

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

INA MAJER

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

INA MAJER

**SINTEZA AMIDOV 2-AMINO-4,5,6,7-
TETRAHIDROBENZO[b]TIOFEN-3-KARBONITRILA S
POTENCIALNIM DELOVANJEM NA ENCIMA MURA IN MURF**

**SYNTHESIS OF 2-AMINO-4,5,6,7-
TETRAHYDROBENZO[b]THIOPHENE-3-CARBONITRILE AMIDE
DERIVATIVES WITH POTENTIAL MURA AND MURF
INHIBITORY ACTIVITY**

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm. Spektroskopske meritve in farmakološka testiranja so bila opravljena na Fakulteti za farmacijo in na Inštitutu Jožefa Stefana v Ljubljani.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm. za strokovno pomoč in nasvete pri pripravi naloge. Zahvala gre tudi asist. Kaji Rožman, mag. farm., ki je opravila farmakološka testiranja ter vsem sodelavcem Katedre za farmacevtsko kemijo, ki so mi pomagali pri izvedbi eksperimentalnega dela. Zahvalila bi se tudi vsem bližnjim, ki so mi bili v oporo v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm.

Ina Majer

VSEBINA

POVZETEK	v
ABSTRACT	vi
SEZNAM OKRAJŠAV	vii
1. UVOD.....	1
1.1 PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE	1
1.2 ODPORNOST BAKTERIJ NA PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE	2
1.3 CELIČNA STENA	4
1.4 PEPTIDOGLIKAN	6
1.5 BIOSINTEZA PEPTIDOGLIKANA	6
1.6 MUR LIGAZE.....	9
1.6.1 MurF	10
1.7 TRANSFERAZA MurA.....	12
1.8 ZAVIRALCI MurF	13
1.9 ZAVIRALCI MurA	14
2. NAMEN IN POTEK DELA.....	16
3. MATERIALI IN METODE	18
3.1. MATERIALI	18
3.2. METODE	18
3.2.1. Kromatografske metode	18
3.2.2 Spektroskopske metode	19
3.2.3 Določanje tališča.....	20
3.2.4 Risanje in poimenovanje spojin.....	20
3.2.5 Farmakološko in protibakterijsko testiranje	20
4. EKSPERIMENTALNI DEL	22

4.1. Sinteza 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-karbonitrila (spojina 10).....	22
4.2 Sinteza 3-(pirolidin-1-ilsulfonil)benzojske kisline (spojina 12).....	22
4.3 Sinteza <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-3-(pirolidin-1-ilsulfonil)benzamida (spojina 14).....	23
4.4 Sinteza 5-kloro-4-(klorosulfonil)tiofen-2-karboksilne kisline (spojina 15).....	25
4.5 Splošni postopek sinteze spojin 16 in 17.....	25
4.6. 5-kloro-4-(pirolidin-1-ilsulfonil)tiofen-2-karboksilna kislina (spojina 16).....	26
4.7 5-kloro-4-(morfolinosulfonil)tiofen-2-karboksilna kislina (spojina 17).....	27
4.8 Splošni postopek poskusa sinteze spojine 5-kloro- <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-4-(pirolidin-1-ilsulfonil)tiofen-2-karboksamida (spojina 18) in poskusa sinteze spojine 5-kloro- <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-4-(morfolinosulfonil)tiofen-2-karboksamida (spojina 19).....	27
4.9. Splošni postopek sinteze spojin 21a-c.....	28
4.10 Splošni postopek sinteze spojin 22a-c.....	31
4.11 Sinteza <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7- tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)benzamida (spojina 23).....	33
4.12 Splošni postopek sinteze spojin 25a-c.....	34
4.13 Splošni postopek sinteze spojin 26a-c.....	36
4.13.1 Sinteza 3-((3-ciano-4,5,6,7- tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)karbamoil)fenil acetata (spojina 26a).....	37
4.13.2 Sinteza 4-((3-ciano-4,5,6,7- tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)karbamoil)fenil acetata (spojina 26b).....	38
4.13.3 Sinteza 5-((3-ciano-4,5,6,7- tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)karbamoil)-1,3-fenilen diacetata (spojina 26c).....	39
4.14 Splošni postopek sinteze spojin 27a-c.....	39
4.14.1 Sinteza <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-3-hidroksibenzamida (spojina 27a).....	40
4.14.2 Sinteza <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-4-hidroksibenzamida (spojina 27b).....	41

4.14.3 Sinteza <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-3,5-dihidroksibenzamida (spojina 27c).....	42
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	43
5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	43
5.1.1 GEWALDOVA SINTEZA SUBSTITUIRANIH TIOFENOV	43
5.1.2 SINTEZA AMIDA PREKO KISLINSKEGA KLORIDA	44
5.1.3 SINTEZA AMIDA PREKO DPPA.....	46
5.1.4 KLORSULFONIRANJE.....	47
5.1.5 SINTEZA SULFONAMIDA	48
5.1.6 ACETILIRANJE HIDROKSI SKUPINE	49
5.2 REZULTATI FARMAKOLOŠKEGA TESTIRANJA.....	50
5.2.3 KOMENTAR FARMAKOLOŠKEGA TESTIRANJA.....	51
6. ZAKLJUČEK.....	53
7. LITERATURA	54

KAZALO SLIK

Slika 1: <i>Biokemijski mehanizmi rezistence</i>	2
Slika 2: <i>Primerjava G+ (levo) in G- (desno) bakterijske celične stene.</i>	5
Slika 3: <i>Biosinteza peptidoglikana</i>	8
Slika 4: <i>Reakcijski mehanizem Mur ligaz</i>	9
Slika 5: <i>Apo MurF iz Escherichia coli</i>	11
Slika 6: <i>Adicijsko-eliminacijski mehanizem reakcije, ki jo katalizira MurA</i>	12
Slika 7: <i>3D struktura MurA</i>	12
Slika 8: <i>Nekateri zaviralci encima MurF</i>	14
Slika 9: <i>Nekateri zaviralci encima MurA</i>	15
Slika 10: <i>Načrtovani novi zaviralci na osnovi spojine 7 in 8.</i>	16
Slika 11: <i>Načrtovane spremembe pozicije hidroksilne skupine. Skelet, esencialen za zaviralno delovanje je označen z modro, načrtovane spremembe pa z rdečo.</i>	17
Slika 12: <i>Encimsko katalizirani reakciji, pri katerih se sprosti P_i</i>	20

Slika 13: <i>Mehanizem Gewaldove sinteze substituiranih tiofenov</i>	44
Slika 14: <i>Ravnotežje v zmesi kisline in baze</i>	44
Slika 15: <i>Mehanizem nastanka kislinskega klorida</i>	45
Slika 16: <i>Katalitična vloga piridina pri reakciji kislinskega klorida in amina</i>	46
Slika 17: <i>Vloga piridina kot baze pri reakciji kislinskega klorida in amina</i>	46
Slika 18: <i>Mehanizem sinteze amida z uporabo DPPA</i>	47
Slika 19: <i>Mehanizem Curtiusove premestitve</i>	47
Slika 20: <i>Mehanizem klorsulfoniranja, pri katerem kot elektrofil nastopa klorsulfonska kislina</i>	48
Slika 21: <i>Mehanizem klorsulfoniranja, pri katerem kot elektrofil nastopa SO_2Cl^+</i>	48
Slika 22: <i>Mehanizem acetiliranja hidroksi skupine s katalizatorjem piridinom</i>	49

KAZALO TABEL

Tabela I: <i>Substituenti na spojinah 16 in 17</i>	26
Tabela II: <i>Substituenti na spojinah 18 in 19</i>	28
Tabela III: <i>Substituenti na spojinah 20, 21 in 22</i>	29
Tabela IV: <i>Substituenti na spojinah 24 in 25</i>	35
Tabela V: <i>Substituenti na spojinah 26a-c</i>	37
Tabela VI: <i>Substituenti na spojinah 27a-c</i>	40
Tabela VII: <i>Rezultati farmakološkega testiranja</i>	50

POVZETEK

Odkritje in razvoj učinkovitih in varnih protibakterijskih učinkovin sta povzročila revolucijo v zdravljenju infekcij in drastično zmanjšala obolevnost in smrtnost populacije. Vendar pa se danes srečujemo s pojavom bakterijske rezistence na večino protibakterijskih učinkovin, kar predstavlja zaskrbljujoč zdravstveni problem in kliče po razvoju učinkovin z novimi mehanizmi delovanja. Eno izmed obetavnih tarč, esencialno za preživetje bakterije, predstavljajo encimi Mur, ki katalizirajo del citoplazemske sinteze peptidoglikana. Encimi Mur ne izkazujejo strukturne homologije s sesalskimi encimi, zato so primerna tarča za selektivno toksičnost, prav tako pa so encimi med bakterijskimi sevi podobni, torej bi bili njihovi zaviralci širokospektralni.

V magistrski nalogi smo sintetizirali nove amide 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]thiofen-3-karbonitrila kot zaviralce encimov MurA in MurF na podlagi že znanih zaviralcev z istim skeletom. Naš namen je bil izboljšati zaviralno aktivnost s strukturnimi spremembami in dodatno pojasniti vpliv med strukturo in delovanjem spojin. Sintetizirali smo nove spojine s spremembami na aromatskem in sulfonamidnem delu na osnovi dveh spojin iz knjižnjice spojin Fakultete za farmacijo z aktivnostjo na encimu MurA. Na osnovi zaviralcev MurF smo sintetizirali spojine, ki vsebujejo skelet, esencialen za zaviralno aktivnost, spreminjali pa smo pozicijo hidroksilne skupine. S povečanjem polarnosti smo želeli izboljšati topnost in prehod spojin v bakterijsko celico in tako pripraviti spojine, ki bi lahko bile potencialne kandidatke za zdravilne učinkovine.

Spojinam smo določili zaviralno delovanje na MurA in MurF iz *Streptococcus pneumoniae* in *Escherichia coli*. Spojine niso zavirale delovanje encima MurF, so se pa izkazale kot zaviralci encima MurA. Rezultati rezidualne aktivnosti kažejo, da uvedba nepolarnih substituentov pri spojinah **22a-c** ojača zaviranje encima, prav tako pa končne spojine s hidroksi skupino (**27a-c**) močnejše zavirajo encim kot acetilirani derivati. Spojina **27c** je izkazovala protibakterijsko delovanje na sevu *Streptococcus aureus* z MIK 32 µg/ml in na sevu MRSA z MIK 64 µg/ml, kar bi lahko bila posledica hidrofilnosti spojine.

Sintetizirane spojine predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnje raziskave. Na podlagi določitve interakcij med zaviralci in encimom MurA bi lahko v prihodnje izvedli optimizacijo amidov do močnejših zaviralcev MurA s protibakterijskim delovanjem.

Ključne besede: encimi Mur, zaviralci, protibakterijske učinkovine

ABSTRACT

Discovery and development of effective and safe antibacterial agents have led to the revolution in treatment of infections and have dramatically reduced morbidity and mortality of population. However, we are facing emergence of bacterial resistance to majority of antibacterial agents. This is becoming a serious global health problem and thus stimulates the urgent need for development of agents with novel mechanisms of action. One of the promising targets essential for the survival of bacteria are Mur enzymes, which catalyze the part of cytoplasmic peptidoglycan biosynthesis. Mur enzymes have no structural homology with mammalian enzymes which makes them appropriate target for selective toxicity. Moreover, they show similarities across bacterial species, therefore their inhibitors have the potential of broad-spectrum activity.

In this master's thesis we have synthesized novel amides of 2-amino-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[b]thiophene-3-carbonitrile with potential MurA and MurF inhibitory activity based on known inhibitors with the same scaffold. Our aim was to improve inhibitory activity via structural modifications and to obtain further information about the structure-activity relationship. We have modified the aromatic and sulfonamide part of two compounds from the library of compounds at the Faculty of Pharmacy with MurA inhibitory activity. Furthermore, based on known inhibitors of MurF we have synthesized compounds with essential scaffold for inhibition and modified position of hydroxyl group. The purpose of increased polarity was to enhance solubility and bacterial cell permeability, making compounds potential drug candidates.

Inhibitory activities were determined against MurA and MurF from *Streptococcus pneumoniae* and *Escherichia coli*. Although amides have not inhibited MurF, they have shown MurA inhibitory activity. We can conclude from residual activity values that larger lipophilic moieties in derivatives **22a-c** improve inhibition and final compounds with hydroxyl moiety (**27a-c**) show greater inhibitory activity as acetylated derivatives. Compound **27c** showed antibacterial activity against *Streptococcus aureus* with MIC of 32 µg/ml and against MRSA with MIC of 64 µg/ml, which might be due to its hydrophilicity. Synthesized compounds represent good starting point for further research. The optimization of synthesized amides to obtain potent MurA inhibitors with antibacterial activity could be based on determination of interactions between the inhibitors and the MurA enzyme.

Keywords: Mur enzymes, inhibitors, antibacterial agents

SEZNAM OKRAJŠAV

Ac₂O	acetanhidrid
AcCoA	acetil koencim A
ADP	adenozin difosfat
ATP	adenozin trifosfat
C₅₅-P	undekaprenol fosfat
D-AAT	D-aminokislinska aminotransferaza
Ddl	D-alanin:D-alanin ligaza
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
DPPA	difenilfosforil azid
DTT	ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ekv	ekvivalent
ESI	ionizacija z razprševanjem ionov
EtOH	etanol
EtOAc	etil acetat
FAD	flavin adenin dinukleotid
FADH₂	reduciran flavin adenin dinukleotid
G+	po Gramu pozitivne bakterije
G-	po Gramu negativne bakterije
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
GlcN-1P	Glukozamin-1-fosfat
GlcNAc-1-P	<i>N</i> -acetilglukozamin-1-fosfat
GlmM	encim fosfoglukozamin mutaza
GlmS	encim glukozamin-6-fosfat sintaza
GlmU	encim glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza in <i>N</i> -acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferaza
Hex	heksan
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti

HRMS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
Hz	Hertz
IC₅₀	srednja zaviralna koncentracija
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
m-A₂pm	mezo-diaminopimelinska kislina
MBK	minimalna baktericidna koncentracija
MF	mobilna faza
MIK	minimalna zaviralna koncentracija
M_r	molekulska masa
MraY	fosfo-MurNAc-pentapeptid translokaza
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> -acetilmuramil-L-alanil D-glutamat ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-L-alanin-D-glutamil <i>m</i> -diaminopimelat/L-lizin ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-L-alanin-D-glutamat- <i>m</i> -diaminopimelat/L-izin 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
NADPH	Nikotinamid adenin dinukleotid difosfat
NMR	jedrska magnetna resonanca
QSAR	kvantitativni odnos med strukturo in delovanjem
PBP	penicilin vezoči protein
PEP	fosfoenolpiruvat
P_i	anorganski fosfat
R	radikal
RA	rezidualna aktivnost
RNA	ribonukleinska kislina
SAR	odnos med strukturo in delovanjem

<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Streptococcus aureus</i>
TEA	<i>N,N,N</i> -triethylamin
TLC	tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
t_r	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	ultravijolična svetloba

1. UVOD

1.1 PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE

Razvoj protibakterijskih učinkovin v 20. stoletju je predstavljal velik znanstveni in medicinski dosežek, poleg tega pa je dramatično zmanjšal obolevnost in smrtnost prebivalstva zaradi bakterijskih infekcij. Odkritju penicilinov in sulfonamidov v prvi polovici 20. stoletja je v naslednjih letih sledilo še odkritje mnogih nepogrešljivih protibakterijskih učinkovin. Vendar pa se danes srečujemo s problemom rezistence bakterij na večino dostopnih protibakterijskih učinkovin, kar predstavlja velik globalni zdravstveni problem. Nove učinkovine, ki prihajajo na trg ne zadovoljujejo rastočih potreb medicine, prav tako pa gre večinoma za derivate starejših generacij, zaradi česar so dovzetne za mehanizme bakterijske rezistence. Da bi se izognili nastopu obdobja, ki je vladalo pred odkritjem antibiotikov, je razvoj novih razredov protibakterijskih učinkovin nujno potreben. (1-3)

Antibiotiki so spojine, ki jih proizvajajo mikroorganizmi in zavirajo rast ali povzročajo propad drugih mikroorganizmov. Klinično učinkovitost naravnih antibiotikov so v nekaterih primerih izboljšali s kemijsko manipulacijo izvorne učinkovine, kar je vodilo v širši spekter delovanja, izboljšan učinek delovanja, manjšo toksičnost in enostavnejšo aplikacijo. (1) Izraz kemoterapevtiki opisuje spojine, ki izkazujejo selektivno toksičnost za invazivni mikroorganizem, medtem ko so za gostitelja neškodljive. Paul Erlich je ta izraz prvi uporabil za opis sintetičnih protimikrobnih spojin, kasneje pa so definicijo razširili, da zajema tudi antibiotike in protitumorne učinkovine. (4)

Protibakterijske učinkovine delujejo po principu selektivne toksičnosti na tarče v bakterijski celici in tako vplivajo na:

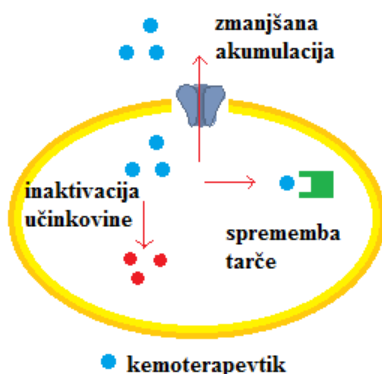
- sintezo in aktivnost folata: sulfonamidi, trimetoprim, dapson
- sintezo celične stene: β -laktami (penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami), glikopeptidi, izoniazid, cikloserin, fosfomicin
- sintezo proteinov: tetraciklini, aminoglikozidi, makrolidi, amfenikoli, streptogramini, linkozamidi, oksazolidinoni, fusidna kislina
- sintezo DNA: kinoloni, rifampicin
- strukturo zunanje celične membrane: polimiksini (4)

Protibakterijske učinkovine delimo glede na delovanje na bakteriostatične in bakteriocidne. Bakteriostatične učinkovine zavirajo rast bakterij, bakteriocidne pa jih uničijo. Protibakterijsko aktivnost spojin *in vitro* vrednotimo z minimalno zaviralno koncentracijo (MIK) in minimalno baktericidno koncentracijo (MBK). MIK je najmanjša koncentracija spojine, ki zavira vidno rast bakterij, MBK pa je najmanjša koncentracija spojine, ki povzroči uničenje bakterij oziroma prepreči njihovo rast pri ponovni inkubaciji na mediju, ki ne vsebuje spojine. (5, 6)

1.2 ODPORNOST BAKTERIJ NA PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE

Rezistenca bakterij je sposobnost, da so odporne na delovanje protibakterijskih učinkovin. Ločimo intrinzično in pridobljeno odpornost. Intrinzični mehanizmi so vzpostavljeni v bakteriji že pred stikom z zdravilom, pridobljeni mehanizmi pa vključujejo mutacije in njihov medsebojni transfer. (7) Biokemijski mehanizmi rezistence vključujejo (slika 1):

- sprememba tarče zdravilne učinkovine (sprememba vezavnega mesta za aminoglikozide, fluorokinolone, β -laktame, makrolide)
- zmanjšana akumulacija učinkovine v bakteriji (efluks tetraciklinov, fluorokinolonov, makrolidov) in zmanjšana možnost vstopa učinkovine v celico (zaviranje sinteze porinov, strukturne spremembe polisaharidnih komponent zunanje membrane G- bakterij, spremembe sestave bakterijske ovojnice)
- sintezo encima, ki inaktivira učinkovino (β -laktamaze, ki inaktivirajo β -laktamski obroč, acetiltransferaze, ki inaktivirajo kloramfenikol, kinaze, ki inaktivirajo aminoglikozide)
- razvoj alternativnih biokemijskih poti (rezistenca na sulfonamide, trimetoprim) (4)



