

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MELANIJA BUMBAKOVIĆ

**SINTEZA TRIPTAMINSKIH ZAVIRALCEV BAKTERIJSKE
GLIKOZILTRANSFERAZE S POTENCIJALNIM PROTMIKROBNIM
DELOVANJEM**

**SYNTHESIS OF TRYPTAMINE INHIBITORS OF BACTERIAL
GLYCOSILTRANSFERASE WITH POTENTIAL ANTIBACTERIAL
ACTIVITY**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2011

DIPLOMSKA NALOGA: Melania Bumbaković

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Marka Anderluha, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo in Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Zahvala

Ob tej priložnosti bi se rada zahvalila mentorju doc. dr. Marku Anderluhu, mag. farm. za vso posredovano znanje, dobre misli ter vso pomoč pri izdelavi diplomskega dela. Zahvala gre tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko kemijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri izvedbi diplomske naloge, še posebej pa gospe Damjani Zalar, ki mi je s svojimi nasveti in dobro voljo popestrila dni v laboratoriju.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogu izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Marka Anderluha, mag. farm.

Ljubljana, 2011

Melania Bumbaković

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

Član diplomske komisije: doc. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Član diplomske komisije: doc. dr. Damjan Janeš, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1. UVOD	1
1.1 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE.....	1
1.2 REZISTENCA NA PROTIMIKROBNE UČINKOVINE.....	1
1.3 BAKTERIJSKA CELIČNA STENA.....	2
1.3.1 <i>G+ bakterije</i>	5
1.3.2 <i>G-bakterije</i>	5
1.3.3 <i>Biosinteza peptidoglikana</i>	6
1.4 PBP- »PENICILLIN BINDING PROTEINS«	9
1.5 GLIKOZILTRANSFERAZA IN TRANSPEPTIDAZA- ENCIMA V ZADNJI STOPNJI BIOSINTEZE PEPTIDOGLIKANA.....	10
1.6 GLIKOZILTRANSFERAZA KOT TARČA POTENCIALNIH INHIBITORJEV	12
1.6.1 <i>Naravni inhibitorji glikoziltransferaz</i>	13
1.6.2 <i>Sintezni inhibitorji glikoziltransferaz</i>	15
2. NAČRT DELA.....	19
3. MATERIALI IN METODE	22
4. EKSPERIMENTALNO DELO.....	23
4.1 REAKCIJSKE SHEME	23
4.1.1 <i>Alkiliranje (indolnega dušika) triptamina z različno substituiranimi benzilbromidi</i>	23
4.1.2 <i>Odščita ftalimidne zaščite s hidrazinolizo</i>	23
4.1.3 <i>Sinteza različno substituiranih gvanidinov (nukleofilna substitucija med N,N'-di(tercbutoksikarbonil)-S-metilizotiosečnino in triptaminom)</i>	24
4.1.4 <i>Odščita Boc zaščite z acidolizo</i>	24
4.2. SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ	25
4.2.1 Sinteza 2-(2-(1-(3,4-diklorobenzil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)ethyl)izoindolin-1,3-diona (1)	25
4.2.2 Sinteza 2-(1-(3,4-diklorobenzil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)etanamina (2)	26
4.2.3 Sinteza <i>terc</i> -butil (1-((2-(1-(3,4-diklorobenzil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)ethyl)amino)ethyliden)karbamata (3)	28
4.2.4 Sinteza 1-(2-(1-(3,4-diklorobenzil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)ethyl)gvanidina (4).....	29

4.2.5 Sinteza 3-((3-(2-(1,3-dioksoizoindolin-2-il)etil)-1 <i>H</i> -indol-1-il)metil)benzonitrila (5)	30
4.2.6 Sinteza 3-((3-(2-aminoetil)-1 <i>H</i> -indol-1-il)metil)benzonitrila (6).....	32
4.2.7 Sinteza <i>terc</i> -butil (1-((2-(1-(3-cianobenzil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)etil)amino)etiliden)karbamata (7)	33
4.2.8 Sinteza 1-(2-(1-(3-cianobenzil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)etil)gvanidina (8)	35
4.2.9 Sinteza 2-(2-(1-(4-fluorobenzil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)etil)izoindolin-1,3-diona (9)	36
4.2.10 Sinteza 2-(1-(4-fluorobenzil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)etanamina (10).....	37
4.2.11 Sinteza <i>terc</i> -butil (1-((2-(1-(4-fluorobenzil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)etil)amino)etiliden)karbamata (11)	39
4.2.12 Sinteza 1-(2-(1-(4-fluorobenzil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)etil)gvanidina (12)	40
4.2.13 Sinteza 2-(2-(1-(3,4-difluorobenzil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)etil)izoindolin-1,3-diona (13)	41
4.2.14 Sinteza 2-(1-(3,4-difluorobenzil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)etanamina (14).....	42
4.2.15 Sinteza <i>terc</i> -butil (1-((2-(1-(3,4-difluorobenzil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)etil)amino)etilliden)karbamata (15)	44
4.2.16 Sinteza 1-(2-(1-(3,4-difluorobenzil)-1 <i>H</i> -indol-3-il)etil)gvanidina (16)	45
5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....	47
5.1 SINTEZNI POSTOPKI.....	47
5.2 BIOLOŠKO TESTIRANJE.....	51
5.2.1 <i>Testiranje citotoksičnosti</i>	51
6. SKLEP	56
7. LITERATURA	58

