade atom fosforja v DPPA (Slika 14). Azidni anion se odcepi in nastane mešani anhidrid. Prvi nato napade karbonilni ogljik anhidrida, da nastane acil azid in difenilfosfatni anion, ki velja za dobro izstopajočo skupino. Sedaj, ko imamo aktivirano kislino, pride na vrsto amin, ki je zaradi baze v neprotonirani obliki, in napade karbonilni ogljik. Poteče nukleofilna adicija z eliminacijo azidnega aniona ter nastane amid. Pri reakciji smo morali biti pazljivi, da v bučko ni zašla vlaga, saj bi DPPA v njeni prisotnosti hidroliziral. Paziti smo morali tudi, da temperatura ni bila previsoka, ker bi v tem primeru iz kislinskega azida nastajal izocianat (Slika 13) kot stranski produkt zaradi Curtisove premestitve (36). Čeprav naj bi tvorba amida preko acil azida imela dobre izkoristke, so bili izkoristki pri sintezi spojin **13b**, **13c** in **14c** zelo slabi, in sicer okoli 10 %. Slabi izkoristki so bili verjetno zaradi uporabe starega reagenta DPPA, ker smo svežega porabili pri sintezi spojin **13a** in **14a**, na zalogi pa ni bilo drugega.

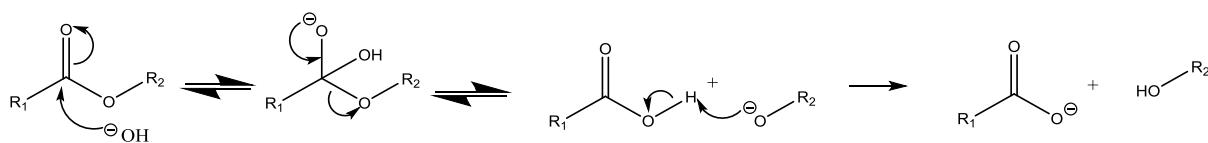


Slika 14: Mehanizem nastanka amidne vezi preko acil azida (Prirejeno po (36)).

5.1.5. Hidroliza estra za pridobitev spojine 15c

Hidroliza je reakcija, pri kateri voda povzroči cepitev vezi v molekulah, v tem primeru estra. Estri so manj reaktivni kot kislinski halogenidi ali anhidridi, zato je potrebna kataliza s pomočjo kisline ali baze. Kot katalizator smo uporabili bazo 1 M natrijev hidroksid, zaradi katere poteče nukleofilna substitucija, pri čemer lahko reakcija potrebuje tudi segrevanje, da le ta poteče primerno hitro. Mehanizem pretvorbe je ravno obraten kot pri esterifikaciji. Pri hidrolizi z bazo nastane iz slabega nukleofila vode hidroksilni ion, ki je negativno nabit in močan nukleofil, ki lahko napade karbonilni ogljik (Slika 15). Nastane tetraedrični intermedijat, ki se lahko vrne v začetno stanje s sprostivijo hidroksida ali pa poteče reakcija v smeri produkta z izstopom alkoksida. Hidroksid in alkoksid sta oba močni bazi in zato slabi izstopajoči skupini, reakcija pa kljub temu poteče, saj ima tetraedrični intermedijat visoko energijo in je njegova pretvorba v karbonilno spojino eksotermna tudi, ko izstopi slabo izstopajoča skupina. Reakcija teži k hidrolizi zaradi ugodne kislinsko-bazične reakcije, ki sledi po odcepitvi močno bazičnega alkoksida, saj ta deprotonira kislino v karbosilatni ion. Ta korak je zelo ugoden in omogoča, da je hidroliza 100 % (37).

Pri reakciji smo morali biti pazljivi, da ni potekala predolgo, saj bi lahko prišlo tudi do hidrolize amidne vezi, kar bi pomenilo slabši izkoristek. V našem primeru je bil izkoristek 55,5 %, kar pomeni, da je lahko hidroliziral tudi amid. K slabemu izkoristku je prispevala tudi majhna količina reagentov v reakciji, saj so bile izgube spojine v bučki ali na filtru opazne.