Slika 1: Biokemijski mehanizmi rezistence

Mutacije se lahko pojavijo na kromosomski ali plazmidni DNA. Plazmidi, ki vsebujejo rezistentne gene (r gene) se imenujejo R plazmidi. Rezistentni geni se lahko znotraj bakterije prenašajo s transpozoni. To so odseki genskega zapisa, ki se lahko prenašajo s transpozicijo iz enega plazmida na drugega ter s plazmida na kromosom in obratno. Njihova integracija v akceptorsko DNA lahko poteče neodvisno od običajnih mehanizmov homologne rekombinacije. Za razliko od plazmidov se ne morejo podvojevati neodvisno, nekateri pa se lahko podvojujejo v procesu integracije, kar ima za posledico kopijo v donorski in akceptorski DNA. Rezistentni geni, ki so zapisani na teh determinantah, se lahko prenašajo tudi med različnimi sevi bakterij in se lahko vgradijo v gostiteljev plazmid ali kromosomsko DNA. Ločimo tri načine prenosa r genov med bakterijami: konjugacija, transdukcija in transformacija. Konjugacija je najpogostejša tehnika, pri čemer se bakteriji fizično povežeta s pilusi in poteče prenos konjugacijskih plazmidov, ki nosijo zapis za tvorbo pilusov in pogosto tudi r gene. Veliko Gram-negativnih in Gram-pozitivnih bakterij ima sposobnost konjugacije. Transdukcija je prenos genskega zapisa preko bakterijskega virusa (bakteriofaga) v drugo bakterijo. Je redkejša metoda, klinično pomembna za prenos r genov med sevi stafilokokov in streptokokov. Transformacija je prevzem zunanje DNA in njena inkorporacija v genom preko običajne homologne rekombinacije in je manj pogosta tehnika. (4, 8, 9)

Že Aleksander Fleming je ob podelitvi Nobelove nagrade za odkritje penicilina leta 1945 opozoril, da lahko postanejo bakterije odporne na to zdravilo. (9) Po principu selekcije je to pričakovan evolucijski proces, vendar pa se pojav normalne naravne selekcije, ki se je odvijala v evoluciji mikrobov skozi milijone let ne more primerjati s pojavom razvoja rezistence v zadnjem stoletju. Povečujoča se uporaba učinkovin ter njihovi izpusti v okolje v zadnjih osemdesetih letih ustvarjajo konstanten selekcijski pritisk za preživetje rezistentnih sevov v vseh okoljih, ne samo v kliničnem. Nepravilna, nepremišljena in pretirana uporaba protibakterijskih sredstev so pomembni vzroki hitrega razvoja rezistence. (7) V klinični praksi se ta zdravila še vedno uporabljajo v večji meri kot je potrebno, problem pa je tudi nekomplianca pacientov. Subletalne doze ali prekratka terapija namreč omogočita preživetje rezistentnim sevom. Terapevtska uporaba v humani medicini predstavlja manj kot polovico celotne uporabe protimikrobnih učinkovin, široko se uporabljajo tudi v živalih kot profilaktični aditiv ali faktor spodbujanja rasti, poljedelstvu, prehranski industriji, veterini in kot biocidi. Izračunano je bilo, da so v

zadnjih petdesetih letih v biosfero izpustili več milijonov ton učinkovin. Ključno za preprečevanje ali vsaj zaustavljanje razvoja rezistence je stroga kontrola uporabe in predpisovanja protimikrobnih učinkovin v medicini ter nadzor nad uporabo in ravnanje z odpadnimi produkti v drugih panogah, podkrepjen z razvojem strukturno novih učinkovin, odpornih na rezistentne mehanizme. V zadnjem času se strokovnjaki vse bolj zavedajo razsežnosti in posledic tega problema in na to opozarjajo tudi laično javnost. (3, 8, 9)

1.3 CELIČNA STENA

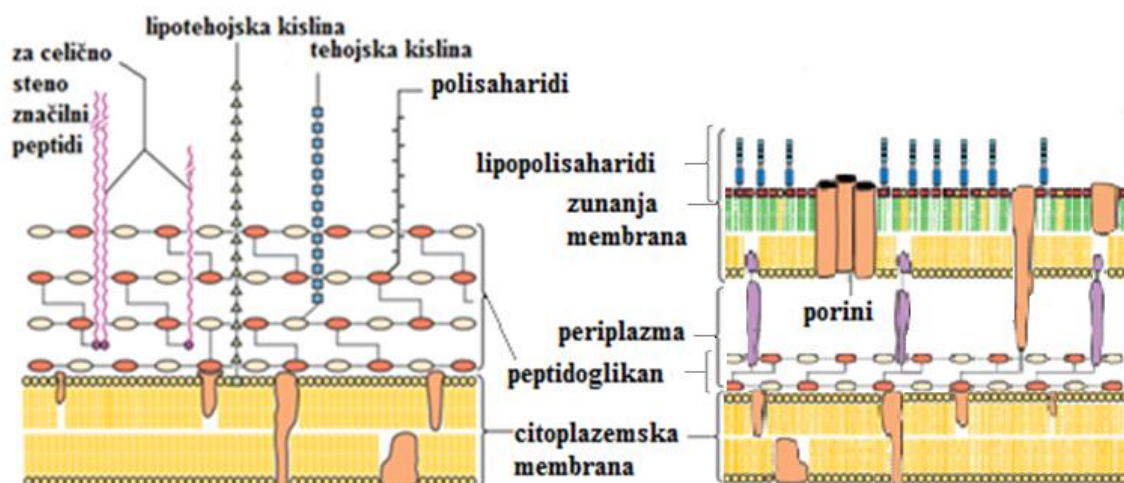
Bakterijska celična stena je kompleksna struktura, ki obdaja citoplazemsko membrano bakterijskih celic. Prisotna je pri skoraj vseh bakterijah z izjemo mikoplazem, ki imajo obliko protoplasta. Njena glavna naloga je varovanje celice pred zunanjim okoljem, nasprotovanje visokemu osmotskemu citoplazemskemu tlaku in s tem preprečitev osmotske lize, ohranjanje oblike in strukture celice ter sodelovanje pri izmenjavi informacij med zunanjim in notranjim okoljem. Najpomembnejša struktura celične stene je peptidoglikan, rigidna polisaharidna plast, odgovorna za togost celične stene. Sestavljen je iz polisaharidnih verig, premreženih s peptidi. Prisoten je v vseh bakterijah s celično steno. Bakterije delimo na gram-pozitivne in gram-negativne. Klasifikacija temelji na različnem barvanju bakterij zaradi razlik v sestavi celične stene, kar pa je pomembno tudi z vidika izbora zdravilne učinkovine, ki mora za prihod na mesto delovanja preiti celično steno (slika 2). (6, 8)

Gram-pozitivne bakterije

Celična stena G⁺ bakterij, ki pokriva citoplazemsko membrano, je v največji meri sestavljena iz plasti peptidoglikana, ki jih je lahko do 40 (debelina 15-80 nm) in predstavljajo do 30% suhe mase celične stene, nanje pa so lahko vezani za celično steno značilni proteini, ki imajo pogosto vlogo patogenih determinant, in polisaharidi. Večina teh celičnih sten vsebuje tehojsko kislino, ki je kisel polimer, sestavljen iz glicerolfosfatnih ali ribitol fosfatnih ostankov, na katere so vezani sladkorji ali D-alanin. Tehojska kislina je lahko kovalentno vezana na peptidoglikan ali pa na membranske peptide (lipotehojska kislina). Njena naloga je vzdrževanje negativnega naboja na površini celice, kar omogoča vezavo kationov in regulacijo njihovega transporta, prav tako pa ima vlogo pri celični rasti, delitvi in imunskemu odzivu kot antigen. (8, 10, 11)

Gram-negativne bakterije

Celična stena G- bakterij je kompleksnejše sestave, saj poleg ene do dveh plasti peptidoglikana (debelina 2 nm) vsebuje še zunanjo membrano, ki se po zgradbi razlikuje od citoplazemske membrane. Poleg fosfolipidnega dvosloja jo sestavljajo lipopolisaharidi, proteini in lipoproteini. Lipopolisaharidi zamenjujejo večino fosfolipidov na zunanjem delu membrane. Zgrajeni so iz O-specifičnega polisaharida, jedrnega polisaharida in lipida A, ki je endotoksin. O-specifična polisaharidna veriga se razlikuje glede na sev bakterije in predstavlja pomemben antigen. Najpomembnejši proteini na zunanji membrani so porini. To so transmembranski kanalčki, preko katerih poteka transport hidrofilnih molekul z nizko maso. Preko nespecifičnih porinov lahko prehaja katera koli hidrofilna molekula z nizko maso, preko specifičnih pa samo določene strukturno podobne molekule. Zunanja membrana je tako bolj prepustna za majhne molekule kot notranja. Poleg porinov so prisotni še drugi proteini, ki imajo vlogo transporta ali adhezije na gostiteljske receptorje, nekateri pa tudi povezujejo zunanjo membrano s peptidoglikanom. Lipoproteini se nahajajo na notranji strani zunanje membrane in prav tako kot nekateri membranski proteini povezujejo zunanjo membrano s peptidoglikanom. Prostor med zunanjo in citoplazemsko membrano se imenuje periplazma. V njej se poleg peptidoglikana nahajajo še proteini in encimi v visokih koncentracijah z različnimi funkcijami. Čeprav je zunanja membrana permeabilna za majhne molekule, pa ne dovoljuje prehoda velikih molekul. Ena pomembnejših vlog zunanje membrane je namreč preprečevanje izgube periplazemskih proteinov. (8, 10)



Slika 2: Primerjava G+ (levo) in G- (desno) bakterijske celične stene (prirejeno po 10).

1.4 PEPTIDOGLIKAN

Peptidoglikan je esencialna komponenta bakterijske celične stene. Je polimer, sestavljen iz dolge sladkorne verige, premrežene s polipeptidnimi odseki. Sladkorno verigo sestavljata izmenjujoči enoti *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc). Enoti sta povezani z β -1-4 glikozidno vezjo. MurNAc ostanek ima na mestu 3 vezano D-laktatno skupino, na katero je pripet polipeptid. Aminokislina si običajno sledijo v zaporedju L-alanin, D-glutaminska kislina, *mezo*-diaminopimelinska kislina (A₂pm) in dva ostanka D-alanina, pri čemer se pri premreženju terminalni alaninski ostanek odcepi. Molekula A₂pm je lahko v nekaterih G⁺ sevih zamenjana z L-lizinom. Polimerne verige so premrežene z amidno vezjo med karboksilno skupino D-Ala na mestu 4 in ϵ -amino skupino A₂pm (L-Lys) na mestu 3. Pri G⁻ sevih je ta povezava direktna, pri G⁺ sevih pa je prisoten tudi polipeptidni most, čigar sestava in število aminokislin lahko variirata. Poleg aminokislin, ki so prisotne v tetrapeptidu lahko vsebuje tudi glicin, treonin, serin, lizin, ornitin in asparaginsko kislino. *S. aureus*, ki je eden izmed bolj preučevanih G⁺ bakterij, na primer vsebuje polipeptidni most sestavljen iz petih glicinskih ostankov, ki jih pripenjajo peptidiltransferaze femX, femA in femB. Znanih je več kot sto različnih vrst peptidoglikanov, ki se razlikujejo predvsem v kemijski sestavi polipeptidnega dela. (8, 12, 13)

1.5 BIOSINTEZA PEPTIDOGLIKANA

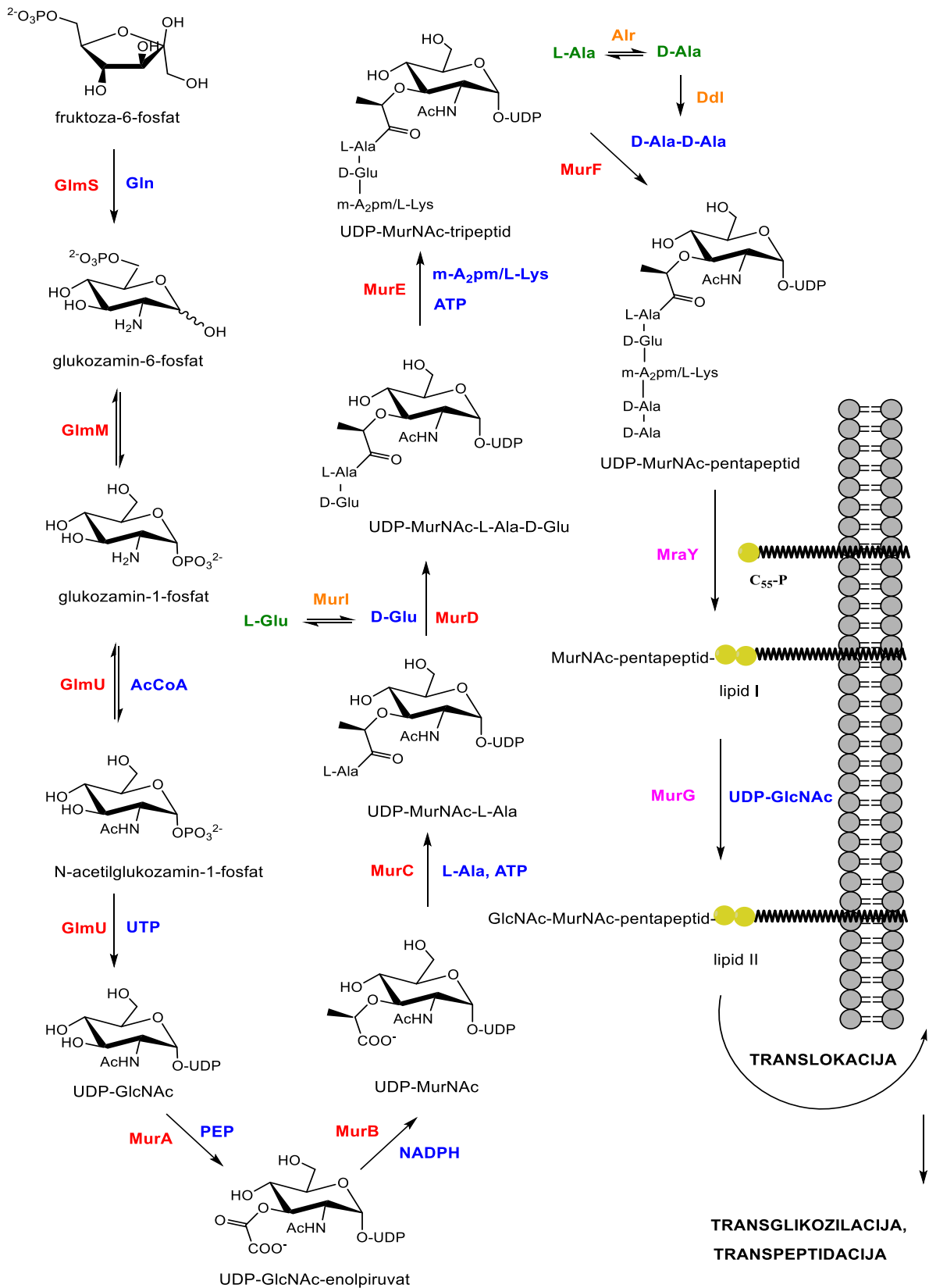
Biosinteza peptidoglikana je kompleksen sklop reakcij, ki potekajo na treh mestih v celici (slika 3). V citoplazmi poteče sinteza nukleotidnih prekurzorjev, na notranji strani citoplazemske membrane poteče sinteza na lipid vezanih intremediatov, na zunanji strani pa reakcije polimerizacije. Zaradi prisotnosti peptidoglikana pri bakterijah in njegovi odsotnosti pri ljudeh so encimi, ki katalizirajo reakcije njegove biosinteze, odlična selektivna tarča.

Reakcije, ki potekajo v citoplazmi lahko razdelimo na štiri sklope:

- sinteza uridildifosfat-*N*-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) iz fruktoze-6-fosfata
- sinteza uridildifosfat-*N*-acetilmuraminske kisline (UDP-MurNAc) iz UDP-GlcNAc
- sinteza pentapeptidnega fragmenta na UDP-MurNAc
- stranske reakcije sinteze D-glutaminske kisline in dipeptida D-alanil-D-alanin (D-Ala-D-Ala) (12, 13)

Za sintezo UDP-GlcNAc iz fruktoze-6-fosfata so potrebni štirje koraki, pri čemer sodelujeta encima GlmS, GlmM in bifunkcionalni encim GlmU. Sintezo UDP-MurNAc iz UDP-GlcNAc sestavljata dve reakciji. Encim MurA na hidroksi skupino na mestu 3 izhodnega UDP-GlcNAc prenese enolpiruvat iz fosfoenolpiruvata (PEP) po adicijsko-eliminacijskem mehanizmu, pri čemer se odcepi P_i . Naslednja reakcijo katalizira MurB. Najprej poteče redukcija FAD do $FADH_2$ ob prisotnosti NADPH, sledi pa redukcija vinilenolnega etra UDP-GlcNAc-enolpiruvata do UDP-MurNAc. Sintezo pentapeptida, končnega produkta citoplazemske sinteze, katalizirajo od ATP-odvisne ligaze MurC, MurD, MurE, MurF, ki na D-laktatno skupino UDP-MurNAc zaporedno pripenjajo aminokislino L-Ala, D-Glu, m- A_2pm ali L-Lys in dipeptid D-Ala-D-Ala. Pomembni sta tudi dve stranski reakciji sinteze prekursorjev za vgradnjo v pentapeptid. D-Ala nastane iz L-Ala ob prisotnosti od piridoksal 5-fosfat-odvisnega encima, alanin racemaze, kondenzacijo dveh molekul pa katalizira od ATP-odvisna ligaza D-Ala:D-Ala ligaza (Ddl). D-glutaminska kislina nastane iz L-glutaminske kisline ob prisotnosti MurI ali iz D-alanina in α -ketoglutarata ob prisotnosti D-AAT.