KAZALO SLIK

Slika 1: Shematska zgradba bakterijske celice in morfološke značilnosti bakterij	3
Slika 2: Osnovna zgradba peptidoglikana	3
Slika 3: Prečno premreženje peptidoglikana v <i>S. Aureus</i>	4
Slika 4: Prečno premreženje peptidoglikana v <i>E. coli</i>	4
Slika 5: Celična stena G+ bakterij	5
Slika 6: Celična stena G- bakterij	6
Slika 7: Shematski prikaz biosinteze peptidoglikana.....	9
Slika 8: Proces transglikozilacije	11
Slika 9: Kristalna struktura PBP1b iz <i>E. coli</i>	13
Slika 10: Moenomicin A.....	14
Slika 11: Spojini 5 in 5b	16
Slika 12: Sidranje spojine 5b v aktivno mesto PBP2 iz <i>S. aureus</i>	17
Slika 13: Učinek spojine 5b na preživetje <i>S. aureus</i>	18
Slika 14: Spojina vodnica	19
Slika 15: Uvedene spremembe spojine vodnice	20
Slika 16: Splošna sintezna shema	21
Slika 17: Končne spojine za testiranje citotoksičnosti, inhibicije glikoziltransferaze in zavirnega delovanja na rast bakterij.	21
Slika 18: Dokazna reakcija testa za določanje citotoksičnosti.....	23
Slika 19: Mehanizem nukleofilne substitucije prve stopnje sintezne poti.....	48
Slika 20: Sol spojine in ftalimida.....	49
Slika 21: Mehanizem nukleofilne substitucije tretje stopnje sintezne poti.....	50
Slika 22: Obarvana mikrotitrkska ploščica pri izvedbi MTS testa	51
Slika 23: Graf: odvisnost absorbance od števila preživelih celic	52
Slika 24: Graf testiranja citotoksičnosti	54

POVZETEK

Množična in nesmotrna uporaba protimikrobnih učinkovin nas je pripeljala do pojava rezistence oz. tako imenovanih multirezistentnih bakterij, ki danes predstavljajo resen problem pri zdravljenju infekcijskih bolezni. Praktično ne poznamo več bakterijske vrste, ki še ni razvila rezistence na protibakterijske učinkovine. Za uspešno zdravljenje infekcij z rezistentnimi bakterijami je nujno odkrivanje in razvoj novih protibakterijskih učinkovin, predvsem s popolnoma novim mehanizmom delovanja in zato s ciljnim delovanjem na najbolj rezistentne seve. Bakterijska celična stena, sestavljena iz peptidoglikana in biosintezne poti po katerih peptidoglikan nastaja, predstavljajo zelo privlačno tarčo za načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin. Biosinteza peptidoglikana se začne v citoplazmi, kjer se sintetizirajo prekurzorji, ki se prenesejo skozi citoplazemsko membrano in vgradijo v že obstoječ peptidoglikan. Po prehodu na zunajcelično stran bakterije sta ključna encima glikoziltransferaza ter transpeptidaza. Medtem ko je transpeptidaza že tarča številnih protimikrobnih učinkovin, poznamo le malo terapevtsko uporabnih zaviralcev glikoziltransferaze.

V okviru diplomskega dela smo sintetizirali potencialne inhibitorje bakterijske glikoziltransferaze. Glikoziltransferaza je encim, ki deluje v zadnji stopnji biosinteze peptidoglikana in katalizira polimerizacijo slatkornih enot v daljša glikanska vlakna. Proces transglykozilacije lahko inhibiramo na dva načina, neposredno z vezavo inhibitorjev v aktivno mesto encima ali posredno z vezavo inhibitorjev na lipid II (substrat za encim). Odločili smo se za načrtovanje in sintezo spojin, ki se predvidoma vežejo na lipid II. Sintetizirali smo spojine triptaminskega tipa, v obliki prostih primarnih aminov in na aminsko skupino pripetih gvanidinov. Sintetizirane spojine smo ovrednotili z različnimi metodami (NMR, MS, IR,...), s pomočjo MTS testa (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol) pa smo določili tudi njihov vpliv na citotoksičnost. V nadaljevanju pričakujemo tudi rezultate testa inhibicije izolirane bakterijske glikoziltransferaze in določanja zaviralnega delovanja spojin na rast bakterij, kar izražamo kot minimalne inhibitorne koncentracije (MIC). Rezultati MTS testa kažejo na to, da so sintetizirane spojine razmeroma netoksične z izjemo na aromatičnih halogeniranih spojin. Sodeč po dosedanjih rezultatih inhibicije glikoziltransferaze in določanja MIC sklepamo, da imajo sintetizirane spojine potencial kot nove protibakterijske učinkovine zaradi izkazane selektivne toksičnosti.

ABSTRACT

Misuse and overuse of antimicrobial active principles has lead to resistance of microorganism i.e. to the occurrence of multiresistant bacterial strains. This represents a serious problem in treatment of infectious diseases. Resistance can be detected in basically every bacterial species. Hence it is crucial to discover and develop new antimicrobial drugs, especially those with new mechanisms of action. These molecules are targeting the most resistant bacterial strains. The peptidoglycan cell wall and paths for its biosynthesis represent an appealing target in design of new antibacterial active principles. Peptidoglycan biosynthesis is initiated in cytoplasm with the synthesis of precursors. Those are later transported through the cytoplasmic membrane and incorporated in the preexistent peptydoglican. Enzymes glycosyltransferase and transpeptidase play a crucial role in the biosynthesis processes occurring on the outer side of bacterial cells. Transpepdase is already a target for numerous antimicrobial agents while there are only a few therapeutically effective inhibitors of glycosyltransferase.

In our research work we synthesized potential inhibitors of bacterial glycosyltransferase. This is an enzyme which is involved in the last step of peptidoglycan synthesis – it catalyses the polymerization of sugar entities in longer glycan threads. The transglycosylation process can be inhibited in two ways, either with the direct binding of inhibitors to the active site of the enzyme or by the interaction of inhibitors with the enzyme substrate lipid II (indirect inhibition). We focused on the design and synthesis of compounds which interact with lipid II. We synthesized tryptaminic derivates in form of primary amines and in form of guanidine substituted secondary amines. These compounds were characterized using different analytical method (NMR, MS, IR,...). Cytotoxicity was determined by MTS tests (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Our compounds showed relative low cytotoxicity with the exception of halogen aromatic compounds. Inhibitory action of our compounds was assessed using isolated bacterial glycosyltransferase and by assessing the effect on bacterial cell growth in cell cultures (expressed as minimal inhibitory concentration – MIC). Obtained results indicate a good potential of our molecules as antimicrobial agents due to their selective toxicity.