Slika 15: Hidroliza estra katalizirana z bazo (Prerejeno po (37)).

5.2. Rezultati vrednotenja zaviralne aktivnosti in komentar

Rezultati vrednotenja zaviralne aktivnosti končnih spojin na encimu MurF izoliranega iz bakterij *E. coli* in *S. pneumoniae* so podani v Tabeli 2. Rezultati so podani kot rezidualna aktivnost (RA) pri 100 µM zaviralca, to je razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti zaviralca in aktivnostjo brez zaviralca. Najmočnejšemu zavircu smo določili še vrednost IC₅₀, to je koncentracija spojine, pri kateri je rezidualna aktivnost 50 %.

Tabela 2: Rezultati zaviralne aktivnosti končnih spojin.

Oznaka spojine	Struktura	Rezidualna aktivnost (%)	
		MurF pri 100 µM <i>S. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
13a		95	96
14a		92	43 (IC50 = 106 µm)
13b		82	103

13c		87	83
14c		90	58
15c		77	86

S testiranjem končnih spojin na izoliranem encimu MurF bakterij *S. pneumoniae* in *E.coli* smo ugotovili, da je bila spojina **14a** z IC₅₀ 106 µM na encimu *E. coli* najmočnejši zaviralec. Sledila ji je spojina **14c**, ki je bila aktivna prav tako na encimu bakterije *E. coli* z RA 58 %. Signifikantne aktivnosti na MurF *S. pneumoniae* ni pokazala nobena spojina, še najbolje spojini **15c** z RA 77 % in **13b** z RA 82 %.

Z zamenjavo 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-3-karbonitrila pri spojini **1b** z 1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-3-karbonitrilom smo pridobili spojino **13a**, ki je popolnoma izgubila zaviralno delovanje. Spojina **1b** je imela močno zaviralno delovanje, zato nas je rezultat presenetil, saj imata oba fragmenta podobno velikost in prostorsko ureditev, vsebujeta hidrofobni del ter pomembni funkcionalni skupini, amino in ciano skupino. Vseeno smo nadaljevali in poskusili pripnjeti različne substituente na benzen 1,5-benzodiazepinskega skeleta, tako smo dobili spojini **13b** in **13c**. Spojina **13b** ima na benzenu vezana dva klora, kar je prispevalo k šibkemu zaviranju encima MurF iz *S. pneumoniae* z RA 82 %. Z vezavo metilnega estra na benzen smo sintetizirali spojino **13c**, ki pa je imela glede na **13a** šibko zaviralno aktivnost na MurF iz obeh bakterij (RA_{Sp} 87 %, RA_{Ec} 83 %).

Pri spojini **13a** smo se odločili zamenjati 1,3-diklorobenzen kislinskega dela molekule z 2-klorotiofonom, s čimer smo uspeli pridobiti spojino **14a** z najmočnejšo zaviralno aktivnostjo na encimu bakterije *E. coli* (RA 43 %, IC₅₀ 106 µM), ki pa je še vedno močno zaostajala za spojino **1b** z IC₅₀ 1 µM. Tudi tu smo poskusili s pripnjanjem metilnega estra na benzen 1,5-

benzodiazepinskega skeleta v upanju večje jakosti, vendar je spojina **14c** z RA 58 % slabše zavirala delovanje encima. Nadaljevali smo s hidrolizo estra pri spojnini **14c** in sintetizirali spojino **15c**, ki je izgubila zaviralno aktivnost na MurF bakterije *E. coli*, vendar pa se je izmed vseh spojin izkazala za najmočnejši zaviralec MurF iz bakterije *S. pneumoniae* z RA 77 %.