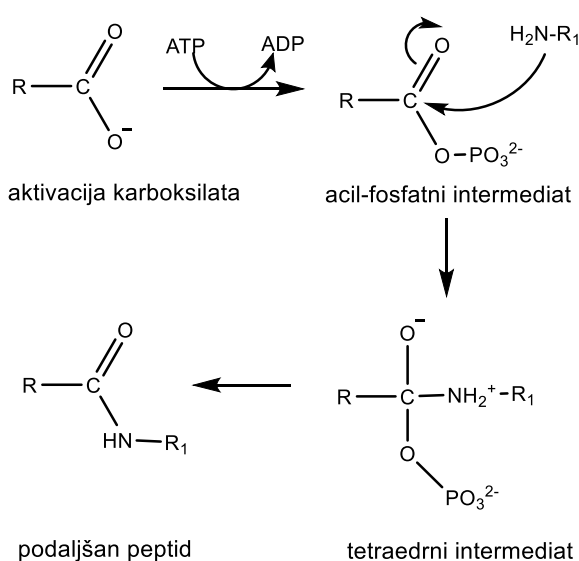
Membranski del sinteze peptidoglikana se prične s premestitvijo fosfo-MurNAc-pentapeptida s citoplazemskega prekursorja na membranski prenašalni lipid undekaprenil fosfat (C_{55} -P). Nastane undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-pentapeptid (lipid I), reakcijo pa katalizira MraY. MurG katalizira prenos substrata GlcNAc iz UDP-GlcNAc na lipid I, pri čemer nastane undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapeptid)-GlcNAc (lipid II), na katerem poteče večina modifikacij peptidne verige (pripetje aminokislin na mesto 3 peptidne verige). Sledi prenos lipida II iz notranjega dela membrane na zunanji del. Nekaj študij potrjuje teorijo, da naj bi pri tem procesu domnevno sodeloval protein flipaza, vendar sta njegova identiteta in mehanizem delovanja še nepoznana. Na zunanji strani poteče sklopitev disaharida z rastočo glikansko verigo v reakciji transglikozilacije, pri čemer se odcepi C_{55} -PP. V procesu transpeptidacije se ustvarijo povezave med aminokislinskimi ostanki pentapeptida. Transglikozilacijo in transpeptidacijo katalizirajo penicilin-vezoči proteini (PBPs). Poteče še regeneracija undekaprenil fosfata, ki jo katalizira specifični lipidni pirofosforilazni encim UppP. (12-15)



Slika 3: Biosinteza peptidoglikana

1.6 MUR LIGAZE

Sinteza peptidoglikana je kompleksen biokemijski proces, pri katerem sodelujejo tudi štirje encimi iz družine Mur ligaz (MurC, MurD, MurE, MurF). Njihova naloga je zaporedno pripenjanje aminokislin na D-laktatno skupino sladkorne komponente UDP-MurNAc do nastanka pentapeptida. Njihovo strukturo, funkcijo in mehanizem delovanja so proučevali s pomočjo aminokislinskega sekvenciranja, usmerjene mutageneze, biokemijskih eksperimentov in kristalografske določitve strukture. Danes dobro razumemo mehanizem njihovega delovanja, znane pa so tudi njihove strukture. (15)



Definicija Mur ligaz kot nove družine encimov izvira iz visoke stopnje ohranjenosti aminokislinskih sekvenc v določenih funkcijsko pomembnih delih encimov. V to družino spadajo tudi trije drugi encimi, ki niso povezani s sintezo peptidoglikana. To so folilpoliglutamat sintetaza (FPGS), capB encim, odgovoren za poli- γ -glutamat sintezo pri rodu *Bacillus* in C-terminalna domena bifunkcionalne cianoficin sintetaze (CphA). (15)

Slika 4: Reakcijski mehanizem Mur ligaz

Reakcijski mehanizem vseh Mur ligaz poteka po istem principu (slika 4). Ti encimi izkoriščajo energijo fosfatne vezi molekule ATP za katalizo pripenjanja aminokislin na rastočo peptidno verigo nukleotida UDP-MurNAc. Kataliza se začne z zaporedno vezavo substratov ATP, nukleotida in aminokislina oz. dipeptida, nato poteče aktivacija nukleotidnega substrata z ATP. Divalentni kation Mg^{2+} ali Mn^{2+} s pozitivnim nabojem poveže negativno nabite skupine molekule ATP in nukleotidnega substrata in tako facilitira vezavo substrata in fosforilacijo C-terminalne karboksilne skupine nukleotida. Acil-fosfatni intermediat stabilizirajo molekule vode. Amino skupina pripenjajoče aminokislina po mehanizmu nukleofilne substitucije S_N2 napade karbonilni ogljikov atom, nastane

visokoenergijski tetraedrični intermediat in po odcepu anorganskega fosfata se formira peptid. (12, 16, 17)

Mur ligaze so sestavljene iz treh domen. N-terminalna domena 1 veže UDP-prekurzor, centralna domena 2 veže ATP in C-terminalna domena 3 veže aminokislino oz. dipeptid. Topološko in tridimenzionalno sta si centralna in C-terminalna domena zelo podobni med vsemi ligazami, do razlik pa prihaja pri N-terminalni domeni. Podobni sta si domeni encimov MurC in MurD ter MurE in MurF, saj je za razlike odgovorna različna dolžina vezočega UDP-substrata. Čeprav se encimi v celotni sekvenci aminokislin ujemajo od 15% do 22% pa najdemo poleg mesta za vezavo ATP še šest specifičnih mest z visoko ohranjenim zaporedjem na domeni 2 in 3. (12,15) Vlogo ohranjenih aminokislin v aktivnem mestu so z usmerjeno mutagenezo preučevali na encimu MurD *E. coli*. Vsi mutanti so imeli zmanjšano encimsko aktivnost, kar poudarja njihovo pomembno vlogo. (17)

Encimi so si tridimenzionalno podobni in obstajajo v odprti in zaprti konformaciji, ki je povezana z vezavo liganda in pri čemer se domena 3 pomakne proti domeni 2 in 1. Vezava ATP inducira konformacijske spremembe in omogoči ustrezno vezavo naslednjih substratov. MurE in MurF sta v primerjavi z MurC in MurD izpostavljena bolj izraziti rotaciji domen z namenom razširitve interdomenskega prostora za akomodacijo daljšega nukleotidnega substrata. (16)

1.6.1 MurF

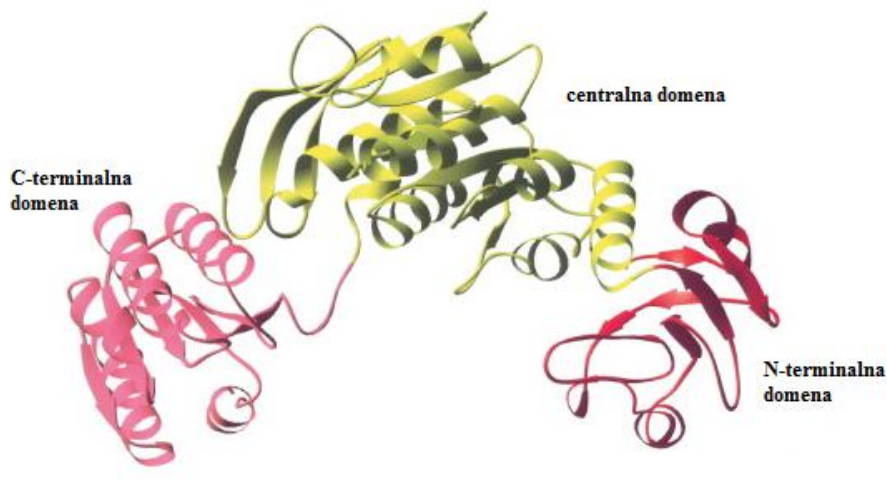
UDP-*N*-acetilmuramil-L-alanin-D-glutamat-*m*-diaminopimelat/L-lizin D-alanil-D-alanin ligaza ali MurF je četrta amidna ligaza v biosintezi peptidoglikana. Njegova naloga je pripenjanje dipeptida D-Ala-D-Ala na nukleotidni prekurzor UDP-MurNAc-tripeptid. MurF sprejema širši spekter substratov kot ostale Mur ligaze, saj je pri nekaterih sevih, odpornih na glikopeptidne antibiotike, substrat lahko tudi D-Ala-D-Lac ali D-Ala-D-Ser. Afiniteta do dveh oblik UDP-MurNAc-tripeptida (mezo-A₂pm ali L-Lys) je enaka, močno zaviranje encima pa povzroči presežek UDP-MurNAc-tripeptida. S študijami na izoliranem encimu so ugotovili, da ima encim visoko substratno specifičnost za C-terminalno aminokislino dipeptidnega substrata. (12,16)

Poznane so kristalne strukture apo encima in kokristaliziranega z ligandi. Izoliran apo MurF encim, kristaliziran iz *E. coli* je zgrajen iz 452 aminokislin, pri čemer se sekvence v

10-20% ujemajo s sekvencami encimov MurC-MurE. Sestavljajo ga tri domene, razporejene v obliki polmeseca (slika 5):

- N-terminalna domena vključuje aminokislino od 1 do 81 in izkazuje edinstveno topologijo v primerjavi z ostalimi mur ligazami.
- centralna domena vključuje aminokislino od 82 do 310. Zvitje je kot pri ostalih mur ligazah podobno zvitju za vezavo mononukleotidov. Ta domena izkazuje največjo stopnjo strukturnega in sekvenčnega ujemanja med ligazami.
- C-terminalno domeno sestavljajo aminokislino od 311 do 447 in vsebuje dinukleotidno vezavno mesto, znano kot Rossmannovo zvitje.

N in C-terminalna domena sta v odprti konformaciji proteina med vsemi Mur ligazami najbolj oddaljeni in zagotavljata širok prostor, namenjen vdoru topila. V procesu zaporedne vezave substratov je ATP prvi substrat, ki se veže in povzroči konformacijske spremembe proteina, ki ga pripravijo za vezavo drugega in tretjega substrata. (18)

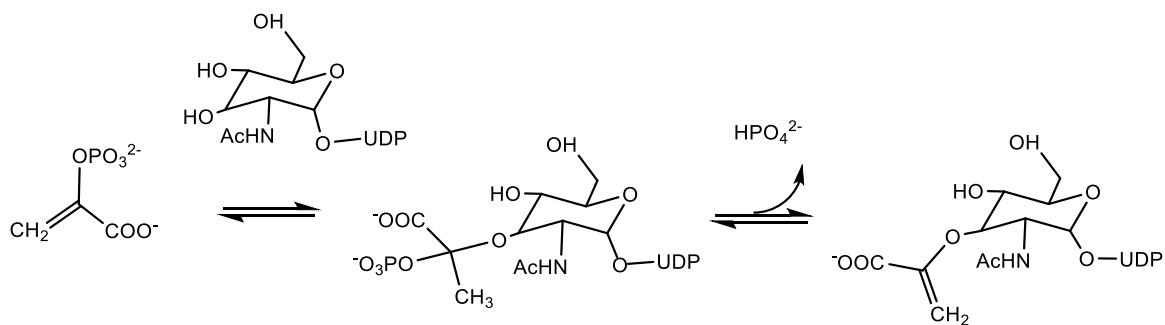


Slika 5: Apo MurF iz *Escherichia coli* (prirejeno po 18)

1.7 TRANSFERAZA MurA

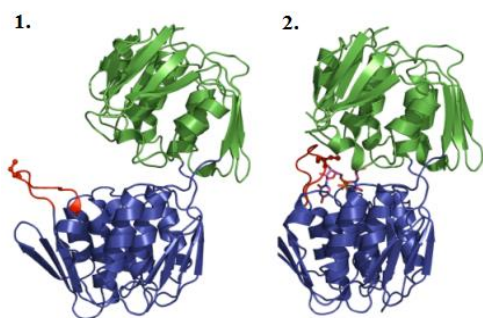
Transferaza MurA ali UDP-*N*-acetilglukozamin enolpiruvil transferaza katalizira adicijsko-eliminacijsko reakcijo nastanka UDP-GlcNAc-enolpiruvata iz UDP-GlcNAc. Edina druga poznana enolpiruvat transferaza je 5-enolpiruvilshikimat-3-fosfat sintaza, s katero se v 25% ujemata v sekvencah aminokislin. (12)

Katalitska reakcija poteka po adicijsko-eliminacijskem mehanizmu (slika 6). Pod vplivom stranskih verig encima poteče protonacija C-3 skupine fosfoenolpiruvata in deprotonacija 3'-OH skupine UDP-GlcNAc. Nekovalentno vezan intermedat fosfolaktoil-UDP-*N*-acetilglukozamin se formira po napadu 3'-OH substrata UDP-GlcNAc na C-3 skupino fosfoenolpiruvata. Po odcepitvi anorganskega fosfata nastane končni produkt. Identificiran je bil tudi intermedat, kovalentno vezan na encim, pri čemer gre za povezavo med ostankom Cys-115 in C-2 skupino fosfoenolpiruvata in formacijo O-fosfotiokealnega intermedata. Vendar so dokazali, da kovalentni intermedat ni nujen za katalizo. (12, 19)



Slika 6: Adicijsko-eliminacijski mehanizem reakcije, ki jo katalizira MurA

Poznane so kristalne strukture apo encima in kokristaliziranega z ligandi. Sestavljen je iz dveh globularnih domen (slika 7). Po številčenju na podlagi MurA iz *E. coli* prvo domeno sestavljajo aminokislinski ostanki 22-229 in vsebuje aktivno mesto Cys-115, drugo domeno pa sestavljajo ostanki 1-21 in 230-419. Zvitje obeh domen je zelo podobno, sestavljajo jih tri paralelne vijačnice, obdane s tremi vijačnicami in tremi β ploskvami,



Slika 7: 3D struktura MurA.

- 1.) Apo encim *Enterobacter cloacae*
- 2.) Zaprta konformacija encima *Escherichia coli*. Domeni sta modri in zeleni, zanka Pro 112-Pro 121 je rdeča, Cys 115 prikazan z modelom kroglic in palčk (prirejeno po 12)

sestavljenimi iz štirih verig. Pri odprti konformaciji encima je fleksibilna zanka Pro112-Pro121, ki vsebuje aktivno mesto, izpostavljena molekulam topila, ob vezavi substrata UDP-GlcNAc pa pride do indukcije velike konformacijske spremembe in encim je tako v zaprtem stanju pripravljen na katalizo. Strukturne spremembe povzroči tudi fosfoenolpiruvat, vendar so manj izrazite kot pri nukleotidnem substratu. Ugotovljeno je bilo, da se UDP-MurNAc, produkt naslednje stopnje v sintezi peptidoglikana, veže na MurA in ga zavira. To nakazuje na vlogo nukleotidov v regulaciji sinteze peptidoglikana. G- bakterije imajo eno kopijo gena za MurA, G+ bakterije pa dve kopiji, kar je verjetno posledica genske duplikacije. Encima MurA1 in MurA2 iz *S. pneumoniae* so karakterizirali in ugotovili, da so katalitični parametri podobni, prav tako oba encima zavira fosfomicin. (17, 19)

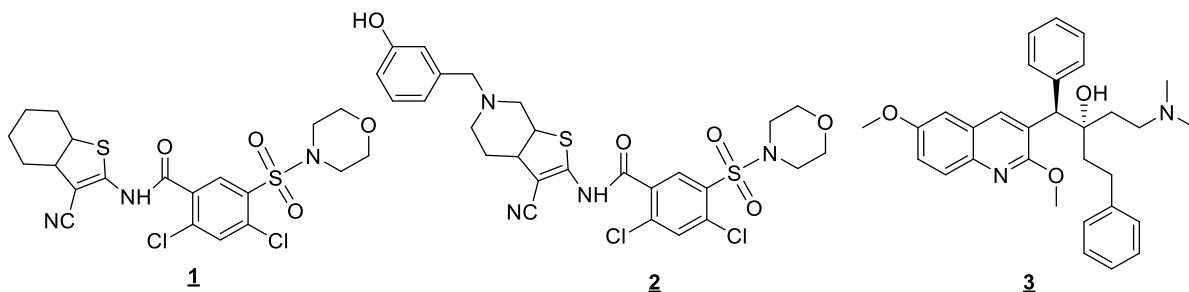
Mur encimi so zaradi odsotnosti strukturne podobnosti s sesalskimi encimi in esencialnosti za bakterijsko preživetje primerna tarča za selektivno toksičnost. Poleg tega encimi izkazujejo strukturno in funkcionalno homologijo med bakterijskimi sevi, kar pomeni potencialno širokospektralnost zaviralcev. Primerjalne molekularne študije pa omogočajo celo racionalno načrtovanje molekul, ki zavirajo več Mur encimov in tako se zmanjša možnost za razvoj bakterijske rezistence. (13, 17)

1.8 ZAVIRALCI MurF

Prvi zaviralci MurF so bili pseudo tripeptidi in tetrapeptidi aminoalkilfosfinske kisline. Delovali so kot reverzibilni kompetitivni zaviralci prehodnega stanja, vendar niso izkazovali protibakterijskega učinka. (20)

V družbi Abbott so s tehnologijo afinitetnega rešetanja, sklopljenega z masno spektroskopijo testirali knjižnico majhnih spojin na proteinu MurF *S. pneumoniae*. Odkrili so dva sulfonamidna zaviralca (spojina **1**) ter ju kokristalizirali z encimom. Vezavno mesto zaviralcev sovpada z domnevnim vezavnim mestom za substrat, pri čemer povzroči konformacijsko spremembo proteina, ki zavzame topološko kompaktno stanje. To je podobno zaprti konformaciji proteina, ki ga zavzamejo Mur ligaze, vendar ni popolnoma identično konformaciji, ki jo med katalizo zavzame MurF. (20, 21) Na podlagi interakcij, prisotnih v kompleksu protein-ligand, in SAR modela so razvili nove spojine z IC₅₀ 22-70 nM, vendar niso izkazovale protibakterijskega delovanja. Testiranje so izvedli tudi v prisotnosti pospeševalcev celične penetracije in na mutiranih sevih brez efluks črpalk,

vendar so bili rezultati enaki. (22) Sistematične strukturne modifikacije najbolj obetavnih zaviralcev so vodile do serije cianotiofenskih nanomolarnih zaviralcev MurF iz *S. pneumoniae* in mikromolarnih zaviralcev iz *E. coli* in *S. aureus*. Nekatere izmed teh spojin so izkazovale protibakterijsko aktivnost na *S. pneumoniae* (spojina **2**). Dve molekuli so kokristalizirali v kompleksu z MurF iz *S. pneumoniae*. (23) Pred kratkim so predstavili še drugo generacijo cianotiofenskih zaviralcev s povečano polarnostjo. Najbolj obetavne spojine iz te serije imajo protibakterijsko delovanje proti izbranim G+ in G- sevom, vendar je del njihove aktivnosti posledica neselektivne poškodbe membran. (24) Z namenom poiskati nove zaviralce z modificiranimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi so postavili nove QSAR modele in tako definirali nekatere pomembne faktorje pri načrtovanju zaviralcev. (25) S tehniko strukturno podprtega virtualnega rešetanja in optimizacije spojine vodnice so odkrili zmerno aktiven 1,3,5-triazin (26, 27), prav tako pa so s tehnologijo rešetanja na osnovi liganda odkrili cianotiofenski zaviralec, ki se od spojine vodnice (spojina **1**) razlikuje v substituentih. (28) Na podlagi zaviralcev iz serije 8-hidroksikinolonov, izmed katerih je imel 4-fenilpiperidinski derivat protibakterijsko delovanje, so postavili model farmakofora in razvili dva diarilkinolona s protibakterijskim delovanjem (spojina **3**). (29, 30)



$IC_{50}(E. coli) = 1 \mu M$

$MIC(S. pneumoniae) = 16 \mu g/mL$

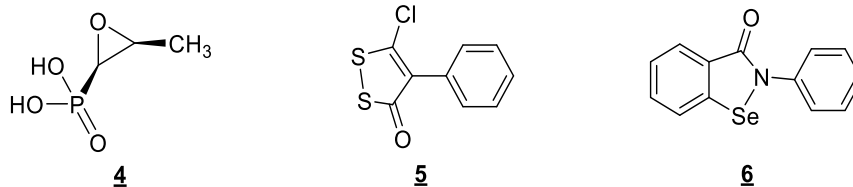
$MIC(S. aureus) = 8 \mu g/mL$

Slika 8: Nekateri zaviralci encima MurF

1.9 ZAVIRALCI MurA

MurA je do sedaj edina tarča med Mur encimi, za katero je na voljo klinično uporabljeno zdravilo. Ta učinkovina je fosfomicin (spojina **4**), naravno prisoten širokospektralni antibiotik z epoksidno strukturo. Je analog fosfoenolpiruvata in ireverzibilni kompetitivni zaviralec, ki tvori kovalentno vez z aktivnim mestom encima (Cys115). Časovno odvisno zaviralno delovanje je pospešeno v prisotnosti substrata UDP-GlcNA. (17, 20)

S tehnologijo rešetanja so odkrili ciklični disulfid (spojina **5**), pirazolopirimidin in purinski analog z manjšimi IC₅₀ vrednostmi, kot jih ima fosfomicin. Izkazovale so tudi protibakterijsko delovanje in nespecifično zaviranje DNA, RNA in sinteze proteinov. Z metodo iskanja zaviralcev v sklopu celotne biosinteze peptidoglikana so odkrili derivat diarilmetana. Dva derivata 5-sulfonoksi-antranilne kisline z IC₅₀ vrednostmi v mikromolarnem območju sta kompetitivna zaviralca encima z UDP-GlcNAc in preprečujeta konformacijski prehod iz odprte v zaprto obliko, ki je potrebna za katalizo. S tehnologijo »phage display« (predstavitev proteina na površini faga) so identificirali peptidni zaviralec z IC₅₀ v mikromolarnem območju. (20) Odkrili so dva seskviterpenska laktona, knicin in cinaropikrin s protibakterijskim delovanjem, ki pa ni nujno samo posledica zaviranja encima MurA, ampak tudi elektrofilnega napada na številna nukleofilna vezavna mesta v celici. (31, 32) Z rešetanjem visokih zmogljivosti so v Novartisovi kemijski knjižnici odkrili 2-aminotetralonske derivate, pri katerih gre domnevno za kovalentno vezavo ketona na aktivno mesto Cys115 in benzotioksalonske derivate, ki so reverzibilni zaviralci. (33, 34) Ebselen (spojina **6**), timerosal in tiram kovalentno modificirajo Cys 117 v odprti konformaciji encima in povzročijo prehod v kompaktno konformacijo, ki preprečuje vezavo nukleofilnega substrata. (20)