SEZNAM OKRAJŠAV

AcCoA	acetilkoencim A
ATP	adenozintrifosfat
B	baza
Boc	<i>t</i> -butiloksi karbonilna skupina
c	koncentracija
CDCl₃	devteriran kloroform
CD₃OD	devteriran metanol
CFU	Ang. colony forming units
Ctrl	kontrola
Ddl	D-alanil-D-alanin ligaza
d	dublet
D-Ala	D-alanin
dd	dublet dubleta
ddd	dublet dublet dubleta
D-Glu	D-glutaminska kislina
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DMSO-d₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
ekv.	ekvivalent
ESI	elektrorazpršilna ionizacija
Et₃N	trietilamin
EtOH	etanol
FAD	flavin adenin dinukleotid
G-	po Grammu negativne bakterije
G+	po Grammu pozitivne bakterije
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
GlmS	L-glutamin:D-fruktoza-6-fosfat amidotransferaza
GlmM	fosfoglukozamin mutaza
GlmU	bifunkcionalen encim, ki vključuje <i>N</i> -acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferazo in glukozamin-1-fosfat- <i>N</i> -acetil-transferazo

Gly	glicin
h	ura
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti
IC₅₀	koncentracija inhibitorja, ki zmanjša hitrost encimske reakcije na polovico
IR	infrardeča spektroskopija
J	skloplitvena konstanta
L-Ala	L-alanin
L-Lys	L-lizin
Lipid I	undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-pentapeptid
Lipid II	undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapeptid)-GlcNAc
m	multiplet
M	molarnost (mol/l)
MeOH	metanol
mDAP	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
MF	mobilna faza
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	na meticilin odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
MraY	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-pentapeptid fosfotransferaza
MS	masna spektrometrija
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2 <i>H</i> -tetrazol
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruviltransferaza
MurB	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat L-alanin ligaza
MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-meso-diaminopimelat ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamoil-meso-diaminopimelat-D-alanin-D-alanin ligaza
MurG	<i>N</i> -acetilglukozamin transferaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NADP+	nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat
NADPH	nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfohidrid (ali bolje reducirana NADP)
nm	nanometer

NMR	nuklearna magnetna resonanca
PBMC	»peripheral blood mononuclear cells« (mononuklearne celice periferne krvi)
PBP	penicilin vezajoči proteini (Ang.)
PEP	fosfoenolpiruvat
R_f	retencijski faktor
s	singlet
t	triplet
T_{tal}	temperatura tališča
TEA	trietilamin
TLC	tankoplastna kromatografija
TG	transglikozilazni(a), npr. domena
TM	transmembranski(a), npr. vijačnica
TMS	tetrametilsilan
TP	transpeptidazni(a), npr. domena
UMP	uridin monofosfat
UDP	uridin difosfat
UTP	uridin trifosfat
VRE	na vankomicin odporni enterokoki
δ	kemijski premik
λ	valovna dolžina
η	izkoristek

1. UVOD

1.1 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

Antibiotiki so protimikrobne učinkovine naravnega izvora. So metaboliti različnih vrst mikroorganizmov, največkrat bakterij in gliv, ki lahko delujejo bakteriostatično (zavirajo rast bakterij) ali baktericidno (povzročijo smrt bakterij). V širšem pomenu mednje štejemo tudi njihove polsintezne derivate, ki jih pridobimo s kemično modifikacijo naravnih antibiotikov. S tem lahko dosežemo boljše farmakokinetične in farmakodinamične lastnosti, razširimo spekter delovanja ali zmanjšamo toksičnost. V skupino protimikrobnih učinkovin spadajo tudi kemoterapeutiki, ki pa so izključno sinteznega izvora (1).

Glede na mehanizem delovanja ločimo štiri glavne skupine protimikrobnih učinkovin:(2)

- zaviralci biosinteze celične stene: penicilini, cefalosporini, monobaktami, karbapenami, glikopeptidi,
- zaviralci biosinteze proteinov: aminoglikozidi, makrolidi, tetraciklini, kloramfenikol, oksazolidinoni,
- zaviralci biosinteze in funkcije nukleinskih kislin: kinoloni, sulfonamidi, sulfoni, trimetoprim, nitroimidazoli in
- učinkovine, ki spreminjajo permeabilnost celične membrane: polimiksini, polipeptidni antibiotiki.

1.2 REZISTENCA NA PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

Odkritje protimikrobnih učinkovin je eno izmed velikih odkritij 20. stoletja, ki ga je zasenčil pojav nanje rezistentnih bakterijskih sevov. Po šestih desetletjih množične uporabe antibiotikov postajajo bakterijski patogeni odporni na številne protimikrobne učinkovine. *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* in *Enterococcus faecalis* so patogeni, ki so odgovorni za večino infekcijskih bolezni. Zelo problematične postajajo rezistentne bolnišnične patogene bakterije kot so MRSA (na meticilin odporen *Staphylococcus aureus*), VRE (na vankomicin odporen *Enterococcus faecalis*) in na penicilin odporni *Streptococcus pneumoniae* (3).