6. SKLEP

Načrtovali in sintetizirali smo šest novih zaviralcev bakterijske ligaze MurF. Za te zaviralce je je značilen 1,5-benzodiazepinski skelet, ki še ni bil uporabljen za spojine s tovrstnim delovanjem. Zaradi spoznanj, da je 1,5-benzodiazepin vsestranski farmakofor in tudi vključen v spojine z dokazanim protibakterijskim delovanjem, smo ga uporabili v tej magistrski nalogi z namenom povečanja zaviralne aktivnosti v primerjavi s spojino **1b**.

Sinteza je bila razdeljena na sintezo aminskega in kislinskega dela. Aminski del je bil sestavljen iz dveh stopenj. Prva stopnja je potekla med ustreznim derivatom 1,2-diaminobenzena in etoksimetilenmalononitriлом, da smo dobili ustrezen derivat 2-((2-aminofenil)amino)metilen)malononitrila. Reakcije so potekle z visokim izkoristkom, razen pri derivatih z nitro skupino ter pri kondenziranim benzenom, kjer reakcije niso potekle. Sledila je ciklizacija produkta v kislih pogojih ob refluksu tako, da smo dobili derivate 4-amino-1*H*-benzo[*b*][1,4]diazepin-3-karbonitrila ter zaključili aminski del. Kislinski del se je sintetiziral z dvema reakcijama, prvi del se je pričel s klorosulfoniranjem ustreznega aromata, ki je imel že pripeto karboksilno kislino in klor, nato pa je sledila sinteza sulfonamide. Kislinski in aminski del smo združili s pomočjo DPPA, ki je iz kisline napravil acil azid, da je reakcija lažje potekala. Pri tvorbi nekaterih amidov smo imeli zelo slab izkoristek, verjetno zaradi uporabe starega reagenta DPPA. Eni končni spojini smo še hidrolizirali metilni ester z 1 M NaOH, da bi lahko še vrednotili vpliv kisle skupine na zaviralno aktivnost.

Rezultati niso bili vzpodbudni, ker se nobena končna spojina ni približala IC₅₀ spojine **1b**, še najbolj obetavna je bila spojina **14a** z IC₅₀ 106 µM, kar pa vseeno ni bil slab rezultat. Zaviralne aktivnosti nismo uspeli izboljšati, vendar pa smo ugotovili, da lahko z malimi spremembami na molekuli močno vplivamo na zaviralno aktivnost tako na MurF iz bakterije *E. coli* kot tudi iz *S. pneumoniae*. Na osnovi dobljenih rezultatov pa vseeno lahko trdimo, da spojine z 1,5-benzodiazepinskim skeletom predstavljajo novo skupino zaviralcev ligaz MurF, ki jih je še vredno naprej raziskovati. Naslednji korak je zagotovo preveriti protibakterijsko delovanje na kolonijah bakterij, da ugotovimo, če smo z zamenjavo cianotiofena z 1,5-benzodiazepinom dosegli prehod bakterijskih barier in posledično protibakterijsko delovanje.