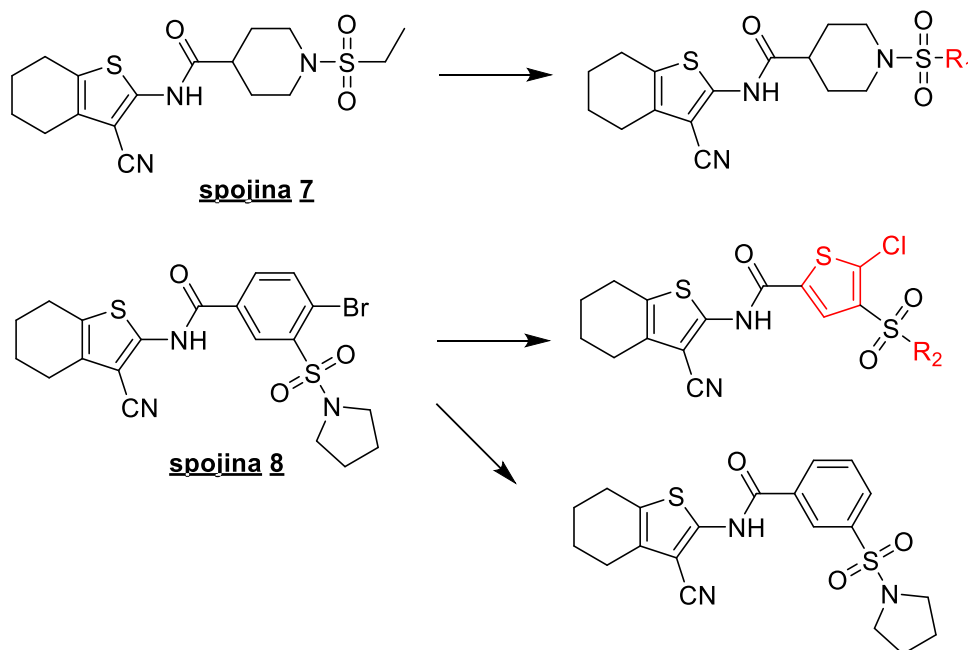
MIC (*E. coli*)= 16 µg/mL MIC (MRSA) = 4 µg/mL MIC (*S. aureus*)= 0,2 µg/mL

Slika 9: Nekateri zaviralci encima MurA

2. NAMEN IN POTEK DELA

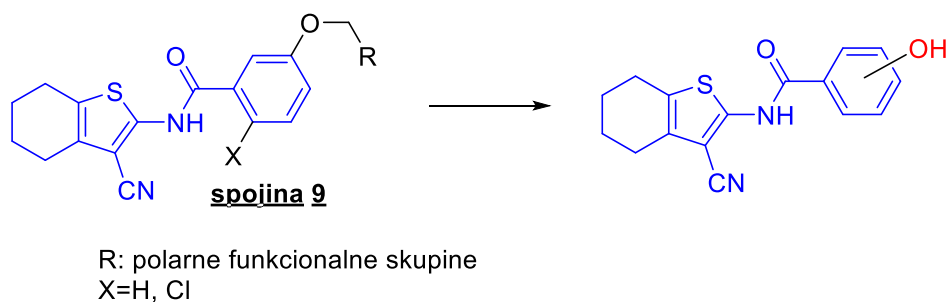
Namen magistrske naloge je sinteza novih amidov 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiefen-3-karbonitrila kot zaviralcev encimov MurA in MurF na podlagi že objavljenih zaviralcev z istim skeletom – spojin **7**, **8** in **9**. Naši cilji so:

1. Na osnovi znanih zaviralcev encima MurA iz knjižnice spojin Fakultete za farmacijo, spojine **7** z $IC_{50} = 30 \mu M$ in spojine **8** z $IC_{50} = 15 \mu M$ (35), bomo sintetizirali nove zaviralce. Razvili bomo sintezni postopek, resintetizirali spojino **7** in etilni fragment nadomeščali z drugimi substituenti. Pri spojini **8** bomo izvedli biozosterno zamenjavo benzena in broma, spreminjali pirolidinski fragment ter sintetizirali spojino brez halogenov (slika 10).



Slika 10: Načrtovani novi zaviralci na osnovi spojine **7** in **8** (spremembe so označene z rdečo).

2. Amidi 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiefen-3-karbonitrila so znani zaviralci encima MurF. Z namenom zmanjšanja lipofilnih lastnosti zaviralcev so predstavili generacijo spojin z večjo topnostjo ter določili skelet, pomemben za zaviralno aktivnost (spojina **9**). (24) Sintetizirali bomo spojine, ki bodo vsebovale fragment, esencialen za zaviralno aktivnost, in spreminjali pozicijo hidroksi skupine na benzenu (slika 11). Naša hipoteza je, da bodo te spremembe vodile k izboljšanju zaviralne aktivnosti, hkrati pa omogočile prehod spojin v bakterijsko celico, zaradi večje polarnosti pa se bo povečala tudi topnost. Na ta način bomo pripravili spojine, ki bi lahko bile bolj primerne kandidatke za zdravilne učinkovine.



Slika 11: Načrtovane spremembe pozicije hidroksilne skupine. Skelet, esencialen za zaviralno delovanje je označen z modro, načrtovane spremembe pa z rdečo.

3. Sintetiziranim spojinam bomo določili zaviralno aktivnost na izoliranih encimih MurA in MurF, aktivnim spojinam pa tudi MIK ter tako ovrednotili vpliv strukturnih sprememb na delovanje spojin.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali reagente, topila, raztopine in sušilna sredstva različnih proizvajalcev (Acros Organics, Carlo Erba reagents, Apollo Scientific, Fluka, Sigma Aldrich, Merck). Brezvodna topila smo pripravili tik pred uporabo z destilacijo in sušenjem nad molekularnimi siti.

Reagenti: 3-klorosulfonilbenzojska kislina, malononitril, cikloheksanon, morfolin, žveplo, trietilamin, pirolidin, klorsulfonska kislina, piridin, oksalilklorid, K_2CO_3 , 5-klorotiofen-2-karboksilna kislina, acetanhidrid, DPPA, DMF, benzoilklorid, 3-hidroksibenzojska kislina, 4-hidroksibenzojska kislina, 3,5-dihidroksibenzojska kislina, izonipekotinska kislina, dimetilaminosulfonilklorid, benzensulfonilklorid, etilsulfonilklorid, Na_2CO_3

Topila, ki smo jih uporabljali pri sintezi in čiščenju: metanol, etanol, aceton, diklorometan, piridin, DMF, etilacetat, dietileter, heksan, prečiščena voda

Raztopine, ki smo jih uporabljali pri ekstrahiranjih: 1 M HCl, nasičena raztopina $NaHCO_3$, koncentrirana HCl, 10% citronska kislina

Sušilna sredstva: nasičena vodna raztopina NaCl, Na_2SO_4

Laboratorijska oprema: laboratorijska tehtnica Mettler toledo PB403-S, rotavapor Buchi waterbath B-480, magnetno mešalo IKA RTC basic, UV-lučka Lamag cabinet II

3.2. METODE

3.2.1. Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija: Za detekcijo spojin smo uporabljali plošče TLC-Silica gel 60 GF₂₅₄ z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Spojine smo detektirali pod UV svetlobo valovnih dolžin 254 nm in 366 nm, za lažjo identifikacijo pa smo uporabljali tudi orositvena reagentna bromkrezol zeleno in ninhidrin. Izbira mobilnih faz je odvisna od lastnosti spojine, navedene pa so za vsako spojino posebej.

Kolonska kromatografija: Za čiščenje nekaterih spojin smo uporabili kolonsko

kromatografijo. Stacionarna faza je bila silikagel 60 proizvajalca Merck (velikost delcev 0,040-0,063 mm). Mobilno fazo smo glede na retencijo izbrali za vsako spojino posebej.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC): Za določanje čistosti spojin smo uporabili tehniko reverzno-fazne HPLC analize na napravi Agilent Technologies HP 1100 z detektorjem G1365 UV-VIS (220, 245 in 280 nm). 10 μ L vzorca smo injecirali na 25 °C termostatirano kolono Agilent Eclipse Plus C18 (5 μ m, 4,6 \times 150 mm). Mobilna faza je bila sestavljena iz 0,1% raztopine trifluorocetne kisline v vodi in acetonitrila, pri čemer se je koncentracija slednjega v času 0-19 minut gradientno povečala iz 20 % na 90 %, v času 19-20 minut pa je bila konstantno 90 %. Odstotki čistosti spojin so podani za vse končne spojine v eksperimentalnem delu.

3.2.2 Spektroskopske metode

Jedrski magnetna resonanca (NMR): ^1H -NMR in ^{13}C -NMR spektre smo posneli na Bruker Avance III spektrometru na Fakulteti za farmacijo pri frekvenci 400 MHz oziroma 100 MHz. Spojine smo pred analizo raztopili v devteriranem topilu dimetilsulfoksidu ($\text{DMSO-}d_6$). Kemijske premike smo določili glede na interni standard tetrametilsilan (TMS), podani so v enotah »parts per million« (ppm), sklopitvene konstante (J) pa v hertzih (Hz). Signali so poimenovani glede na število in obliko vrhov: singlet (s), širok singlet (bs), dublet (d), dublet dubleta (dd), kvartet (q), multiplet (m). Obdelavo spektrov smo izvedli s programom MestReNova 8.1 proizvajalca Mestrelab Research.

Masna spektroskopija: Posnetke masnih spektrov so izvedli v Centru za masno spektroskopijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani na masnem spektrometru Q-TOF Premier (Micromass, Waters, Manchester, Velika Britanija) z ESI-HRMS tehniko.

Infrardeča spektroskopija: spektre smo posneli na Perkin-Elmer, FT-IR System, Spectrum BX na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani s tehniko oslabiljenega popolnega odboja (ATR).

3.2.3 Določanje tališča

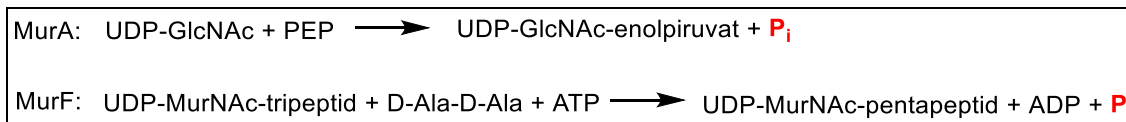
Spojinam smo tališče smo določali s Kofflerjevim mikroskopom na mikroskopu z ogrevalno mizico proizvajalca Leica na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani, vrednosti niso korigirane.

3.2.4 Risanje in poimenovanje spojin

Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabljali programsko opremo ChemBioDraw Ultra 14.0 proizvajalca Cambridge Soft. Pri iskanju sinteznih postopkov v podatkovnih bazah smo uporabljali programsko opremo SciFinder.

3.2.5 Farmakološko in protibakterijsko testiranje

Sintetiziranim spojinam smo določili zaviralno aktivnost na izoliranih encimih MurA in MurF na podlagi testa z barvilom malahitno zeleno, ki mu je dodan amonijev molibdat (Biomol® reagent). Pri testu smo posredno detektirali anorganski fosfat, ki se sprosti pri encimsko katalizirani reakciji in je sorazmeren z aktivnostjo encima (slika 11). Anorganski fosfat z molibdatom tvori fosfomolibdat, ki s tremi molekulami malahitno zelenega tvori obarvan kompleks, ki ga spektrofotometrično določamo pri 650 nm.



Slika 12: Encimsko katalizirani reakciji, pri katerih se sprosti P_i

Reakcijska zmes s končnim volumnom 50 μ L je vsebovala:

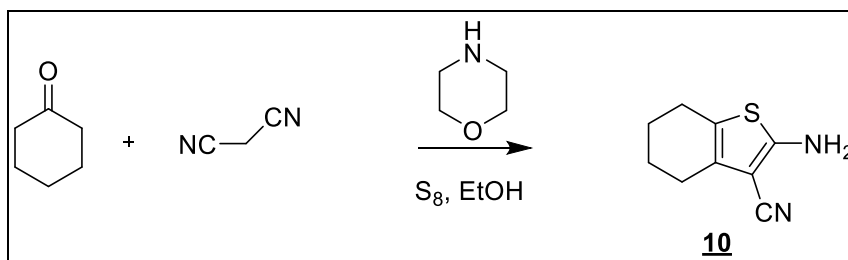
- ***S. pneumoniae* MurF:** 50 mM Hepes pufer, pH 8,0; 50 mM $MgCl_2$; 0,005% Triton X-114; 100 μ M D-Ala-D-Ala; 50 μ M UDP-dipeptid-L-Lys; 250 μ M ATP; očiščen MurF_{SP} in 100 μ M inhibitorja v DMSO
- ***E. coli* MurF:** 50 mM Hepes, pH 8,0; 50 mM $MgCl_2$; 0,005% Triton X-114; 600 μ M D-Ala-D-Ala; 100 μ M UDP-dipeptid-mA₂pm; 500 μ M ATP; očiščen MurF_{SP} in 100 μ M inhibitorja v DMSO
- **MurA:** 50 mM Hepes pufer, pH 7,8; 0,3 mM DTT; 0,005% Triton X-114; 200 μ M PEP; 200 μ M UDP-GlcNAc; očiščen MurA in 100 μ M inhibitorja v DMSO

Končna koncentracija DMSO je bila 5% (v/v). Triton X-114 je površinsko aktivna snov, ki smo jo dodali z namenom preprečiti nastanek hidrofobnih skupkov in s tem lažno pozitivnih rezultatov. DTT je antioksidant, ki se uporablja za antioksidativno zaščito proteinov. Reakcijsko zmes smo inkubirali 15 minut pri 37 °C in reakcijo ustavili z dodatkom Biomol® reagenta ter izmerili absorbanco. Vse meritve smo izvedli v dveh paralelkah. Rezidualno aktivnost smo izračunali kot razmerje absorbance ob prisotnosti zaviralca in brez njega.

Protibakterijsko delovanje najmočnejših zaviralcev smo določili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrskih ploščah na sevih *S. aureus* in MRSA. Za sev *S. aureus* smo uporabili gojišče Luria Bertani Broth, za sev MRSA pa Trypticase Soy Broth. Farmakološko testiranje na MurF in določitev protibakterijskega delovanja je opravila asist. Kaja Rožman, mag. farm. na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

4.1. Sinteza 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-karbonitrila (spojina **10**)

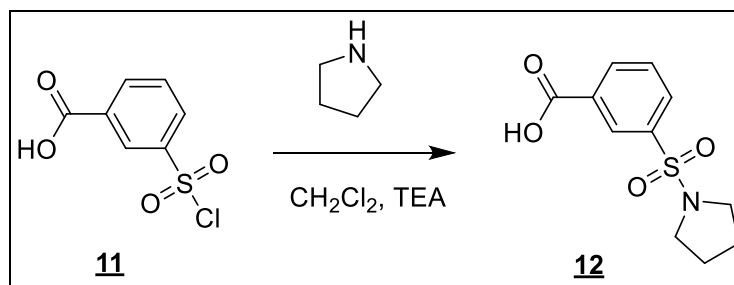


Raztopini cikloheksanona (9,80 g, 99,93 mmol) in malononitrila (6,60 g, 99,97 mmol) v etanolu (100,0 mL) smo dodali žveplo (3,52 g, 109,76 mmol) in morfolin (17,4 mL, 200,00 mmol) ter zmes segrevali pod reflukso 2 uri.

Zmes smo ohladili na sobno temperaturo ter izpadlo oborino odfiltrirali z odsesavanjem ter spirali z vodo.

2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-karbonitril (10)		$M_r=178,25$ g/mol
Izgled	rjavi kristali	
Izkoristek	90%	
Retencijski faktor	0,45 (MF: EtOAc/heksan=1/1)	
Tališče	140-143 °C (literatura (36): 145 °C)	

4.2 Sinteza 3-(pirolidin-1-ilsulfonil)benzojske kisline (spojina **12**)

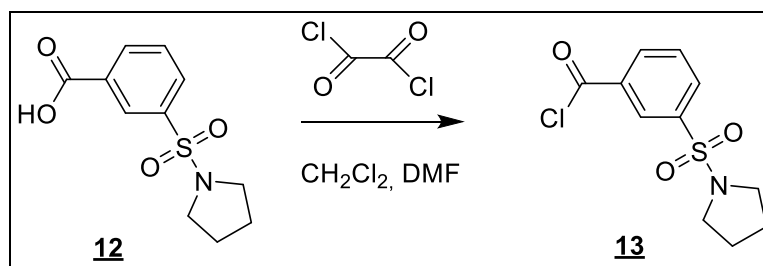


Raztopini spojine **11** (1,44 g, 6,53 mmol) v CH₂Cl₂ (10,0 mL) smo dodali trietilamin (2,1 mL, 16,25 mmol) in zmes ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodajali pirolidin (0,6 mL, 7,18 mmol) in reakcijsko zmes mešali čez noč na sobni temperaturi.

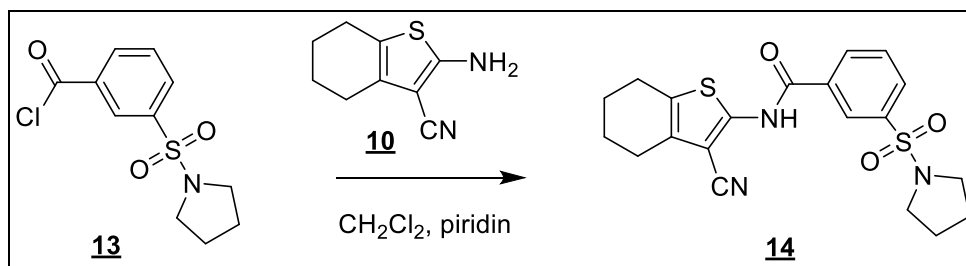
Naslednji dan smo zmesi dodali 1 M HCl (10,0 mL) in nato vodno fazo ekstrahirali s CH_2Cl_2 ($3 \times 10,0$ mL). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (20,0 mL), posušili z Na_2SO_4 ter topilo odparili pod znižanim tlakom.

3-(pirolidin-1-ilsulfonil)benzojska kislina (<u>12</u>)		$M_r=255,29$ g/mol
Izgled	beli kristali	
Izkoristek	15 %	
Retencijski faktor	0,58 (MF: EtOAc/MeOH=5/1)	
Tališče	154-155 °C	
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)	$\delta = 1,64-1,68$ (m, 4H, $(\text{CH}_2)_2$); 3,13-3,17 (m, 4H, CH_2NCH_2); 7,77-7,81 (m, 1H, Ar-H); 8,05-8,07 (m, 1H, Ar-H); 8,22-8,25 (m, 2H, $2 \times$ Ar-H); 13,57 (bs, 1H, COOH) ppm	
IR (ν_{max})	2959, 2881, 2555, 2361, 1689, 1600, 1577, 1442, 1415, 1341, 1304, 1269, 1164, 1132, 1086, 1009, 939, 856, 815, 777, 749, 679, 659 cm^{-1}	
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za $\text{C}_{11}\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$ $[\text{M-H}]^-$ (m/z): 254,0487	
	Izmerjena vrednost: 254,0481	

4.3 Sinteza *N*-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)-3-(pirolidin-1-ilsulfonil)benzamida (spojina 14)



Raztopini spojine **12** (0,24 g, 0,95 mmol) v brezvodnem CH_2Cl_2 (10,0 mL) smo po kapljicah dodali katalitsko količino DMF in oksalil klorida (1,5 mL, 17,50 mmol) pod argonovo atmosfero in zmes mešali pol ure pri sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.



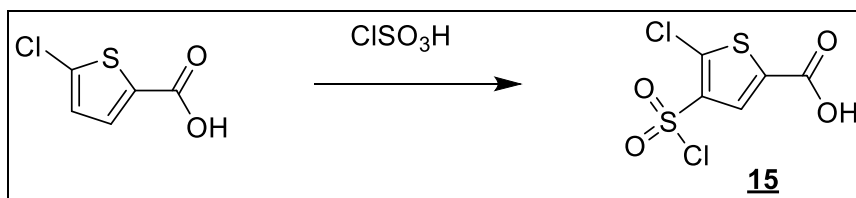
Spojino **13**, produkt iz prejšnjega koraka, smo raztopili v CH_2Cl_2 (10,0 mL) in po kapljicah dodali zmes spojine **10** (0,15 g, 0,85 mmol) in piridina (0,7 mL, 8,58 mmol) ter mešali čez noč na sobni temperaturi.

Reakcijsko zmes smo sprali z 1 M HCl (10,0 mL), nasičeno raztopino NaHCO_3 (10,0 mL) in nasičeno raztopino NaCl (10,0 mL) ter posušili z Na_2SO_4 . Topilo smo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s prekristalizacijo iz etanola.