Glavni vzrok rezistence je nepravilna in prekomerna raba protimikrobnih učinkovin. To daje bakterijam možnost, da razvijejo rezistenco nanje. Primarni mehanizem razvoja rezistence je mutacija v bakterijskem genomu. Ko se rezistenca razvije, se lahko širi vertikalno z delitvijo bakterije in horizontalno s prenosom dednega materiala, ki ni na

kromosomu (4). Tuj genski material lahko bakterije dobijo z vključevanjem proste DNA v njihov kromosom (transformacija), geni se lahko prenesejo tudi preko infekcije z bakteriofagom (transdukcija) ali preko plazmidov in konjugativnih transpozonov (konjugacija) (5,6). Bakterije lahko razvijejo rezistenco na en razred protibakterijskih učinkovin, lahko pa so hkrati rezistentne na več učinkovin. Pojav multirezistentnih bakterijskih sevov ob zmanjšanem obsegu razvoja novih protibakterijskih učinkovin je zelo zaskrbljujoče dejstvo, saj medtem ko starejše, uveljavljene protibakterijske učinkovine izgubljamjo učinkovitost, na tržišče le počasi prihajajo protibakterijske učinkovine z novim mehanizmom delovanja na katere se rezistenca še ni razvila. O resnosti rezistence govori tudi dejstvo, da danes ni protibakterijske učinkovine, za katero ne bi poznali vsaj enega rezistentnega seva oz. mehanizma rezistence (7). Najnovejša primera sta pojava rezistentnih sevov na linezolid, ki je v uporabi od leta 2000 (8) in daptomicin, ki je v uporabi od leta 2003 (9).

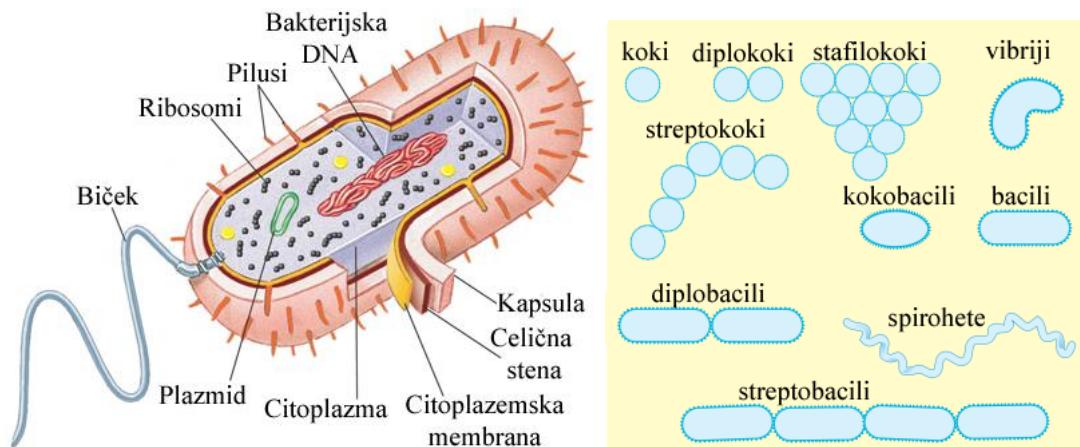
Mehanizmi rezistence, preko katerih bakterije postanejo rezistentne na protibakterijske učinkovine so:(4,10)

- spremembra oz. mutacija tarčnega mesta na katero deluje učinkovina,
- produkcija encimov, ki razgrajujejo ali kemično modificirajo učinkovino,
- neprepustnost oz. zmanjšana permeabilnost celične membrane,
- aktivno črpanje učinkovine iz bakterijske celice s pomočjo membranskih črpalk,
- spremembra presnovne poti, ki je bila ovirana ali prekinjena zaradi delovanja protibakterijskih učinkovin.

1.3 BAKTERIJSKA CELIČNA STENA

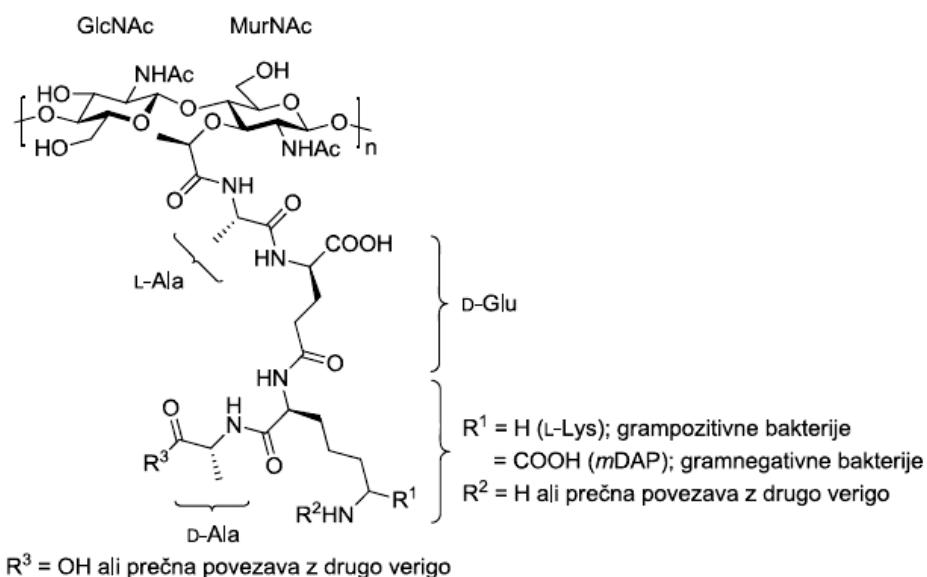
Bakterije so enocelični organizmi, ki so se razvili pred približno 3 milijardami let iz arhej (*Archaea*). Spadajo med prokarionte. Od evkariontske celice se razlikujejo po tem, da ne vsebujejo organelov in nimajo izoblikovanega celičnega jedra, njihov dedni material pa običajno sestavlja ena krožna molekula DNA, v kateri so zapisane vse informacije, potrebne za njihovo rast in razmnoževanje. Dodatna razlika v primerjavi z evkariontsko celico je tudi celična stena, ki obdaja bakterijo na zunani strani citoplazemske membrane in daje celici značilno obliko. Po morfologiji delimo bakterije na kroglaste (koki), paličaste (bacili), ukrivljene paličaste (spirili), zapognjene (vibriji), spiralne (spirohete) in sporogene bakterije (Slika 1). Glede na barvanje po Gramu jih delimo na grampozitivne (G+) in

gramnegativne (G-) bakterije. Lahko jih razdelimo tudi po njihovi potrebi po kisiku na aerobne in anaerobne (10,11,12).