7. LITERATURA

1. Williams D.A., Lemke T.L.: Foye's Principles of Medicinal Chemistry-5th Ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia. 2002: 60-63, 819-827
2. Davies J., Davies D.: Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010; 74(3): 417-433.
3. Pankey G.A., Sabath L.D.: Clinical Relevance of Bacteriostatic versus Bactericidal Mechanisms of Action in the Treatment of Gram-Positive Bacterial Infections. *Clin. Infect. Dis.* 2004; 38: 864-870.
4. Rang H.P., Dale M.M., Ritter J.M., Flower R.J., Henderson G.: Rang and Dale's Pharmacology-7th Edition. Elsevier Churchill Livingstone, Edinburgh 2012: 622-636.
5. Alanis A.J.: Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Arch. Med. Res.* 2005; 36: 697-705.
6. Black J.G.: Microbiology: Principles and Exporations-5th Ed. John Wiley&Sons, Inc., USA 2002: 76-80, 205-207, 342-245.
7. Madigan M.T., Martinko J.M., Dunlap P.V., Clark D.P.: Brock: Biology of Microorganisms-12th Ed. Pearson Education, Inc., USA 2009: 78-84, 802-805.
8. Madigan M.T., Martinko J.M., Stahl D.A., Clark D.P.: Brock: Biology of Microorganisms-13th Ed. Pearson Education, Inc., USA 2012: 58-62.
9. Zeeby A.E., Sanschagrin F., Levesque R.C.: Structure and Function of the Mur Enzymes: Development of Novel Inhibitors. *Mol. Microbiol.* 2003; 47: 1-12.
10. Barreteau H., Kovač A., Boniface A., Sova M., Gobec S., Blanot D.: Cytoplasmic Steps of Peptidoglycan Biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008; 32: 168-207.
11. Vollmer W., Blanot D., de Pedro M.A.: Peptidoglycan Structure and Architecture. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008; 32: 149-167.
12. Smith C.A.: Structure, Function and Dynamics in the Mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases. *J. Mol. Biol.* 2006; 362: 640-655.
13. Sliver L.L.: Does the Cell Wall of Bacteria Remain a Viable Source of Targets for Novel Antibiotics? *Biochem. Pharmacol.* 2006; 71: 996-1005.
14. Kouidmi I., Levesque R.C., Paradis-Bleau C.: The Biology of Mur Ligases as an Antibacterial Target. *Mol. Microbiol.* 2014; 94(2): 242-253.

15. Yan Y., Munshi S., Leiting B., Anderson M.S., Chrzas J., Chen Z.: Crystal Structure of *Escherichia Coli* UDP-MurNac-Tripeptide D-Alanyl-D-Alanine-Adding Enzyme (MurF) at 2.3 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* 2000; 304: 435-445.
16. Miller D.J., Hammond S.M., Anderluzzi D., Bugg T.D.H.: Aminoalkylphosphinate Inhibitors of D-Ala-D-Ala Adding Enzyme. *J. Chem. Soc.* 1998; 0(1): 131-142.
17. Comess K.M., Schurdak M.E., Voorbach M.J., Coen M., Trumbull J., Yang H., Gao L., Tang H., Cheng X., Lerner G., McCall J.O., Burns D.J., Beutel B.A.: An Ultraefficient Affinity-Based-High-Throughput Screening Process: Application to Bacterial Cell Wall Biosynthesis Enzyme MurF. *J. Biomol. Screen.* 2006; 11(7): 743-754.
18. Longenecker K.L., Stamper G.G., Hajduk P.J., Fry E.H., Jakob C.G., Harlan J.E., Edalji R., Bartley D.M., Walter K.A., Solomon L.R., Holzman T.F., Gu Y.G., Lerner C.G., Beutel B.A., Stoll V.S.: Structure of MurF from *Streptococcus Pneumoniae* Co-Crystallized with a Small Molecule Inhibitor Exhibits Interdomain Closure. *Protein Sci.* 2005; 14: 3039-3047.
19. Gu Y.G., Florjancic A.S., Clark R.F., Zhang T., Cooper C.S., Anderson D.D., Lerner C.G., McCall J.O., Cai Y., Black-Schaefer C.L., Stamper G.F., Hajduk P.J., Beutel B.A.: Structure-Activity Relationships of Novel Potent MurF Inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004; 14: 267-270.
20. Hrast M., Turk S., Sosič I., Knez D., Randall C.P., Barreteau H., Contreras-Martel C., Dessen A., O'Neill A.J., Mengin-Lecreux D., Blanot D., Gobec S.: Structure-Activity Relationships of New Cyanothiophene Inhibitors of the Essential Peptidoglycan Biosynthesis Enzyme MurF. *Eur. J. Med. Chem.* 2013; 66: 32-45.
21. Hrast M., Anderluh M., Knez D., Randall C.P., Barreteau H., O'Neill A.J., Blanot D., Gobec S.: Design, Synthesis and Evaluation of Second Generation MurF Inhibitors based on a Cyanothiophene Scaffold. *Eur. J. Med. Chem.* 2014; 73: 83-96.
22. Sosič I., Kovač A., Turk S., Blanot D., Gobec S.: The Synthesis of Novel 2,4,6-Trisubstituted 1,3,5-Triazines: A Search for Potential MurF Enzyme Inhibitors. *Heterocycles* 2010; 81: 91-115.
23. Turk S., Hrast M., Sosič I., Mengin-Lecreux D., Blanot D., Gobec S.: Biochemical Characterization of MurF from *Streptococcus Pneumoniae* and the Identification of a New MurF Inhibitor through Ligand-Based Virtual Screening. *Acta Chim. Slov.* 2013; 60: 294-299.