<i>N</i>-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-3-(pirolidin-1-ilsulfonil)benzamid (14)		$M_r=415,53$ g/mol
Izgled	rjav amorfna snov	
Izkoristek	38 %	
Retencijski faktor	0,25 (MF: EtOAc/Hex=1/3)	
Tališče	184 °C	
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	$\delta = 1,65\text{-}1,69$ (m, 4H, $(\text{CH}_2)_2$); $1,75\text{-}1,82$ (m, 4H, $(\text{CH}_2)_2$); $2,52\text{-}2,58$ (m, 2H, CH_2); $2,63\text{-}2,68$ (m, 2H, CH_2); $3,18\text{-}3,22$ (m, 4H, CH_2NCH_2); $7,83$ (t, 1H, $J=7,8$ Hz, Ar-H); $8,06\text{-}8,08$ (m, 1H, Ar-H); $8,25\text{-}8,27$ (m, 1H, Ar-H); $8,30\text{-}8,31$ (m, 1H, Ar-H); $12,00$ (s, 1H, NH) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6)	$\delta = 21,66; 22,55; 23,45; 23,59; 24,75; 47,90; 96,40; 114,16; 126,75; 129,05; 129,89; 130,77; 131,57; 132,71; 133,43; 136,65; 145,86; 163,94$ ppm	
IR (ν_{max})	3256, 2938, 2225, 1666, 1576, 1555, 1461, 1345, 1324, 1291, 1263, 1161, 1116, 1087, 1015, 932, 853, 817, 765, 736, 688, 671 cm^{-1}	
HPLC	$t_R = 17,583$ min, 97,61% ($\lambda=254$ nm), 97,22% ($\lambda=220$ nm)	

ESI-HRMS	Izračunana vrednost za $C_{20}H_{21}N_3O_3S_2 [M-H]^-$ (m/z): 414,0946
	Izmerjena vrednost: 414,0948

4.4 Sinteza 5-kloro-4-(klorosulfonil)tiofen-2-karboksilne kisline (spojina 15)



V bučki, opremljeni s klorkalcijevo cevko, smo na 0 °C ohladili klorosulfonsko kislino (4,1 mL, 61,60 mmol), nato pa smo po delih ob mešanju dodajali 5-klorotiofen-2-karboksilno kislino (2,00 g, 12,30 mmol). Reakcijsko zmes, opremljeno s povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko, smo nato ob mešanju na oljni kopeli segrevali 16 ur pri 140 °C.

Nato smo reakcijsko zmes ohladili na sobno temperaturo in zlili na led. Potekla je hidroliza prebitne kisline, produkt pa se je oboril in smo ga odfiltrirali z odsesavanjem ter takoj uporabili v naslednji stopnji

5-kloro-4-(klorosulfonil)tiofen-2-karboksilna kislina (<u>15</u>)	$M_r=261,09$ g/mol
Izgled	beli kristali
Izkoristek	77 %

4.5 Splošni postopek sinteze spojin 16 in 17

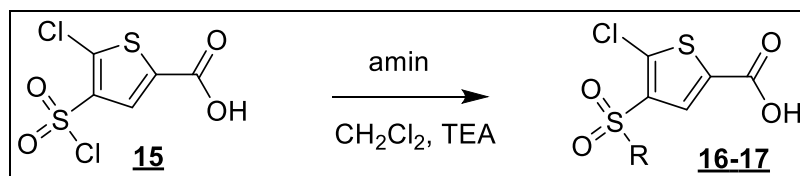
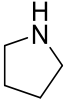
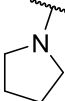
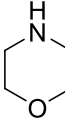
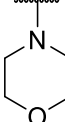


Tabela I: Substituenti na spojinah **16** in **17**

Oznaka spojine	Amin	R
16		
17		

Raztopini spojine **15** (1,0 ekv) v CH_2Cl_2 (10,0 mL) smo dodali trietilamin (2,5 ekv) in zmes ohladili na 0 °C na ledeni kopeli. Nato smo kapljicah dodajali ustrezen sekundarni amin (1,1 ekv) in reakcijsko zmes mešali čez noč na sobni temperaturi.

Naslednji dan smo zmesi dodali 1 M HCl (10,0 mL) in nato vodno fazo ekstrahirali z CH_2Cl_2 ($3 \times 10,0$ mL). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (20,0 mL), posušili z Na_2SO_4 ter topilo odparili pod znižanim tlakom.

4.6. 5-kloro-4-(pirolidin-1-ilsulfonil)tiofen-2-karboksilna kislina (spojina **16**)

5-kloro-4-(pirolidin-1-ilsulfonil)tiofen-2-karboksilna kislina (16)		$M_r=295,75$ g/mol
Izgled	beli kristali	
Izkoristek	51 %	
Retencijski faktor	0,24 (MF: EtOAc/MeOH=3/1)	
Tališče	190-193 °C	
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	$\delta = 1,77-1,80$ (m, 4H, $(\text{CH}_2)_2$), $3,27-3,30$ (m, 2H, NCH_2), $3,36-3,41$ (m, 2H, NCH_2), $7,72$ (s, 1H, Ar-H), $14,07$ (bs, 1H, COOH) ppm	
IR (ν_{max})	2973, 2874, 1686, 1525, 1432, 1395, 1350, 1297, 1167, 1147, 1074, 1033, 1010, 866, 764, 750, 643, 603, 577 cm^{-1}	
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClNO}_4\text{S}_2$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ (m/z): 293,9662	
	Izmerjena vrednost: 293,9661	

4.7 5-kloro-4-(morfolinosulfonil)tiofen-2-karboksilna kislina (spojina **17**)

5-kloro-4-(pirolidin-1-ilsulfonil)tiofen-2-karboksilna kislina (17)		$M_r=311,75$ g/mol
Izgled	bel amorfna snov	
Izkoristek	68 %	
Retencijski faktor	0,26 (MF: EtOAc/MeOH=3/1)	
Tališče	186-188 °C	
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	$\delta = 3.03$ (t, $J=4.7$ Hz, 4H, CH_2NCH_2), 3.65 (t, $J=4.7$ Hz, 4H, CH_2OCH_2), 7.24 (s, 1H, Ar-H) ppm. (1H od COOH je izmenjan)	
IR (ν_{max})	2966, 2855, 2360, 1679, 1531, 1425, 1403, 1356, 1302, 1261, 1173, 1152, 1111, 1073. 1043, 941, 870, 846, 766, 750, 724, 643 cm^{-1}	
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za $\text{C}_9\text{H}_{10}\text{ClNO}_5\text{S}_2[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z): 311,9767	
	Izmerjena vrednost: 311,9770	

4.8 Splošni postopek poskusa sinteze spojine 5-kloro-*N*-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)-4-(pirolidin-1-ilsulfonil)tiofen-2-karboksamida (spojina **18**) in poskusa sinteze spojine 5-kloro-*N*-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)-4-(morfolinosulfonil)tiofen-2-karboksamida (spojina **19**)

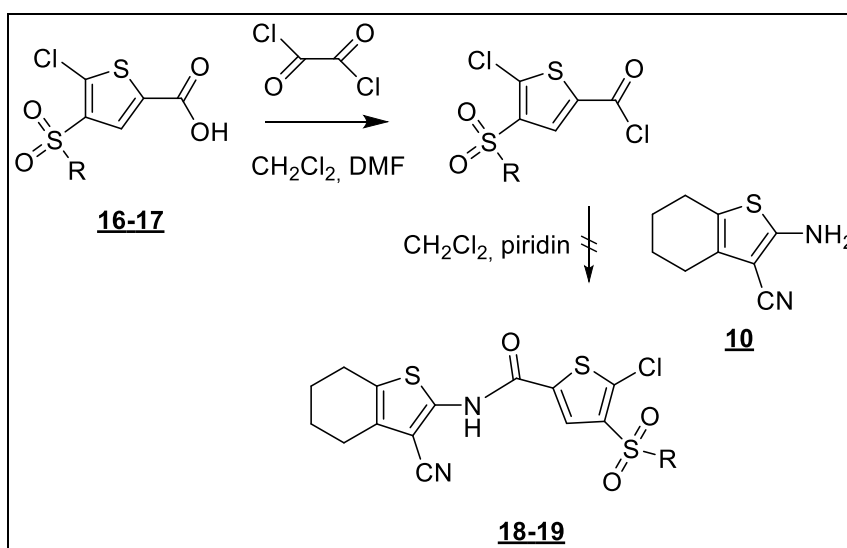
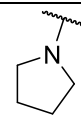
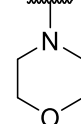


Tabela II: Substituenti na spojinah **18** in **19**

Oznaka spojine	R
18	
19	

Raztopini spojine **16** oz. **17** (1,0 ekv) v brezvodnem CH_2Cl_2 (10,0 mL) smo po kapljicah dodali katalitsko količino DMF in oksalil klorida (9,5 ekv) pod argonovo atmosfero in zmes mešali pol ure pri sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

Ostanek smo raztopili v CH_2Cl_2 (10,0 mL) in po kapljicah dodali zmes spojine **10** (0,9 ekv) in piridina (5,0 ekv) ter mešali čez noč na sobni temperaturi.

Reakcijsko zmes smo sprali z 1 M HCl (10,0 mL), nasičeno raztopino NaHCO_3 (10,0 mL) in nasičeno raztopino NaCl (10,0 mL) ter posušili z Na_2SO_4 . Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

Reakcija ni potekla, verjetno zaradi starosti reagenta oksalil klorida in njegove posledične hidrolize.

4.9. Splošni postopek sinteze spojin **21a-c**

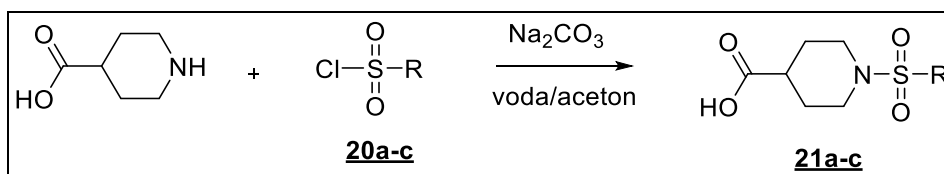


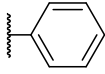


Tabela III: Substituenti na spojinah **20**, **21** in **22**

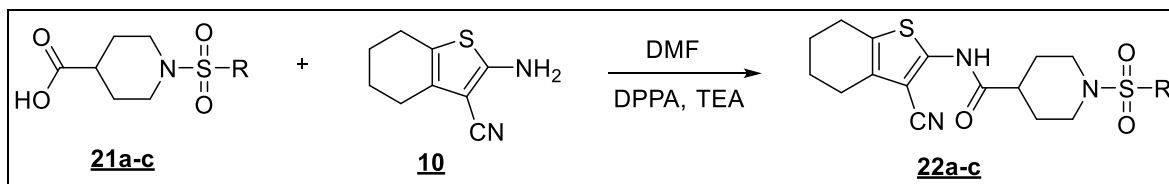
Oznaka spojine (20 , 21 , 22)	R
a	
b	
c	

K raztopini izonipekotinske kisline (1,0 ekv) in Na₂CO₃ (1,0 ekv) v mešanici vode in acetona (50/50 V/V%) smo na ledu po kapljicah dokapavali spojino **20a-c**. Po eni uri mešanja na sobni temperaturi smo odparili topilo in belo-rumen preostanek raztopili v metanolu. Produkt se je raztopil, ostala pa je neraztopljena sol NaCl, ki smo jo odnučirali. Matičnici smo odparili topilo ter preostanek očistili s kolonsko kromatografijo (MF: 5 % MeOH v CH₂Cl₂, 0,3 % očetne kisline).

1-(<i>N,N</i> -dimetilsulfamoil)piperidin-4-karboksilna kislina (21a)		M _r =236,29 g/mol
Izgled	beli kristali	
Izkoristek	24 %	
Retencijski faktor	0,39 (MF: 5 % MeOH v CH ₂ Cl ₂ , 0,3 % očetne kisline)	
Tališče	111 °C	
¹ H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ =1,46-1,56 (m, 2H, CH ₂); 1,83-1,90 (m, 2H, CH ₂); 2,35-2,42 (m, 1H, CH); 2,73 (s, 6H, 2 × CH ₃); 2,84-2,91 (m, 2H, CH ₂ N); 3,46-3,52 (m, 2H, CH ₂ N); 12,33 (bs, 1H, COOH) ppm	
IR (ν _{max})	2882, 1694, 1588, 1447, 1331, 1278, 1252, 1234, 1191, 1141, 1061, 1040, 961, 918, 845, 735, 675, 635 cm ⁻¹	
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₈ H ₁₆ N ₂ O ₄ S [M+H] ⁺ (m/z): 237,0909	
	Izmerjena vrednost: 237,0906	

1-(etilsulfonil)piperidin-4-karboksilna kislina (21b)		$M_r=221,27$ g/mol
Izgled	beli kristali	
Izkoristek	30 %	
Retencijski faktor	0,41 (MF: 5 % MeOH v CH_2Cl_2 , 0,3 % očetne kisline)	
Tališče	128-131 °C	
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	$\delta = 1,18-1,21$ (m, 3H, CH_2CH_3); 1,48-1,58 (m, 2H, CH_2); 1,83-1,90 (m, 2H, CH_2); 2,28-2,36 (m, 1H, CH); 2,84-2,90 (m, 2H, CH_2N); 3,02 (q, 2H, $J=7,4$ Hz, CH_2CH_3); 3,49-3,54 (m, 2H, CH_2N) ppm (1H od COOH je izmenjan)	
IR (ν_{max})	3404, 2946, 1695, 1328, 1305, 1249, 1183, 1142, 1059, 930, 754, 585, 539, 529, 509 cm^{-1}	
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za $\text{C}_8\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S} [\text{M}-\text{H}]^-$ (m/z): 220,0644	
	Izmerjena vrednost: 220,0641	

1-(fenilsulfonil)piperidin-4-karboksilna kislina (21c)		$M_r=269,32$ g/mol
Izgled	beli kristali	
Izkoristek	56 %	
Retencijski faktor	0,44 (MF: 5 % MeOH v CH_2Cl_2 , 0,3 % očetne kisline)	
Tališče	157-159 °C (literatura (37): 159-160 °C)	
^1H NMR (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$)	$\delta = 1,50-1,60$ (m, 2H, CH_2); 1,84-1,90 (m, 2H, CH_2); 2,23-2,31 (m, 1H, CH); 2,39-2,45 (m, 2H, CH_2N); 3,44-3,49 (m, 2H, CH_2N); 7,63-7,68 (m, 2H, $2 \times \text{Ar}-\text{H}$); 7,71-7,76 (m, 3H, $3 \times \text{Ar}-\text{H}$); 12,31 (bs, 1H, COOH) ppm	
IR (ν_{max})	2880, 1700, 1477, 1447, 1417, 1392, 1332, 1310, 1283, 1249, 1231, 1158, 1117, 1092, 1059, 1040, 914, 848, 760, 735, 690, 630 cm^{-1}	
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{S} [\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z): 270,0800	
	Izmerjena vrednost: 270,0798	

4.10 Splošni postopek sinteze spojin **22a-c**

Spojini **21a-c** (1,0 ekv) in **10** (1,1 ekv) smo raztopili v brezvodnem DMF (7,0 mL) pod argonovo atmosfero ter ob mešanju pri 0 °C dodali DPPA (1,1 ekv) in TEA (3,3 ekv). Reakcijsko zmes smo 5 ur mešali na ledeni kopeli, nato pa čez noč na sobni temperaturi. Naslednji dan smo zmes raztopili v etilacetatu (100,0 mL) in organsko fazo spirali z 10 % citrsko kislino (2 × 30,0 mL), vodo (30,0 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 30,0 mL), vodo (30,0 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 × 30,0 mL). Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/heksan=1/2) in prekristalizacijo iz etanola.

<i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahydrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-1-(<i>N,N</i> -dimetilsulfamoil)piperidin-4-karboksamid (22a)		$M_r=396,52$ g/mol
Izgled	beli igličasti kristali	
Izkoristek	33 %	
Retencijski faktor	0,16 (MF: EtOAc/heksan=1/2)	
Tališče	220-221 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 1,54-1,64 (m, 2H, CH ₂); 1,69-1,81 (m, 4H, (CH ₂) ₂); 1,84-1,88 (m, 2H, CH ₂); 2,44-2,50 (m, 2H, CH ₂ N); 2,54-2,60 (m, 2H, CH ₂); 2,75 (s, 6H, 2 × CH ₃) 2,78-2,87 (m, 3H, CH ₂ N in CO-CH); 3,57-3,64 (m, 2H, CH ₂ N); 11,59 (s, 1H, NH) ppm	
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 21,68; 22,57; 23,27; 23,46; 27,90; 37,79; 40,37; 45,38; 92,56; 114,24; 127,15; 130,66; 146,43; 172,55 ppm	
IR (ν_{\max})	3272, 3232, 2930, 2852, 2214, 1701, 1574, 1546, 1444, 1406, 1341, 1305, 1269, 1183, 1183, 1137, 1166, 1113, 1062, 960, 929, 875, 848, 785, 736, 673, 625 cm ⁻¹	

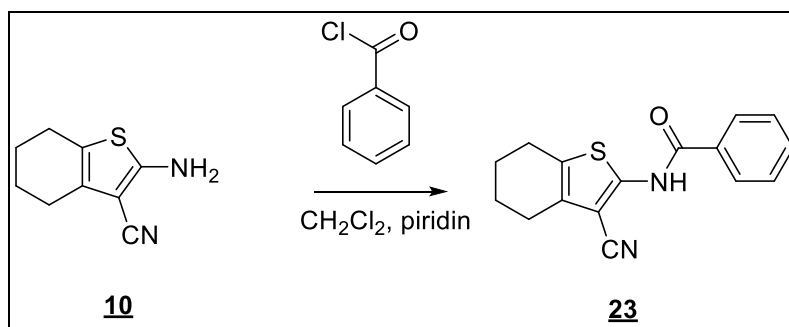
HPLC	$t_R=15,836$ min, 99,17 % ($\lambda=254$ nm), 98,25 % ($\lambda=220$ nm)
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za $C_{16}H_{14}N_2O_2S$ $[M+H]^+$ (m/z): 397,1368
	Izmerjena vrednost: 397,1362

N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-1-(etilsulfonil)piperidin-4-karboksamid (22b)		$M_r=381,51$ g/mol
Izgled	beli kristali	
Izkoristek	9 %	
Retencijski faktor	0,18 (MF: EtOAc/heksan=1/2)	
Tališče	240-242 °C	
1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	$\delta = 1,21$ (t, 3H, $J=7,35$ Hz, $SO_2-CH_2-CH_3$); 1,53-1,63 (m, 2H, CH_2); 1,70-1,79 (m, 4H, $(CH_2)_2$); 1,86-1,90 (m, 2H, CH_2); 2,44-2,50 (m, 2H, CH_2); 2,54-2,60 (m, CH_2); 2,72-2,86 (m, 3H, CO-CH in CH_2N); 3,07 (q, 2H, $J=7,3$ Hz, SO_2-CH_2); 3,62-3,69 (m, 2H, CH_2N); 11,59 (s, 1H, NH) ppm	
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO- d_6)	$\delta = 7,54$; 21,68; 22,57; 23,27; 23,46; 28,06; 40,35; 42,82; 44,57; 92,54; 114,25; 127,15; 130,66; 146,44; 172,52 ppm	
IR (ν_{max})	3273, 2936, 2845, 2223, 2206, 1700, 1572, 1544, 1460, 1406, 1322, 1304, 1281, 1257, 1181, 1165, 1140, 1109, 1064, 1043, 927, 876, 849, 779, 744, 688, 624 cm^{-1}	
HPLC	$t_R=14,852$ min, 99,48 % ($\lambda=254$ nm), 99,7 % ($\lambda=220$ nm)	
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za $C_{16}H_{14}N_2O_2S$ $[M+H]^+$ (m/z): 382,1259	
	Izmerjena vrednost: 382,1249	

N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-1-(fenilsulfonil)piperidin-4-karboksamid (22c)		$M_r=429,55$ g/mol
Izgled	beli kristali	
Izkoristek	15 %	
Retencijski faktor	0,20 (MF: EtOAc/heksan=1/2)	
Tališče	245 °C	

¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 1,54-1,64 (m, 2H, CH ₂); 1,68-1,78 (m, 4H, (CH ₂) ₂); 1,84-1,88 (m, 2H, CH ₂); 2,25-2,31 (m, 2H, CH ₂ N); 2,43-2,47 (m, 2H, CH ₂); 2,52-2,62 (m, 3H, CH ₂ in CO-CH) 3,64-3,69 (m, 2H, CH ₂ N); 7,65-7,69 (m, 2H, 2 × Ar-H); 7,72-7,78 (m, 3H, 3 × Ar-H); 11,43 (s, 1H, NH) ppm
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 21,66; 22,55; 23,25; 23,43; 27,42; 45,28; 92,47; 114,19; 127,14; 127,41; 129,38; 130,63; 133,17; 135,31; 146,35; 172,29 ppm (eden izmed vrhov se prekriva s topilom)
IR (ν _{max})	3302, 2927, 2857, 2212, 1691, 1572, 1542, 1443, 1388, 1326, 1303, 1253, 1181, 1157, 1111, 1092, 1045, 1025, 919, 874, 848, 757, 735, 687, 625cm ⁻¹
HPLC	t _R =17,535 min, 100 % (λ=254 nm), 99,82 % (λ=220 nm)
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ S [M+H] ⁺ (m/z): 430,1259
	Izmerjena vrednost: 430,1263

4.11 Sinteza N-(3-ciano-4,5,6,7- tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)benzamida (spojina **23**)



Spojino **10** (0,20 g, 1,10 mmol) smo raztopili v CH₂Cl₂ (5,0 mL), dodali piridin (0,3 mL, 3,63 mmol) in po kapljicah benzoil klorid (0,1 mL, 1,21 mmol) ter mešali dve uri na sobni temperaturi.