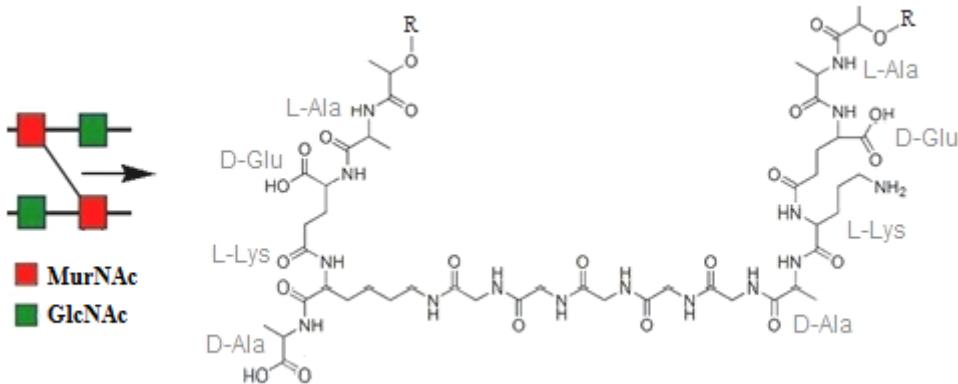
Slika 1: Shematska zgradba bakterijske celice in morfološke značilnosti bakterij (13,14).

Bakterijska celična stena se nahaja na zunanji strani citoplazemske membrane in daje bakterijam obliko, mehansko zaščito, ter je nujna za vzdrževanje notranjega osmognega tlaka. Sestavljena je iz peptidoglikana, ki je kompleksen polimer, najpogosteje zgrajen iz dolgih vzporednih verig izmenjujočih se enot *N*-acetilmuraminske kislino in *N*-acetilglukozamina, ki so med seboj premrežene s kratkimi peptidi (slika 2). Poleg peptidoglikana v celični steni zasledimo tudi tehojsko in lipotehojsko kislino, polisaharide, proteine, lipopolisaharide in porine (10).



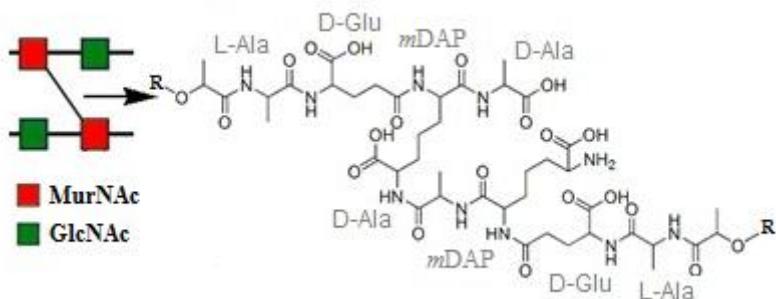
Slika 2: Osnovna zgradba peptidoglikana.

V zgradbi peptidoglikana obstajajo značilne razlike med G+ in G- bakterijami. Pri G+ bakterijah je v peptidni verigi na mestu 3 običajno L-lizin, pri G- pa *mezo-diamonopimelinska kislina* (*mezo-A2pm*), v sladkornem delu so razlike v prisotnosti ali odsotnosti *N*-acetilnih ostankov, razlike pa so tudi pri sestavi povezave v peptidnem mostičku. V bakteriji *S. aureus*, predstavniku G+ bakterij, pentaglicinski most povezuje L-lizin prve verige z D-alaninom druge verige (Slika 3) (15,16).



Slika 3: Prečno premreženje peptidoglikana v *S. Aureus* (17).

Pri večini G- bakterij pa sta neposredno povezani tretja aminokislina prve verige s četrto aminokislino druge verige. Pri *E. coli*, kot predstavnici G- bakterij, to pomeni peptidno vez med mezo-A2pm in D-alaninom (Slika 5).

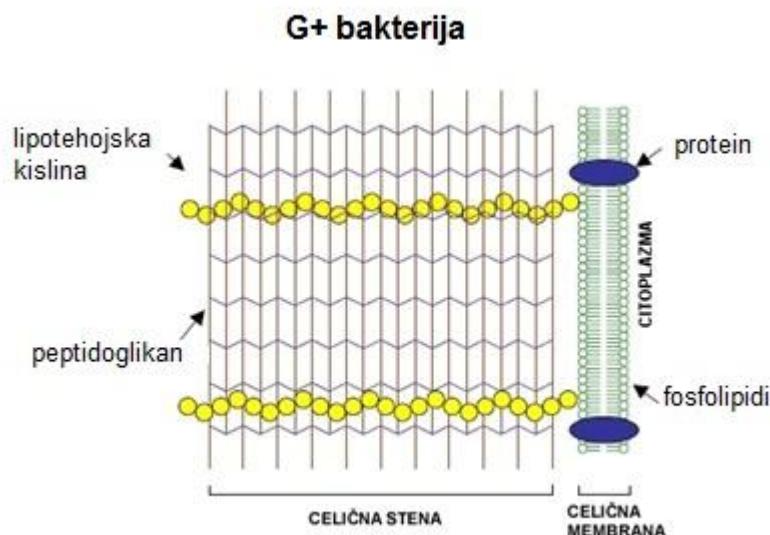


Slika 4: Prečno premreženje peptidoglikana v *E. coli* (17).

Različna je tudi stopnja premreženosti peptidoglikana s peptidnimi mostički. Pri *E. coli* je prečno premreženih okoli 20% vseh peptidnih verig peptidoglikana, pri G+ bakterijah pa več kot 90% peptidnih verig peptidoglikana (15).