24. Baum E.Z., Crespo-Carbone S.M., Abbanat D., Foleno B., Maden A., Goldschmidt R., Bush K.: Utility of Muropeptide Ligase for Identification of Inhibitors of the Cell Wall Biosynthesis Enzyme MurF. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50: 230-236.
25. Baum E.Z., Crespo-Carbone S.M., Klinger A., Foleno B.D., Turchi I., Macielag M., Bush K.: A MurF Inhibitor that Disrupts Cell-Wall Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51: 4420-4426.
26. Baum E.Z., Crespo-Carbone S.M., Foleno B.D., Simon L.D., Guillemont J., Macielag M., Bush K.: MurF Inhibitors with Antibacterial Activity: Effect on Muropeptide Levels. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53: 3240-3247.
27. Sova M., Kovač A., Turk S., Hrast M., Blanot D., Gobec S.: Phosphorylated Hydroxyethylamines as Novel Inhibitors of the Bacterial Cell Wall Biosynthesis Enzymes MurC to MurF. *Bioorg. Chem.* 2009; 37: 217-222.
28. Tomašič T., Zidar N., Kovač A., Turk S., Simčič M., Blanot D., Müller-Premru M., Filipič M., Grdadolnik S.G., Zega A., Anderluh M., Gobec S., Kikelj D., Mašič L.P.: 5-Benzylidenethiazolidin-4-ones as Multitarget Inhibitors of Bacterial Mur Ligases. *ChemMedChem* 2010; 5: 286-295.
29. Salve P.S., Mali D.S.: 1,5-Benzodiazepine: A Versatile Pharmacophore. *Int. J. Pharm. Biol. Sci.* 2013; 4(3): 345-370.
30. Wang L.Z., Li X.Q., An Y.S.: 1,5-Benzodiazepine Derivatives as Potential Antimicrobial Agents: Design, Synthesis, Biological Evaluation, and Structure–Activity Relationships. *Org. Biomol. Chem.* 2015; 13: 5497-5509.
31. Okamoto Y., Takagi K.: Chemistry of 4-Amino-1H-1,5-Benzodiazepine-3-Carbonitrile. *J. Heterocyclic Chem.* 1987; 24: 885-893.
32. Marinho E.R., Proença F.P.: The Reaction of *o*-Phenylenediamine with Ethoxymethylene Compounds and Aromatic Aldehydes. *ARKIVOC* 2009; 14: 346-361.
33. Tišler M.: Organska kemija- tretja izdaja. DZS, Ljubljana 1988: 261-277.
34. Anderluh M., Mravljak J., Perdih A., Sova M., Pečar S.: Farmacevtska kemija III: Vaje in seminarji. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana 2010: 26-31.
35. DeRuiter J.: Amides and Related Functional Groups. Principles of Drug Action I 2005: online article.
36. Montalbetti C.A.G.N., Falque V.: Amide Bond Formation and Peptide Coupling. *Tetrahedron* 2005; 61: 10827-10852.
37. Vollhardt P., Schore N.: Organic Chemistry: Structure and Function-6th Ed. W. H. Freeman and Company, USA, New York 2011: 937-938.