Reakcijski zmesi smo nato dodali CH₂Cl₂ (10,0 mL) in organsko fazo ekstrahirali z 1 M HCl (15,0 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (15,0 mL) in nasičeno raztopino NaCl (15,0

mL) ter jo sušili z Na₂SO₄. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in produkt prečistili s prekristalizacijo iz etanola.

<i>N</i>-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)benzamida (23)		M _r =282,36 g/mol
Izgled	Beli igličasti kristali	
Izkoristek	62 %	
Retencijski faktor	0,84 (MF: EtOAc/heksan=2/1)	
Tališče	177-178 °C (literatura (38): 182 °C)	
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 1,75-1,81 (m, 4H, (CH ₂) ₂); 2,51-2,56 (m, 2H, CH ₂); 2,61-2,66 (m, 2H, CH ₂); 7,55-7,59 (m, 2H, 2 × Ar-H); 7,63-7,67 (m, 1H, Ar-H); 7,94-7,96 (m, 2H, 2 × Ar-H); 11,74 (s, 1H, CO-NH) ppm	
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 21,69; 22,58; 23,44; 23,59; 95,96; 114,19; 128,26; 128,48; 128,63; 131,36; 132,37; 132,49; 146,24; 165,17 ppm	
IR (ν _{max})	3241, 3201, 2081, 2931, 2838, 2221, 1672, 1601, 1575, 1553, 1440, 1403, 1326, 1286, 1266, 1155, 1105, 1074, 1029, 922, 820, 793, 768, 712, 693, 667, 617 cm ⁻¹	
HPLC	t _R =17,239 min, 100,00 % (λ=254 nm), 99,84 % (λ=220 nm)	
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₁₆ H ₁₄ N ₂ OS [M+H] ⁺ (m/z): 283,0905	
	Izmerjena vrednost: 283,0910	

4.12 Splošni postopek sinteze spojin **25a-c**

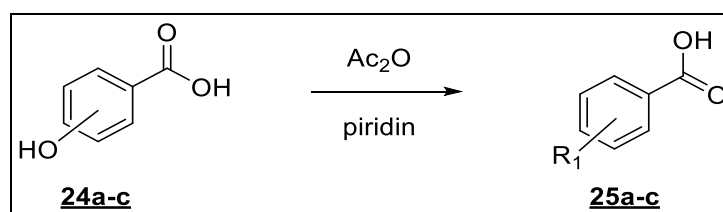


Tabela IV: Substituenti na spojinah **24** in **25**

Oznaka spojine	24	25
a		
b		
c		

Kislino **24a-c** (1,0 ekv) smo raztopili v piridinu (20,0 mL) in med mešanjem dodali acetanhidrid (4,0 ekv). Reakcijsko zmes smo mešali eno uro pri sobni temperaturi in konec reakcije preverili s tankoplastno kromatografijo.

Zmes smo zlili v vodo (100,0 mL) in jo nakisali s koncentrirano HCl do pH 2. Vodno fazo smo ekstrahirali z etilacetatom (3×100,0 mL), združene organske faze pa spirali z nasičeno raztopino NaCl (100,0 mL), posušili z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo sprali z etrom in ga odfiltrirali s presesavanjem.

3-acetoksibenzojska kislina (25a)		M _r =180,16 g/mol
Izgled	beli kristali	
Izkoristek	32 %	
Retencijski faktor	0,40 (MF: 5 % MeOH v CH ₂ Cl ₂ , 0,3 % očetne kisline)	
Tališče	129-130 °C (literatura (39): 130-135 °C)	
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 2,29 (s, 3H, CH ₃); 7,38-7,41 (m, 1H, Ar-H); 7,53-7,57 (m, 1H, Ar-H); 7,66-7,67 (m, 1H, Ar-H); 7,82-7,85 (m, 1H, Ar-H); 13,19 (bs, 1H, COOH) ppm	
IR (ν _{max})	2870, 1757, 1673, 1584, 1450, 1409, 1370, 1270, 1197, 1157, 1100, 1077, 1010, 946, 915, 861, 819, 778, 751, 695, 672, 650 cm ⁻¹	

4-acetoksibenzojska kislina (25b)		$M_r=180,16$ g/mol
Izgled	beli igličasti kristali	
Izkoristek	42 %	
Retencijski faktor	0,40 (MF: 5 % MeOH v CH_2Cl_2 , 0,3 % očetne kisline)	
Tališče	176-179 °C (literatura (40): 185 °C)	
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	$\delta = 2,30$ (s, 3H, CH_3); 7.26 (dd, 2H, $J_1=2.1$ Hz, $J_2=6,8$ Hz, 2 \times Ar-H), 7,99 (dd, 2H, $J_1=2,1$ Hz, $J_2=6,8$ Hz, 2 \times Ar-H), 13,03 (bs, 1H, COOH) ppm	
IR (ν_{max})	2817, 2551, 1751, 1679, 1600, 1507, 1425, 1369, 1315, 1289, 1190, 1162, 1126, 1103, 1046, 1013, 914, 863, 791, 756, 698, 668 cm^{-1}	

3,5-diacetoksibenzojska kislina (25c)		$M_r=238,20$ g/mol
Izgled	beli igličasti kristali	
Izkoristek	22 %	
Retencijski faktor	0,41 (MF: 5 % MeOH v CH_2Cl_2 , 0,3 % očetne kisline)	
Tališče	144-146 °C (literatura (41): 152-153)	
^1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6)	$\delta = 2,29$ (s, 6H, 2 \times CH_3); 7,29 (t, 1H, $J=2,2$ Hz, Ar-H); 7.58 (d, 2H, $J=2.2$ Hz, 2 \times Ar-H), 13,41 (bs, 1H, COOH) ppm	
IR (ν_{max})	1766, 1688, 1602, 1470, 1423, 1368, 1306, 1183, 1123, 1018, 947, 911, 890, 837, 774, 753, 701, 659 cm^{-1}	
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za $\text{C}_{11}\text{H}_{10}\text{O}_6$ $[\text{M}-\text{H}]^-$ (m/z): 237,0399	
	Izmerjena vrednost: 237,0397	

4.13 Splošni postopek sinteze spojin **26a-c**

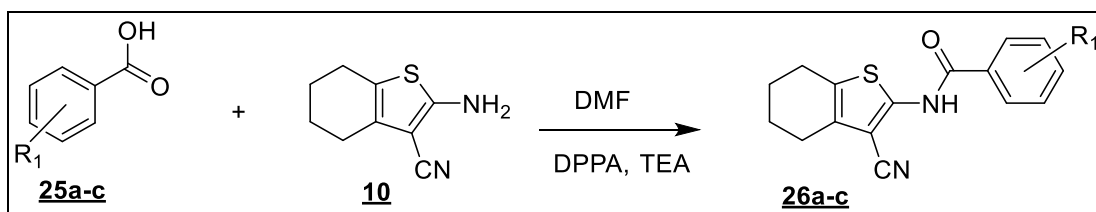


Tabela V: Substituenti na spojinah **26a-c**

Oznaka spojine	26
a	
b	
c	

Spojini **25a-c** (1,0 ekv) in **10** (1,1 ekv) smo pod argonovo atmosfero raztopili v brezvodnem DMF (7,0 mL) in ob mešanju na ledu dodali DPPA (1,1 ekv) in TEA (3,3 ekv). Zmes smo mešali na ledu 5 ur in nato čez noč na sobni temperaturi.

Izolacijo smo izvedli tako, da smo reakcijski zmesi dodali etilacetat (100,0 mL) in organsko fazo spirali z 10 % citronsko kislino (2 × 30,0 mL), vodo (30,0 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 30,0 mL), vodo (30,0 mL) in nasičeno raztopino NaCl (2 × 30,0 mL). Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄ in topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo in prekrizalizirali.

4.13.1 Sinteza 3-((3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)karbamoil)fenil acetata (spojina **26a**)

Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/heksan=1/2) in s prekrizalizacijo iz etanola.

3-((3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)karbamoil)fenil acetat (26a)		M _r =340,40 g/mol
Izgled	bledo rumeni kristali	
Izkoristek	19 %	
Retencijski faktor	0,42 (MF: EtOAc/heksan=1/2)	
Tališče	161-162 °C	

¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 1,76-1,81 (m, 4H, (CH ₂) ₂); 2,32 (s, 3H, CH ₃); 2,52-2,57 (m, 2H, CH ₂); 2,62-2,67 (m, 2H, CH ₂); 7,42-7,45 (m, 1H, Ar-H); 7,62 (t, 1H, <i>J</i> =8,1 Hz, Ar-H); 7,71 (t, 1H, <i>J</i> = 1,9 Hz, Ar-H); 7,84-7,87 (m, 1H, Ar-H); 11,79 (s, 1H, NH) ppm
IR (ν _{max})	3237, 2935, 2214, 1760, 1670, 1572, 1544, 1461, 1399, 1368, 1322, 1289, 1267, 1191, 1144, 1096, 1007, 963, 920, 910, 887, 837, 816, 799, 743, 706, 680, 659, 617 cm ⁻¹
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ S [M+H] ⁺ (m/z): 341,0960
	Izmerjena vrednost: 341,0962

4.13.2 Sinteza 4-((3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)karbamoil)fenil acetata (spojina **26b**)

Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/Hex=1/2) in s prekrizalzacijo iz etanola.

4-((3-ciano-4,5,6,7- tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)karbamoil)fenil acetat (26b)		M _r =340,40 g/mol
Izgled	bledo rumeni igličasti kristali	
Izkoristek	22 %	
Retencijski faktor	0,44 (MF: EtOAc/heksan=1/2)	
Tališče	229-231 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 1,75-1,81 (m, 4H, (CH ₂) ₂); 2,32 (s, 3H, CH ₃); 2,52-2,57 (m, 2H, CH ₂); 2,62-2,67 (m, 2H, CH ₂); 7,34 (dd, 2H, <i>J</i> ₁ =2,1 Hz <i>J</i> ₂ =6,8 Hz, 2× Ar-H), 7,99 (dd, 2H, <i>J</i> ₁ =2,1 Hz <i>J</i> ₂ =6,8 Hz, 2× Ar-H); 11,78 (s, 1H, NH) ppm	
IR (ν _{max})	3265, 2939, 2216, 1760, 1673, 1601, 1572, 1545, 1507, 1458, 1404, 1370, 1325, 1283, 1263, 1190, 1164, 1099, 1011, 907, 860, 826, 755, 708, 633 cm ⁻¹	
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ S [M+H] ⁺ (m/z): 341,0960	
	Izmerjena vrednost: 341,0970	

4.13.3 Sinteza 5-((3-ciano-4,5,6,7- tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)karbamoil)-1,3-fenilen diacetata (spojina **26c**)

Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo-gradientna elucija (MF: EtOAc/Hex=1/4 do 1/3) in s prekristalizacijo iz etanola.

5-((3-ciano-4,5,6,7- tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)karbamoil)-1,3-fenilen diacetat (26c)		$M_r=398,43 \text{ g/mol}$
Izgled	bledo rumeni igličasti kristali	
Izkoristek	13 %	
Retencijski faktor	0,30 (MF: EtOAc/heksan=1/2)	
Tališče	172-174 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	$\delta = 1,75-1,81$ (m, 4H, (CH ₂) ₂), 2,32 (s, 6H, 2 × CH ₃), 2,52-2,57 (m, 2H, CH ₂); 2,62-2,67 (m, 2H, CH ₂); 7.34 (t, 1H, <i>J</i> =2.1Hz, Ar-H); 7,65 (d, 2H, <i>J</i> =2.1 Hz, 2× Ar-H), 11,82 (s, 1H, NH) ppm	
IR (ν_{max})	3338, 2939, 2209, 1763, 1676, 1592, 1567, 1546, 1446, 1371, 1321, 1299, 1258, 1202, 1130, 1019, 986, 914, 876, 847, 796, 747, 698, 653, 626 cm ⁻¹	
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₂₀ H ₁₈ N ₂ O ₅ S [M+H] ⁺ (m/z): 399,1015	
	Izmerjena vrednost: 399,1020	

4.14 Splošni postopek sinteze spojin **27a-c**

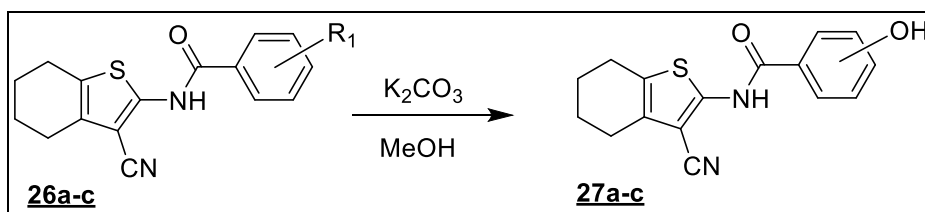
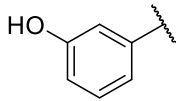
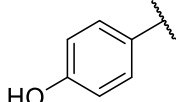
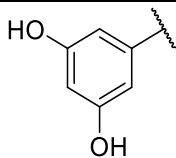


Tabela VI: Substituenti na spojinah **27a-c**

Oznaka spojine	27
a	
b	
c	

Spojino **26a-c** (1,0 ekv) smo suspendirali v metanolu (6,0 mL), dodali K_2CO_3 (3,0 ekv) in mešali eno uro pri sobni temperaturi, po pretečenem času pa topilo odparili pod znižanim tlakom. Surov ostanek smo raztopili v 1 M HCl (50,0 mL). Vodno fazo smo ekstrahirali z etilacetatom ($3 \times 50,0$ mL). Združene organske faze smo sprali z 1 M HCl (30,0 mL) in nasičeno raztopino NaCl (30,0 mL) ter jih sušili z Na_2SO_4 . Topilo smo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s prekrizalizacijo.

4.14.1 Sinteza *N*-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroksibenzamida (spojina **27a**)

Produkt smo očistili s prekrizaliziracijo iz etanola.

<i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-3-hidroksibenzamid (27a)		$M_r=298,36$ g/mol
Izgled	bledo oranžni igličasti kristali	
Izkoristek	70 %	
Retencijski faktor	0,32 (MF: EtOAc/heksan=1/2)	
Tališče	244-246 °C	
1H NMR (400 MHz, DMSO-	$\delta = 1,75-1,81$ (m, 4H, $(CH_2)_2$); 2,52-2,57 (m, 2H, CH_2); 2,62-2,67 (m, 2H, CH_2); 7,01-7,04 (m, 1H, Ar-H); 7,31-7,32 (m, 1H,	

<i>d</i>₆	Ar-H); 7,35-7,37 (m, 2H, 2 × Ar-H); 9,88 (s, 1H, OH); 11,64 (s, 1H, NH) ppm
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 21,69; 22,58; 23,44; 23,58; 95,90; 114,20; 114,87; 118,83; 119,44; 128,56; 129,63; 131,31; 133,70; 146,28; 157,31; 165,13 ppm
IR (ν _{max})	3360, 3230, 2907, 2220, 1657, 1576, 1552, 1491, 1456, 1399, 1326, 1302, 1281, 1255, 1212, 1146, 1077, 1028, 996, 960, 880, 809, 792, 738, 678, 624 cm ⁻¹
HPLC	t _R =14,560 min, 99,76 % (λ=254 nm), 99,53 % (λ=220 nm)
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ S [M+H] ⁺ (m/z): 299,0854
	Izmerjena vrednost: 299,0857

4.14.2 Sinteza *N*-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiefen-2-il)-4-hidroksibenzamida (spojina **27b**)

Produkt smo očistili s prekrizaliziracijo iz etanola.

<i>N</i>-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiefen-2-il)-4-hidroksibenzamid (27b)		M _r =298,36 g/mol
Izgled	bledo rumeni igličasti kristali	
Izkoristek	73 %	
Retencijski faktor	0,31 (MF: EtOAc/heksan=1/2)	
Tališče	254-256 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 1,75-1,81 (m, 4H, (CH ₂) ₂); 2,51-2,56 (m, 2H, CH ₂); 2,61-2,66 (m, 2H, CH ₂); 6,90 (dd, 2H, J ₁ =2,1 Hz, J ₂ =6,8 Hz, 2 × Ar-H); 7,86 (dd, 2H, J=2,0 Hz, J=6,8 Hz, 2 × Ar-H); 10,31 (s, 1H, OH); 11,43 (s, 1H, NH) ppm	
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 21,71; 22,60; 23,41; 23,58; 95,33; 114,35; 115,07; 122,71; 128,22; 130,51; 131,13; 146,76; 161,42; 164,53 ppm	
IR (ν _{max})	3246, 2948, 2216, 1651, 1600, 1575, 1552, 1517, 1461, 1434,	

	1401, 1365, 1325, 1273, 1215, 1167, 1103, 955, 920, 840, 807, 770, 755, 697, 627 cm ⁻¹
HPLC	t _R =14,493 min, 99,71 % (254 nm), 99,71 % (220 nm)
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ S [M+H] ⁺ (m/z): 299,0854
	Izmerjena vrednost: 229,0861

4.14.3 Sinteza *N*-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)-3,5-dihidroksibenzamida (spojina 27c)

Produkt smo očistili s prekristaliziracijo iz mešanice etra in petroletra.

N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-3,5-dihidroksibenzamid (27c)		M _r =314,36 g/mol
Izgled	beli igličasti kristali	
Izkoristek	41 %	
Retencijski faktor	0,16 (MF: EtOAc/heksan=1/2)	
Tališče	254-256 °C	
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 1,75-1,81 (m, 4H, (CH ₂) ₂); 2,51-2,56 (m, 2H, CH ₂); 2,61-2,66 (m, 2H, CH ₂); 6,46 (t, 1H, <i>J</i> =2,2 Hz, Ar-H); 6,78 (d, 2H, <i>J</i> =2,2 Hz, 2 × Ar-H); 9,71 (s, 2H, 2 × OH); 11,54 (s, 1H, NH) ppm	
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆)	δ = 21,70; 22,58; 23,43; 23,58; 95,79; 106,23; 106,34; 114,22; 128,46; 131,24; 134,28; 146,33; 158,41; 165,21 ppm	
IR (ν _{max})	3276, 2937, 2216, 1647, 1600, 1573, 1553, 1468, 1442, 1342, 1283, 1147, 1002, 871, 847, 801, 753, 667, 635 cm ⁻¹	
HPLC	t _R =12,536 min, 97,61 % (λ=254 nm), 96,45 % (λ=220 nm)	
ESI-HRMS	Izračunana vrednost za C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₃ S [M+H] ⁺ (m/z): 315,0803	
	Izmerjena vrednost: 315,0799	

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

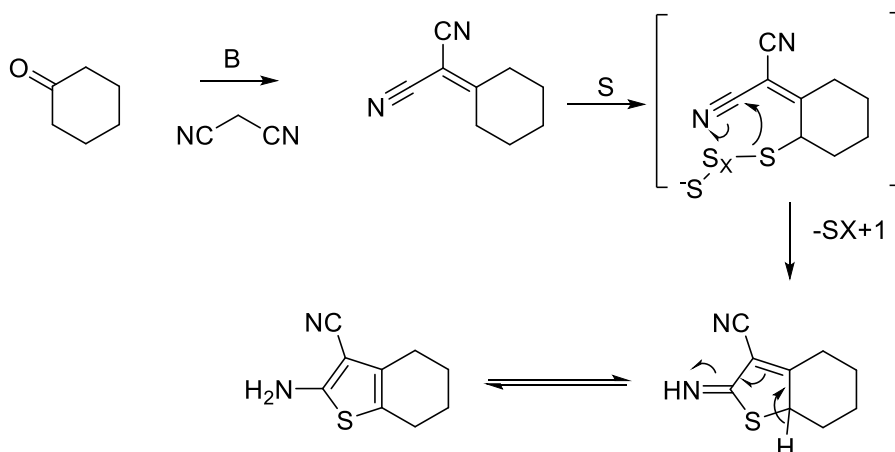
Cianotiofen, ki je bil osnovni skelet za sintezo vseh nadaljnjih spojin, smo sintetizirali po Gewaldovi reakciji (spojina **10**). Klorsulfonske kisline, ki smo jih pripravili s klorsulfoniranjem ali kupili, smo po reakciji z aminom pretvorili do sulfonamidov (spojine **12**, **16**, **17**) in nato sintetizirali amide preko kislinskega klorida, vendar je reakcija potekla le do spojine **14**.