1.3.1 G+ bakterije

Celična stena G+ bakterij je debela približno 15-50 nm in je po svoji strukturi preprostejša od G- bakterij. Sestavljena je iz do 40 plasti peptidoglikana, ki lahko predstavlja do 50% mase bakterijske celične stene, kislih anionskih polimerov, kot sta tehojska kislina in teihuronska kislina. Tehojsko kislino, ki je kovalentno vezana na lipide celične membrane imenujeno lipotehojska kislina. Kemijsko je tehojska kislina polimer gliceril fosfata ali ribitol fosfata in *N*-acetil-D-manozaminuronske kisline. Oba tipa anionskih polimerov vsebujejo fosfatne, hidroksilne in anionske skupine, ki delujejo kot ionsko izmenjevalni sistem. Ta uravnava koncentracijo ionov v celici, kar je bistvenega pomena za delovanje mnogih bakterijskih encimov. V celični steni najdemo tudi različne proteine in polisaharide, redkeje lipoproteine in lipopolisaharide. Celična stena je dobro prepustna za raztopljene snovi in za spojine z molekulsko maso nad 70 000 g/mol (19).



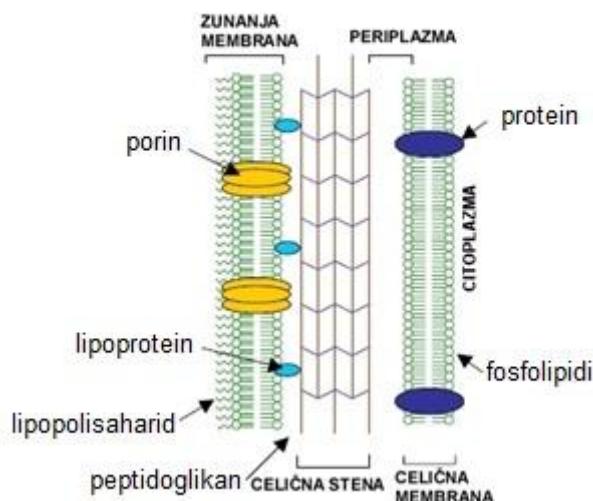
Slika 5: Celična stena G+ bakterij (20).

1.3.2 G-bakterije

Celična stena G- bakterij je bolj kompleksna. Poleg notranje citoplazemske membrane imajo G- bakterije tudi zunanjou membrano, ki je zgrajena iz fosfolipidnega dvosloja in vsebuje številne proteine in porine preko katerih poteka izmenjava snovi z okolico. Na zunanjou membrano so pritrjeni številni kompleksno zgrajeni lipopolisaharidi, imenovani tudi endotoksi. Sestavljeni so iz treh delov: lipida A, središčnega polisaharida in terminalnih polisaharidov. Slednji štrlico iz bakterijske stene in so pomembni antigeni, ki

so odgovorni za aktivacijo imunskega odziva pri gostitelju. Prostor med notranjo citoplazmsko membrano in zunanjim membranom imenujemo periplazemski prostor. Ta je zgrajen iz enojne ali dvojne plasti peptidoglikana, kar predstavlja le 10% mase bakterijske celične stene. V periplazemskem prostoru najdemo tudi številne hidrolitične encime, vezalne proteine za sladkorje, aminokisline, anorganske ione in vitamine. Peptidoglikan je z zunanjim membranom povezan preko lipoproteinskih molekul. Zaradi dodatne zunanje membrane je prepustnost celične stene G- bakterij v primerjavi z G+ bakterijami zelo zmanjšana. Membrane ne prehajajo nenabite hidrofilne molekule z molekulsko maso nad 600 g/mol in zelo lipofilne spojine, kot so maščobne kisline ter nekateri antibiotiki kot so eritromicin, rifamicin in vankomicin (19).

G- bakterije



Slika 6: Celična stena G- bakterij (20).

1.3.3 Biosinteza peptidoglikana

Biosinteza peptidoglikana je kompleksen proces, katerega sestavlja približno 20 encimsko kataliziranih reakcij. Začne se v citoplazmi bakterijske celice, nadaljuje se na notranji strani in konča na zunanji strani citoplazemske membrane.

Biosintezo peptidoglikana razdelimo na tri dele (15).

- 1) Sinteza prekurzorjev v citoplazmi.
- 2) Vezava prekurzorjev na lipidni nosilec in prenos skozi plazemske membrane.
- 3) Prehod prekurzorjev v celično steno in pripenjanje na že obstoječi peptidoglikan.

1) Sinteza prekurzorjev v citoplazmi:

Prvi korak pri sintezi peptidoglikana je nastanek **UDP-N-acetilglukozamina** (UDP-GlcNAc) iz D-fruktoze-6-fosfata v 4 stopnjah. Najprej L-glutamin:D-fruktoza-6-fosfat amidotransferaza (GlmS) katalizira pretvorbo D-fruktoze-6-fosfata v glukozamin-6-fosfat, ki nato s pomočjo fosfoglukozamin mutaze (GlmM) izomerizira do glukozamin-1-fosfata. Sledi *N*-acetiliranje glukozamin-1-fosfata in prenos UDP skupine na *N*-acetilglukozamin-1-fosfat do nastanka UDP-GlcNAc. Reakcijo katalizira bifunkcionalen encim GlmU.