Zaščito hidroksi skupine na spojinah **24a-c** smo uvedli z acetiliranjem, nato pa z uporabo DPPA sintetizirali amide ter na koncu izvedli bazično katalizirano odščito hidroksi skupine, pri kateri ima metanol vlogo topila in nukleofila.

Sulfonamide, ki smo jih pripravili iz izonipekotinske kisline in derivatov sulfonil klorida (spojine **21a-c**), smo sintetizirali ob prisotnosti anorganske baze Na₂CO₃, ki nevtralizira sproščeno HCl. Končne amide (spojine **22a-c**) smo pripravili z uporabo DPPA. Reakcijski mehanizmi so podrobneje opisan v nadaljevanju.

5.1.1 GEWALDOVA SINTEZA SUBSTITUIRANIH TIOFENOV

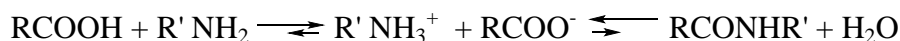
Sinteza osnovnega skeleta (spojina **10**) je potekala po mehanizmu Gewaldove sinteze substituiranih tiofenov. Obstaja nekaj variacij reakcije, ki se razlikujejo v reagentih in pogojih sinteze. Mi smo izvedli enostopenjsko reakcijo, pri kateri sodelujejo α -metilen karbonilna spojina, v našem primeru cikloheksanon, α -aktiviran acetonitril, elementarno žveplo in baza, ponavadi morfolin ali dietilamin (slika 13). Najprej poteče Knoevenaglova kondenzacija med cikloheksanonom in malononitrilom, pri kateri sodeluje baza. Sledi adicija žvepla na nastali α,β -nenasičen nitril. Zadnji korak je ciklizacija, ki poteče kot intramolekularni napad žveplovega aniona na trojno vez ciano skupine. Končni produkt, 2-aminotiofen je v ravnotežju s tautomerno obliko, cikličnim iminom. Mehanizem adicije žvepla in ciklizacije še ni dokončno pojasnjen, domnevno pa ima pri tem pomembno vlogo dodatek baze. (42)



Slika 13: Mehanizem Gewaldove sinteze substituiranih tiofenov (povzeto po 42)

5.1.2 SINTEZA AMIDA PREKO KISLINSKEGA KLORIDA

Pri reakciji nastanka amida iz karboksilne kisline in amina gre v principu za kondenzacijo, saj se odcepi molekula vode. V zmesi kisline in baze se vzpostavi kislinsko-bazno ravnotežje, ki je pomaknjeno v smer nastanka stabilne soli. Zato je potrebno pri sintezi amidne vezi nasprotovati temu ravnotežju, hkrati pa je hidroliza vezi termodinamsko ugodnejša kot sinteza (slika 14).

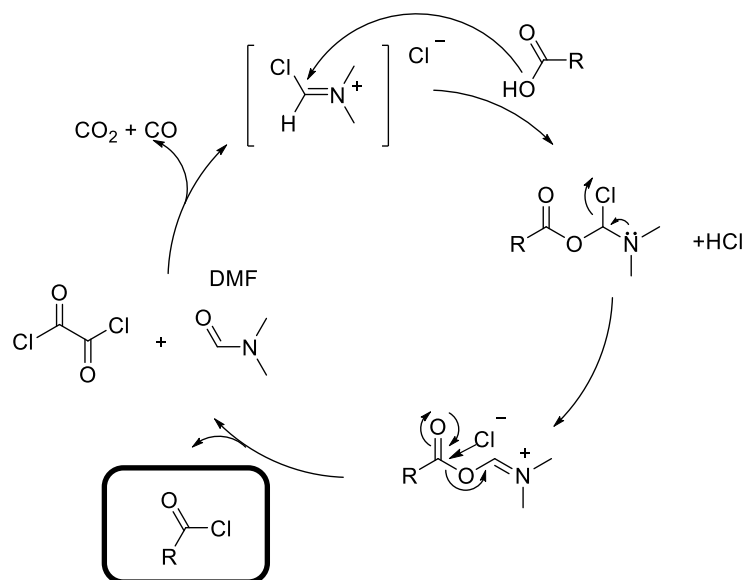


Slika 14: Ravnotežje v zmesi kisline in baze (povzeto po 43)

Direktno kondenzacijo soli lahko dosežemo pri visokih temperaturah (160-180 °C), kar je običajno neprimerna metoda v kombinaciji z ostalimi funkcionalnimi skupinami. Zato je aktivacija kisline in s tem povečanje polariziranosti karbonylne skupine, kar omogoča lažji nukleofilni napad amina, nujna. Pri sintezi spojine **14** smo aktivacijo karboksilne skupine izvedli preko kislinskega klorida. Sinteza je dvostopenjska, v prvi stopnji gre za pretvorbo kisline v kislinski halid, v drugi pa za sklopitev z aminom.

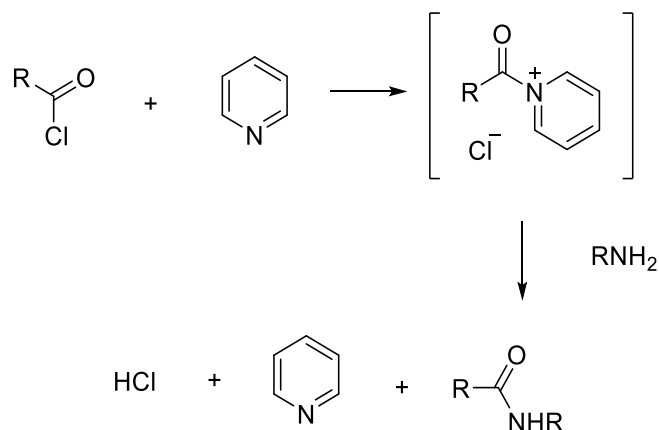
Kislinske kloride lahko pripravimo z različnimi reagenti, uporabili smo oksalil klorid (COCl)₂ v kombinaciji s katalitično količino DMF (slika 15). Najprej DMF in oksalil klorid zreagirata do iminijevega intermediata, pri čemer se sproščata CO in CO₂. Nato karboksilna kislina reagira z ogljikom iminijevega kationa v reakciji nukleofilne substitucije, izstopi klor. Po adiciji kloridnega iona na karbonylno skupino se eliminira DMF in nastane kislinski klorid, oksalil klorid in DMF pa tako nespremenjena zapustita

reakcijo. (43) Delali smo v brezvodnih pogojih pod argonovo atmosfero, da smo preprečili hidrolizo in s tem ohranili reaktivnost oksalil klorida. Kljub temu sinteza spojin **16** in **17** ni potekla do končnega amida, prav tako pa so bili izkoristki reakcij slabi, verjetno zaradi starosti oksalil klorida in posledične hidrolize.

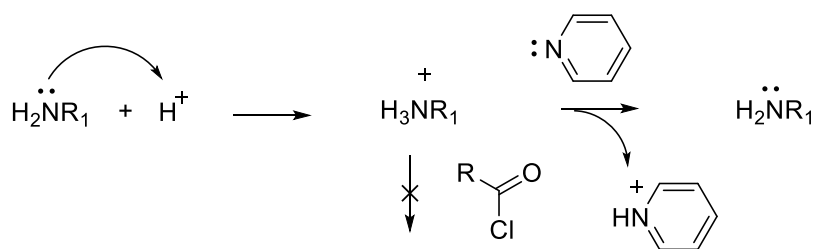


Slika 15: Mehanizem nastanka kislinskega klorida (povzeto po 43)

Reakcija sklopitve kislinskega klorida z aminom je potekala v prisotnosti piridina. Ta ima vlogo baze in katalizatorja. Piridin katalizira reakcijo preko intermedija acilpiridinijevega klorida (slika 16). Pri reakciji nastane HCl, ki tvori sol z nezreagiranim aminom. Na ta način zmanjša njegovo nukleofilnost in reakcijski potencial. Piridin kot baza nevtralizira nastali proton in tako zviša izkoristek reakcije (slika 17). Gre za modificirano Schotten-Baumannovo reakcijo, pri kateri izvorno reagentom v organskem topilu dodajamo vodno raztopino baze. Ta nevtralizira kislino, medtem ko produkti ostanejo v organski fazi. (43, 44) Ekstrakcijo smo izvedli z 1 M HCl, da smo se znebili nezreagiranega amina ter piridina in nasičeno raztopino NaHCO₃, da smo se znebili nezreagirane kisline.



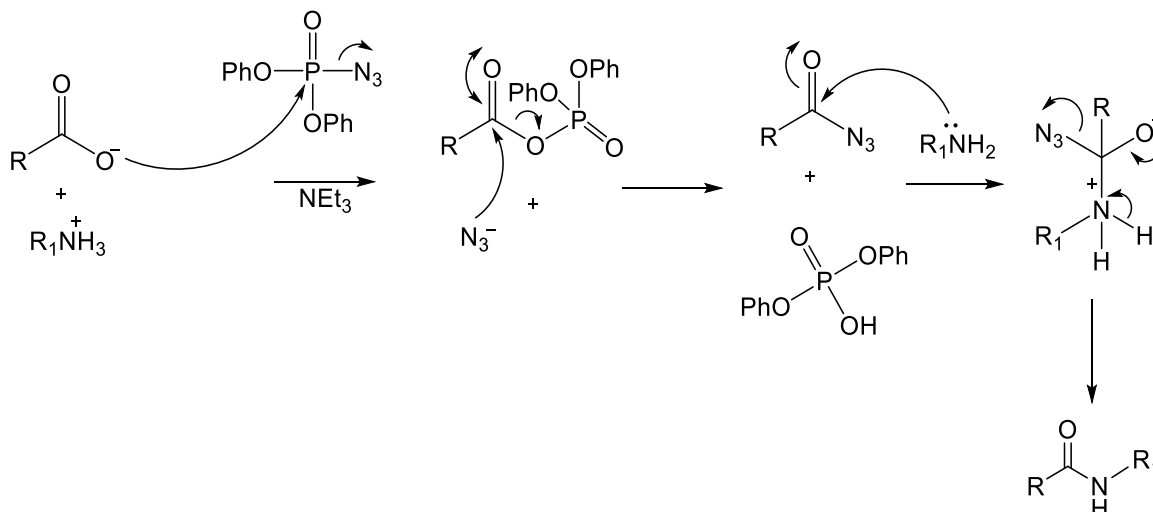
Slika 16: Katalitična vloga piridina pri reakciji kislinskega klorida in amina (povzeto po 43)



Slika 17: Vloga piridina kot baze pri reakciji kislinskega klorida in amina (povzeto po 45)

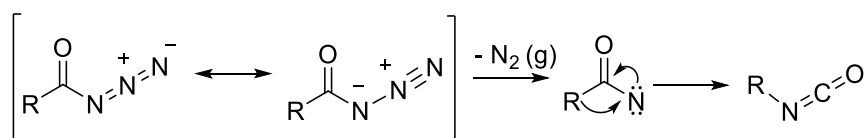
5.1.3 SINTEZA AMIDA PREKO DPPA

Sintezo končnih amidov **27a-c** in **22a-c** smo izvedli po drugem reakcijskem mehanizmu, z reagentom difenilfosforil azidom (DPPA). Reakcija poteka preko nastanka acil azida, gre pa za modificirano, enostopenjsko Curtiusovo reakcijo (slika 18). Reagente smo raztopili v brezvodnem DMF, ki je zaradi svoje polarnosti najprimernejše topilo za ta tip reakcij. Dodatek organske baze, trietilamina, je pomemben za tvorbo karboksilnega iona, ki po mehanizmu nukleofilne substitucije z DPPA tvori intermediat mešan anhidrid, pri tem pa izpade azidni ion. Sledi nukleofilna adicija azidnega iona na intermediat ter eliminacija dobro izstopajočega difenilfosfatnega iona, pri tem pa nastane acil azid. Ta reagira z aminom do amida po reakciji nukleofilne substitucije. (43, 46)



Slika 18: Mehanizem sinteze amida z uporabo DPPA (povzeto po 43)

Pri sintezi so zelo pomembni kontrolirani pogoji. Reakcijsko zmes smo hladili na ledu, saj smo se tako izognili stranski reakciji, Curtiusovi premestitvi, pri kateri nastane izocianat (slika 19).



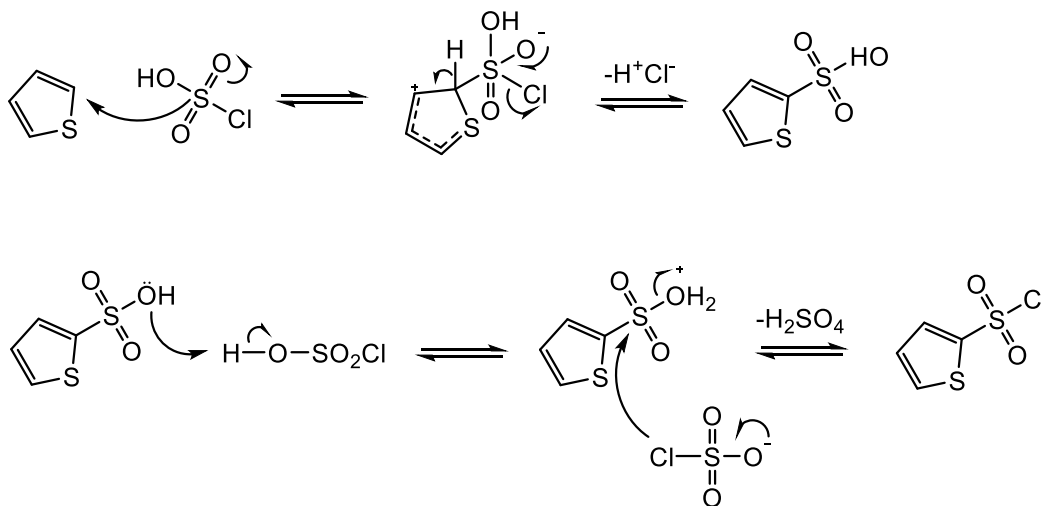
Slika 19: Mehanizem Curtiusove premestitve (povzeto po 43)

Sinteza je potekala v brezvodnih pogojih pod argonovo atmosfero, saj bi v nasprotnem primeru voda kot nukleofil zamenjala azidni ion na DPPA-ju in reagent bi izgubil svojo reaktivnost.

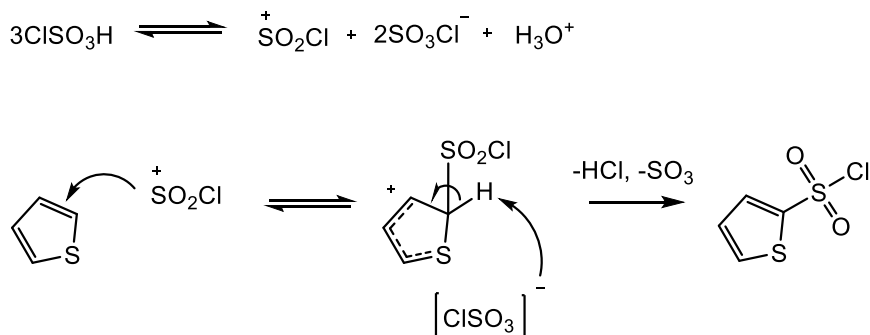
5.1.4 KLORSULFONIRANJE

Klorsulfoniranje tiofenskega obroča, ki smo ga izvedli pri sintezi spojine **15**, poteka po mehanizmu elektrofilne aromatske substitucije. Elektrofil napade aromatski obroč, nastane intermediat kation z delokaliziranim nabojem in nearomatskimi značilnostmi, v končnem koraku pa se odcepi proton in aromatski obroč se regenerira. Predpostavljena sta dva mehanizma reakcije. Pri prvem kot elektrofil nastopa klorsulfonska kislina (slika 20), pri drugem, ki poteka le ob najmanj trikratnem prebitku klorsulfonske kisline, pa je elektrofil SO_2Cl^+ (slika 21). (47) Kisline moramo med reakcijo zaščititi pred atmosfersko vlago z uporabo klorkalcijeve cevke, v nasprotnem primeru bi prišlo do hidrolize. Za zagotovitev

optimalnih reakcijskih pogojev smo uporabili štirikratni prebitek klorsulfonske kisline in zmes segrevali pri 140 °C. Oba radikala, klor in karboksilna skupina, ki sta pripeta na tiofenski obroč, namreč deaktivirata aromatski sistem in tako zmanjšata hitrost reakcije. (48) Gre za ravnotežno reakcijo, zato s prebitno kislino pomaknemo ravnotežje v smer nastanka produktov. Po koncu reakcije smo zmes zlili na led in tako je potekla hidroliza prebitne kisline do HCl in H₂SO₄, sproščena toplota pa se je porabila za taljenje ledu.



Slika 20: Mehanizem klorsulfoniranja, pri katerem kot elektrofil nastopa klorsulfonska kislina (povzeto po 47)



Slika 21: Mehanizem klorsulfoniranja, pri katerem kot elektrofil nastopa SO_2Cl^+ (povzeto po 47)

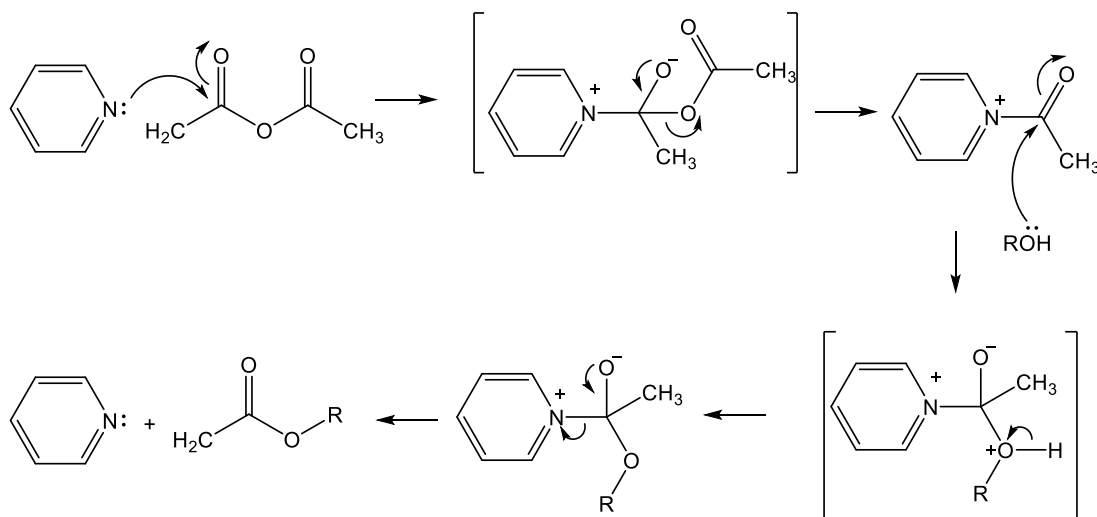
5.1.5 SINTEZA SULFONAMIDA

Sinteza sulfonamidov **12**, **16**, **17** in **21a-c** poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije. Aminska skupina je nukleofil, ki napade žveplov atom, čigar elektrofilnost je še dodatno povečana zaradi negativnega induktivnega efekta klora. (47, 49) Pri reakciji se sprošča HCl, ki smo ga nevtralizirali z dodatkom organske baze trietilamina (spojine **12**, **16**, **17**) ali

anorganske baze Na_2CO_3 (spojine **21a-c**). Na ta način smo preprečili protoniranje amina, ki bi s tem izgubil nukleofilne lastnosti. Reakcijske zmesi, pri katerih smo za nevtralizacijo uporabili trietilamin smo nakisali z 1 M HCl, tako je po ekstrakciji v vodni fazi ostal nezreagirani amin ter organska baza, produkt pa je prešel v organsko fazo. Pri spojinah, kjer smo uporabili Na_2CO_3 pa smo odparili topilo in preostanek raztopili v metanolu. Produkt je bil topen, sol NaCl, ki je nastala pri nevtralizaciji, pa netopna.

5.1.6 ACETILIRANJE HIDROKSI SKUPINE

Hidroksi skupino pri spojinah **24a-c** smo zaščitili z acetiliranjem, saj ima nukleofilne lastnosti in bi v kasnejših reakcijah lahko nastopala kot konkurenčni nukleofil amski skupini. Reakcija je katalizirana s piridinom (slika 22). Ta kot nukleofil napade karbonylni ogljik acetanhidrida, nastane nestabilen tetraedrični intermediat. Po odcepitvi acetatnega iona nastane acetilpiridinijev ion, kjer je elektrofilnost karbonylnega ogljika večja in tako je omogočen lažji nukleofilni napad hidroksi skupine. Piridin zapusti reakcijo nespremenjen. (50) Po zaključku reakcije smo zmes zlili v vodo in jo nakisali s HCl ter vodno fazo ekstrahirali z organskim topilom, v katerega je prešel končni produkt, piridin pa je ostal v vodni fazi. Produkt smo sprali z etrom in se tako znebili očetne kisline.

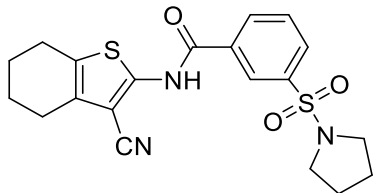
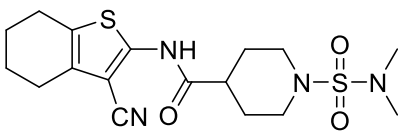
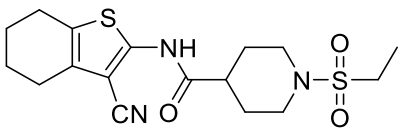
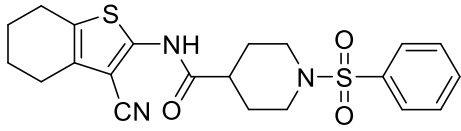
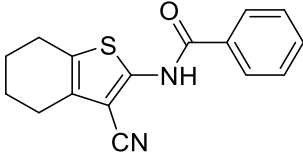
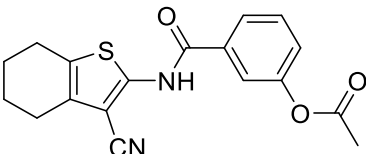


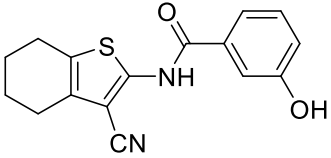
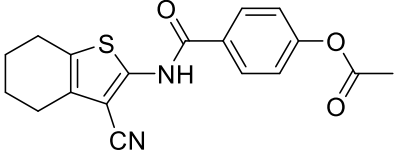
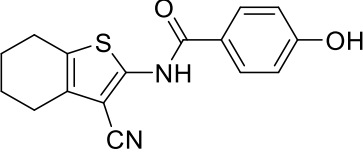
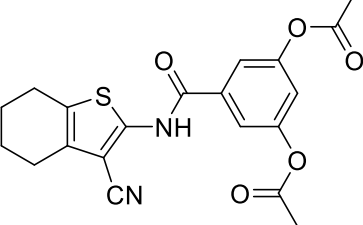
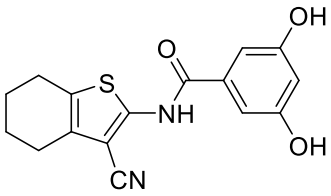
Slika 22: Mehanizem acetiliranja hidroksi skupine s katalizatorjem piridinom (povzeto po 50)

5.2 REZULTATI FARMAKOLOŠKEGA TESTIRANJA

Zaviralno aktivnost sintetiziranih spojin smo vrednotili na osnovi farmakološkega testa z barvilom malahitno zeleno na izoliranih encimih MurA in MurF iz *S. pneumoniae* (SP) in *E. coli* (EC). Rezultati so podani kot rezidualna aktivnost (RA) encima. To je razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti zaviralca in aktivnostjo encima kontrolne meritve brez zaviralca. Spojinam smo določili tudi protibakterijsko delovanje na sevih *S. aureus* in MRSA. Pri določanju vrednosti je možna 10% napaka.

Tabela VII: Rezultati farmakološkega testiranja

	Strukturna formula	RA (%) pri 100 μ M		
		MurA	MurF SP	MurF EC
<u>14</u>		30	98	/
<u>22a</u>		77	99	/
<u>22b</u>		67	101	/
<u>22c</u>		33	106	/
<u>23</u>		32	95	101
<u>26a</u>		61	/	/

<u>27a</u>		2	/	/
<u>26b</u>		38	/	/
<u>27b</u>		22	101	108
<u>26c</u>		45	/	/
<u>27c</u>		44	93	94

Protibakterijsko delovanje je izkazovala samo spojina **27c** na sevu *S. aureus* z MIK 32 $\mu\text{g/ml}$ in na sevu MRSA z MIK 64 $\mu\text{g/ml}$, MBK je bila v obeh primerih večja kot 128 $\mu\text{g/ml}$. Ostale spojine niso izkazovale protibakterijskega delovanja, saj so imele MIK večji kot 128 $\mu\text{g/ml}$. To je arbitrarno določena meja za vrednotenje protibakterijskega delovanja.

5.2.3 KOMENTAR FARMAKOLOŠKEGA TESTIRANJA

Iz RA vrednosti vidimo, da nobena izmed sintetiziranih spojin ni izkazovala aktivnosti na encimu MurF, čeprav vse spojine vsebujejo skelet, esencialen za zaviralno aktivnost. Možen vzrok je odsoten klor pri osrednjem aromatu na *orto* poziciji od amidne vezi in prekratek substituent na benzenu pri spojinah **26-27**, ki verjetno ne more tvoriti dovolj interakcij v vezavnem mestu.

Rezultati na encimu MurA kažejo, da povečan nepolaren fragment za sulfonamidnim delom pri spojinah **22a-c** ojača zaviranje encima. Tako najmočnejše zaviralno delovanje doseže spojina s fenilnim, najšibkejša pa spojina z dimetilaminskim substituentom. Primerjava končnih spojin **27** z njihovo predstopnjo **26** razkrije, da spojine s hidroksi skupino močnejše zavirajo encim v primerjavi z acetilirano skupino. Pri spojinah s hidroksi skupino najmočnejše zaviranje izkazuje substituent na *meta* mestu, sledita *para* in *meta* disubstituiran derivat, pri zaščitenih spojinah pa je najbolj ugoden substituent na *para* mestu, sledita pa disubstituiran derivat na obeh *meta* mestih in monosubstituiran *meta* derivat. Tudi spojina **23** brez substituentov zavira delovanje encima. Spojino **14** lahko primerjamo s 4-bromo derivatom (spojina **8**) iz knjižnice spojin Fakultete za farmacijo in ugotovimo, da ima spojina **14** večjo RA vrednost, iz česar lahko sklepamo, da brom ojača zaviranje.

Protibakterijsko delovanje je izkazovala samo spojina **27c**, ne moremo pa potrditi, da je to posledica zaviranja encima MurA. Možno je, da smo izboljšali fizikalno-kemijske lastnosti spojine, ki so ji omogočili vstop v bakterijo, predvsem polarnost molekule. Protibakterijske učinkovine so namreč izjema glede pravil Lipinskega, saj morajo učinkovine preiti v bakterijske celice, ki se po zgradbi razlikujejo od človeških. Tako je polarnost pri teh učinkovinah lahko povečana, predvsem če so tarča G- bakterije, prav tako molska masa, predvsem če so tarča G+ bakterije, vendar ne sme biti večja kot 600 g/mol. (51)

Pri farmakološkem testiranju zaradi težav z aktivnostjo encima nismo mogli določiti IC₅₀ vrednosti, ki bi podale natančnejši vpogled v zaviralno aktivnost spojin, zato bi jih bilo potrebno določiti v prihodnjih raziskavah. Prav tako bi bilo potrebno določiti tipe interakcij med amidi 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-karbonitrila in encimom MurA, na primer s kokristalizacijo spojine in encima, kar bi postavilo smernice za nadaljnje načrtovanje teh zaviralcev.

6. ZAKLJUČEK

V magistrski nalogi smo sintetizirali nove amide 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-karbonitrila s potencialnim zaviralnim delovanjem na encima MurA in MurF. Glede na namen dela lahko zaključimo:

1. Razvili smo sintezni postopek, resintetizirali spojino **7** ter njen etilni fragment nadomestili s fenilnim in dimetilaminskim. Pripravili smo derivat spojine **8** brez halogenov. Sinteza končnih spojin **18** in **19** s piperidinskim in morfolinskim fragmentom nam ni uspela.

2. Postavili smo postopek za sintezo potencialnih zaviralcev MurF, ki vsebujejo skelet, esencialen za zaviralno aktivnost, in spreminjali pozicijo hidroksi skupine na benzenu. Uspeli smo pripraviti monosubstituirana *orto* in *para* derivata, disubstituiran *meta* derivat ter spojino brez hidroksi skupine (spojine **27a-c** in **23**).

3. S farmakološkim testiranjem smo ovrednotili zaviralno aktivnost sintetiziranih spojin. Nobena izmed spojin ni zavirala encima MurF, so se pa spojine izkazale za zaviralce encima MurA. Rezultati kažejo, da povečan nepolaren fragment za sulfonamidnim delom pri spojinah **22a-c** ojača zaviranje encima, prav tako pa končne spojine s hidroksi skupino **27a-c** zavirajo encim močnejše kot acetilirani derivati. Spojina **27c** je izkazovala protibakterijsko delovanje na sevu *S. aureus* z MIK 32 µg/ml in na sevu MRSA z MIK 64 µg/ml, ne moremo pa potrditi, da je to posledica zaviranja encima MurA. Možno je, da smo izboljšali fizikalno-kemijske lastnosti spojine (predvsem polarnost molekule), ki so ji omogočile vstop v bakterijo.

Amidi 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-karbonitrila imajo potencial kot zaviralci encima MurA. V nadaljnjih raziskavah bi bilo potrebno določiti IC₅₀ vrednosti, ki bi podale natančnejši vpogled v zaviralno aktivnost spojin. Prav tako bi bilo potrebno določiti interakcije med zaviralci in encimom MurA, na primer s kokristalizacijo spojine in encima, kar bi usmerilo njihovo nadaljnje načrtovanje in optimizacijo.

7. LITERATURA

- (1) Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito WS: FOYE'S Principles of Medicinal Chemistry. 5th Edition, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2002: 819-866.
- (2) Chopra I: The 2012 Garrod Lecture: Discovery of antibacterial drugs in 21st century. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2013; 68 (3): 496-505.
- (3) Alanis AJ: Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research* 2005; 36 (6): 697-705.
- (4) Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G: Rang and Dale's Pharmacology. 7th Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2007: 609-637.
- (5) Andrews JM: Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2001; 48: Suppl. S1, 5-16.
- (6) Black JG: Microbiology: principles and explorations. 5th Edition, John Wiley & Sons, New York, 2002: 73-89, 336-366.
- (7) Davies J, Davies D: Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2010; 74 (3): 417-433.
- (8) Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DP: Brock biology of microorganisms. 12th Edition, Pearson Benjamin Cummings, San Francisco, 2009: 70-86, 780-810.
- (9) Alekshun MN, Levy SB: Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell press* 2007; 128 (6): 1037-1050.
- (10) Kayser FH: Medical microbiology. Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York, 2005: 152-159.
- (11) Brown S, Santa Maria Jr. JP & Walker S: Wall teichoic acids of gram-positive bacteria. *Annual review of microbiology*; 67: 313-336.
- (12) Barretau H, Kovač a, Boniface A, Sova M, Gobec S & Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 2008; 32 (2): 168-207.
- (13) Kouidmi I, Levesque RC & Paradis-Bleau C: The biology of Mur ligases as an antibacterial target. *Molecular Microbiology* 2014; 94 (2): 242-253.
- (14) Bouhss A, Trunkfield AE, Bugg TD, Mengin-Lecreulx D: The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiology Reviews* 2008. 32 (2): 208-233.
- (15) Smith CA: Structure, Function and Dynamics in the mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases. *Journal of Molecular Biology* 2006; 362, 640-655.

- (16) Kouidmi I, Levesque RC, Paradis-Bleau C: The biology of Mur ligases as an antibacterial target. *Molecular Microbiology* 2014; 94(2): 242-253.
- (17) El Zoeiby A, Sanschagrín F, Levesque R: Structure and function of the mur enzymes: development of novel inhibitors. *Molecular Microbiology* 2003; 47(1), 1-12.
- (18) Yan A, Munshi S, Leiting B, Anderson MS, Chrzas J, Chen Z: Crystal structure of *Escherichia coli* UDPMurNAc-tripeptide D-alanyl-D-alanine-adding Enzyme (MurF) at 2.3 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* 2000; 304: 435-445.
- (19) Skarzynski T, Mistry A, Wonacott A, Hutchinson SE, Kelly VA, Duncan K: Structure of UDP-*N*-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase, an enzyme essential for the synthesis of bacterial peptidoglycan, complexed with substrate UDP-*N*-acetylglucosamine and the drug fosfomycin. *Structure* 1996; 4(12): 1465-1474.
- (20) Hrast M, Sosič I, Šink R & Gobec S: Inhibitors of peptidoglycan biosynthesis enzymes MurA-F. *Bioorganic Chemistry* 2014; 55: 2-15.
- (21) Longenecker KL, Stamper GF, Hajduk PJ, Fry EH, Jakob CG, Harlan JE, Edalji R, Bartley DM, Walter KA, Solomon LR, Holzman TF, Gu YG, Lerner CG, Beutel BA, Stoll VS: Structure of MurF from *Streptococcus pneumoniae* co-crystallized with a small molecule inhibitor exhibits interdomain closure. *Protein science* 2005; 14: 3039-47.
- (22) Gu YG, Florjancic AS, Clark RF, Zhang T, Cooper CS, Anderson DD, Lerner CG, McCall JO, Cai Y, Black-Schaefer CL, Stamper GF, Hajduk PJ, Beutel BA: Structure-activity relationships of novel potent MurF inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2004; 14: 267-270.
- (23) Hrast M, Turk S, Sosič I, Knez D, Randall CP, Barretau H, Contreras-Martel C, Dessen A, O'Neill AJ, Mengin-Lecreux D, Blanot D, Gobe S: Structure-activity relationships of new cyanothiophene inhibitors of the essential peptidoglycan biosynthesis enzyme MurF. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 66: 32-45.
- (24) Hrast M, Anderluh M, Knez D, Randall CP, Barreteau H, O'Neill AJ, Blanot D, Gobec S: Design, synthesis and evaluation of second generation MurF inhibitors based on cyanothiophene scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 73: 83-96.
- (25) Jiang H-L, Wu D-L, Shen X, Zhu W-L, Kong D-X: Comparison of three 3D-QSAR methods using a novel class of MURF inhibitors. *Journal of Theoretical and Computational Chemistry* 2007; 6: 63-80.
- (26) Turk S, Kovač A, Boniface A, Bostock JM, Chopra I, Blanot D, Gobec S: Discovery of new inhibitors of the bacterial peptidoglycan biosynthesis enzymes MurD and MurF by

structure-based virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009; 17: 1884-1889.

(27) Sosič I, Štefane B, 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 .

(28) Turk S, Hrast M, Sosič I, Barreateau H, Mengin-Lecreulx 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 Chimica Slovenica* 2013; 60: 294-299..

(29) Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Klinger A, Foleno BD, Turchi I, Macielag M, Bush K: A MurF inhibitor that disrupts cell wall biosynthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; 51: 4420-4426.

(30) Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Foleno BD, Simon LD, Guillemont J, Macielag M, Bush K: MurF Inhibitors with antibacterial activity: effect on muropeptide levels. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53: 3240-3247.

(31) Bachelier A, Mayer R & Klein CD: Sesquiterpene lactones are potent and irreversible inhibitors of the antibacterial target enzyme MurA. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2006; 16: 5605-5609.

(32) Steinbach A, Scheidig AJ & Klein CD: The unusual binding mode of nicin to the antibacterial target enzyme MurA revealed by X-ray crystallography. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008;51:5143-5147 .

(33) Dunsmore CJ, Miller K, Blake KL, Patching SG, Henderson PJF, Garnett JA, Stubbings WJ, Philips SEV, Palestrant DJ, Angeles JDL, Leeds JA, Chopra I, Fishwick CWG: 2-Aminotetralones: Novel inhibitors of MurA and MurZ. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2008; 18: 1730-1734.

(34) Miller K, Dunsmore CJ, Leeds JA, Patching SG, Sachdeva M, Blake KL, Stubbings WJ, Simmons KJ, Henderson PJF, De Los Angeles J, Fishwick CWG, Chopra I: Benzothioxalone derivatives as novel inhibitors of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase (MurA and MurZ). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2010; 65: 2566-2573.

(35) Mesec U: Diplomaska naloga, Iskanje novih potencialnih zaviralcev N-acetilglukozamin enolpiruvil transferaze z rešetanjem knjižnice spojin fakultete za farmacijo, Ljubljana, 2014.

- (36) Mojtahedi, Mohammad M: *Synthetic Communications* 2010; 40(14): 2067-2074 CAPLUS.
- (37) Skinner, Glenn S: *Journal of the American Chemical Society* 1955; 77: 2248-2250 CAPLUS.
- (38) Nielsen, Knud Erik: *Chemica Scripta* 1981; 18(5): 245-247 CAPLUS.
- (39) Zhang, Ben-Shang: *Organometallics* 2010; 29(11): 2579-2587 CAPLUS.
- (40) King F E: *Journal of the Chemical Society* 1953; 3693-3697 CAPLUS.
- (41) Lesser, Rudolf: *Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft [Abteilung] B: Abhandlungen* 1926; 59B: 233-236 CAPLUS.
- (42) Puterova Z, Krutošikova A, Vegh D: *Gewald reaction: synthesis, properties and applications of substituted 2-aminothiophenes*. *ARKIVOC* 2010; 1: 209-246.
- (43) Montalbetti CAGN, Falque V: *Amide bond formation and peptide coupling*. *Tetrahedron* 2005; 61: 10827-10852.
- (44) Schotten-Baumann Reaction. *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents* 2010; 573: 2536–2539.
- (45) Organic chemistry portal: Schotten-Baumann reaction, <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/schotten-baumann-reaction.shtm> (29.09.2015, 18:05).
- (46) Shioiri T: *Diphenyl Phosphorazidate (DPPA) - More Than Three Decades Later*. *TCI MAIL* 2007; 134: 2-19.
- (47) Anderluh M, Mravljak J, Perdih A, Sova M, Pečar S: *Farmacevtska kemija III Vaje in seminarji*. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2010: 26-32.
- (48) Tišler M: *Organska kemija, tretja izdaja*. Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1991: 100-110.
- (49) Vollhardt P, Schore N: *Organic chemistry: structure and function*. 6th Edition, W. H. Freeman and Company, New York, 2011: 926-928.
- (50) University of Liverpool, ChemTube 3D: *Pyridine, nucleophilic catalyst*, <http://www.chemtube3d.com/Pyridine%20-%20Nucleophilic%20Catalyst.html> (05. 10. 2015, 17:30).
- (51) O'Shea R, Moser HE: *Physiochemical Properties of Antibacterial Compound: Implications for Drug Discovery*. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008; 51 (10): 2871-2878.