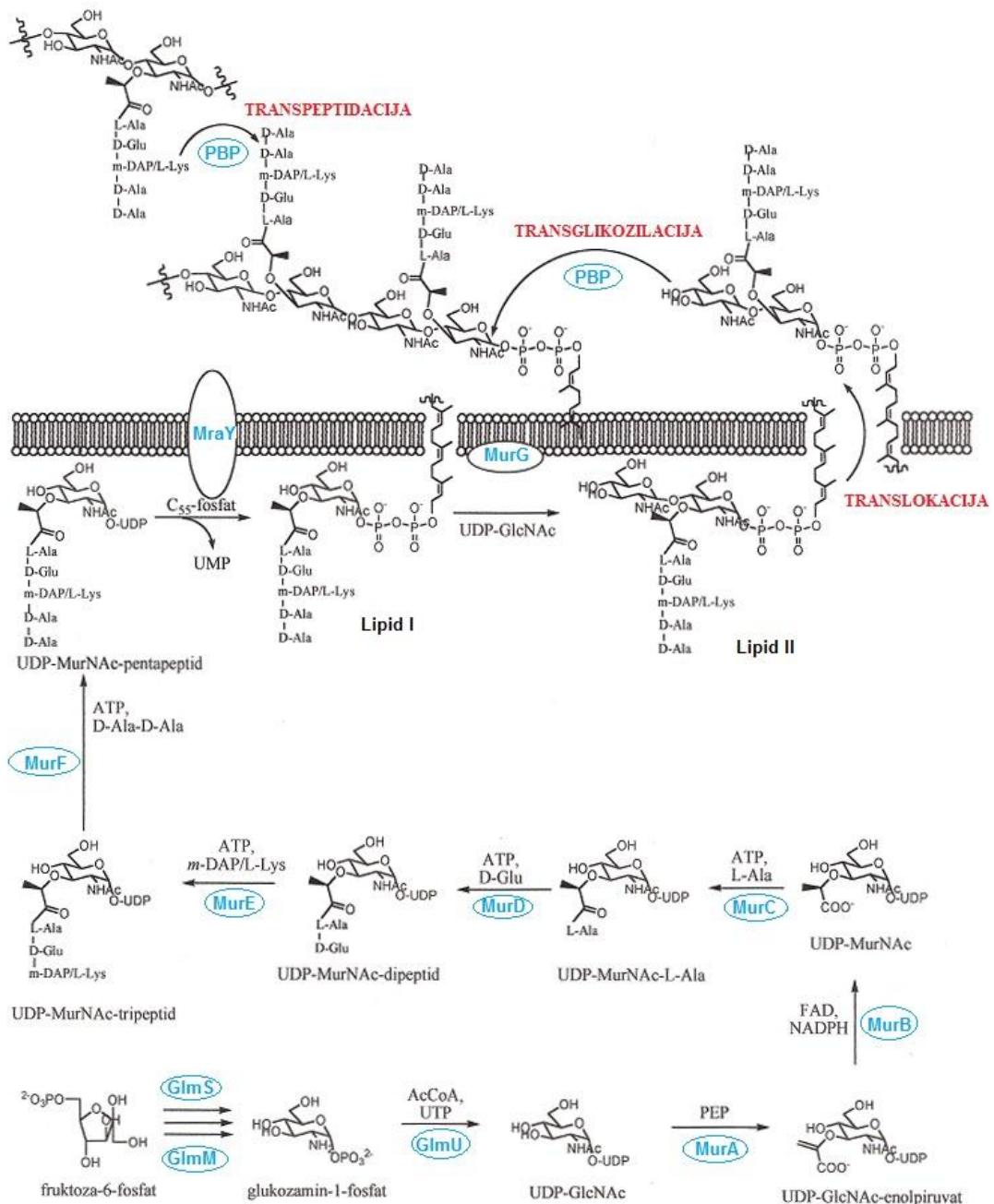
UDP-*N*-acetilglukozamin se v nadaljevanju v dveh stopnjah pretvori v **UDP-N-acetilmuraminsko kislino** (UDP-MurNAc). Najprej encim MurA katalizira prenos enolpiruvata iz fosfoenolpiruvata (PEP) na 3'-hidroksilno skupino UDP-GlcNAc, nato pa encim MurB katalizira redukcijo UDP-GlcNAc-enolpiruvata do laktoilne skupine. Na to laktoilno skupino se nato postopoma pripne veriga 5 aminokislin: L-Ala-D-Glu-*m*DAP(L-Lyz)-D-Ala-D-Ala in nastane **UDP-MurNAc-pentapeptid**. Te reakcije katalizirajo od ATP odvisne ligaze Mur, in sicer MurC, ki pripne L-alanin, MurD, ki pripne D-glutaminsko kislino, MurE, ki pripne L-lizin pri G+ ali *mezo*-diaminopimelinsko kislino (*mezo*-A2pm) pri G- bakterijah in MurF, ki pripne dipeptid D-alanil-D-alanin, ki ga vnaprej sintetizira D-alanil: D-alanin ligaza (Ddl) (21).

2) Vezava prekurzorjev na lipidni nosilec in prenos skozi plazemske membrane

UDP-MurNAc-pentapeptid se sedaj poveže s fosforiliranim lipidnim nosilcem undekaprenilfosfatom, pri čemer nastane undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-pentapeptid, imenovan **lipid I**, sprosti se pa UMP. To reakcijo katalizira encim UDP-*N*-acetilmuramoil-pentapeptid fosfotransferaza (MraY). V naslednji stopnji encim UDP-*N*-acetilglukozamin:*N*-acetilmuramoil-(pentapeptid)-pirofosforil-undekaprenol-*N*-acetilglukozamintransferaza (MurG) na lipid I preko β -1,4-glikozidne vezi pripne UDP-GlcNAc. Tako nastane zadnji znotrajcelični produkt v sintezi peptidoglikana imenovan undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapeptid)-GlcNAc ali **lipid II**, sprosti se pa UDP. Lipid II se nato prenese na zunanj stran citoplazemske membrane (22).

3) Prehod prekurzorjev v celično steno in pripenjanje v že obstoječi peptidoglikan

Zunajcelične stopnje v biosintezi peptidoglikana katalizira skupina encimov, imenovanih penicilin vezavni proteini (PBP), ki imajo tako glikoziltransferazno kot transpeptidazno katalitično aktivnost. Ime so dobili po sposobnosti prepoznavanja in vezave β -laktamskih antibiotikov. Vgradnja osnovnega gradnika v že obstoječi peptidoglikan se začne s transglikozilacijo. Pri tem sodelujejo encimi imenovani bakterijske glikoziltransferaze, ki povezujejo sladkorne enote v daljša glikanska vlakna. V zadnji stopnji se peptidne verige na sosednjih glikanskih vlaknih prečno povežejo, tako da nastane zamrežena struktura peptidoglikana. Reakcija se imenuje transpeptidacija, sodelujoči encimi pa transpeptidaze. Vezavno mesto za transpeptidaze predstavlja D-Ala-D-Ala enota pentapeptida. Transpeptidaza s serinsko –OH skupino v aktivnem mestu odcepi terminalni D-Ala, pri čemer se tvori aktiviran acilni intermedijat. Ta nato reagira z ϵ -amino skupino *mDAP* ali amino skupino terminalnega Gly na pentaglicinski verigi sosednjega glikanskega vlakna in tvori se peptidna vez. β -laktamski antibiotiki so mimetiki terminalnega D-Ala-D-Ala in v reakciji s serinsko –OH v aktivnem mestu encima tvorijo stabilen acilni kompleks, ki ireverzibilno inhibira encim, s tem pa posredno zavre biosintezo peptidoglikana in povzroči bakterijsko smrt (23).



Slika 7: Shematski prikaz biosinteze peptidoglikana (povzeto po 24).

1.4 PBP- »Penicillin binding proteins«

Zaradi pojava rezistence na že obstoječe učinkovine je težnja po odkrivanju novih protimikrobnih učinkovin velika. Trenutno reševanje tega problema je usmerjeno v kemijske spremembe že obstoječih antibiotikov, odkrivanje novih potencialnih tarč in razvoj povsem novih razredov antibiotikov (3).

Pojav rezistence nas je pripeljal do dejstva, da je potrebno dobro proučiti vse encime, ki so udeleženi pri biosintezi peptidoglikana in zanje poiskati primerne inhibitorje (7). Biosintezo peptidoglikana lahko v grobem razdelimo na dve stopnji. V znotrajcelični stopnji sodelujejo od ATP odvisne ligaze Mur (Mur C-F), ki v štirih zaporednih stopnjah sintetizirajo UDP-MurNAc pentapeptid, ki se nato poveže z lipidnim nosilcem, nastane tako imenovani lipid II, ki se prenese na zunanjo stran citoplazemske membrane. Zunajcelične stopnje pa katalizira skupina encimov imenovanih PBP (16).

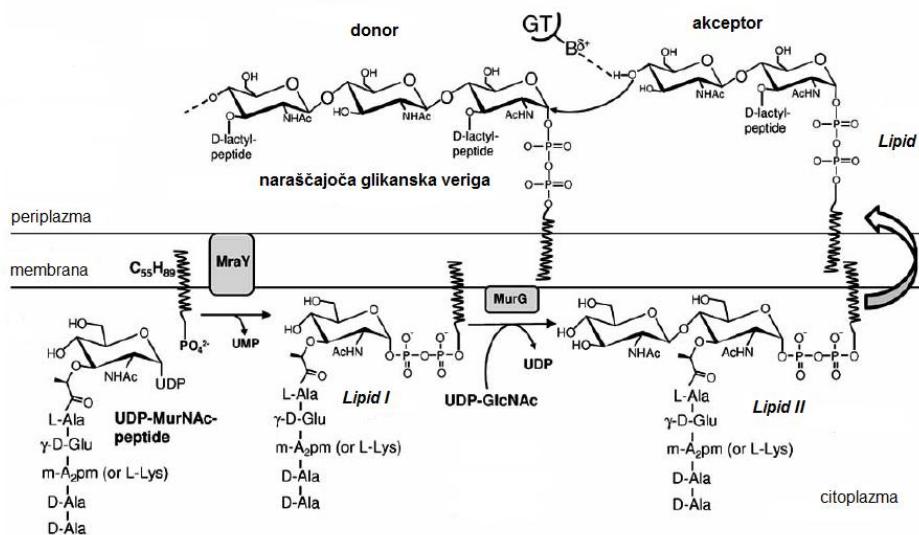
V bakterijah obstaja več različnih vrst PBP. Glavna delitev je glede na velikost molekule in na zaporedje aminokislin, in sicer na PBP z visoko molekulsko maso in na PBP z nizko molekulsko maso. Skupino PBP z visoko molekulsko maso predstavljajo encimi, ki so odgovorni za transglukozilacijo in transpeptidacijo in so vezani na celično membrano. Skupino PBP z nizko molekulsko maso pa predstavljajo encimi, ki katalizirajo D-Ala karboksipeptidazno in endopeptidazno aktivnost in se prosto gibljejo na zunanji strani celične membrane oz. v periplazmi. Druga delitev poteka glede na število reakcij, ki jih katalizirajo: bifunkcionalni razred A, ki katalizira tako transglukozilacijo kot transpeptidacijo in monofunkcionalni razred B, ki katalizira samo transpeptidacijo (25,26). V zadnjem času so v določenih sevih *E. coli*, *S. aureus* in *Micrococcus luteus* odkrili razred PBP, ki ga sestavlja samo monofunkcionalna glikoziltransferaza. Gre za mutirane bakterijske seve, ki so velikokrat vzrok rezistence (3,27). Znotraj določenega seva bakterij lahko najdemo več različnih vrst PBP. Npr. v *S. pneumoniae*, ki je glavni povzročitelj infekcij zgornjih dihalnih poti, so odkrili 6 različnih PBP, in sicer tri iz razreda PBP A (PBP1a, PBP1b in PBP2a), dva iz razreda PBP B (2x, PBP2b), nizkomolekularni PBP in PBP3. Ugotovili so, da nimajo vsi PBP enake vloge pri preživetju bakterijske celice. V primeru bakterije *S. pneumoniae* je bilo namreč ugotovljeno, da ima PBP2a ključno vlogo pri sposobnosti preživetja celic in pri pridobivanju odpornosti na β-laktamske antibiotike (26).

1.5 Glikoziltransferaza in transpeptidaza - encima v zadnji stopnji biosinteze peptidoglikana

Transglukozilacija in transpeptidacija sta ključna procesa v zadnji stopnji sinteze peptidoglikana. Glikoziltransferaza povezuje sladkorne enote v daljša glikanska vlakna, transpeptidaza pa ta glikanska vlakna prečno poveže, da nastane zamrežena struktura peptidoglikana. Znotrajcelični encimi in transpeptidaza so bili že predmet številnih

obravnav in tako poznamo veliko inhibitorjev teh encimov. Glikoziltransferaza kot tarča je dokaj slabo raziskana in nam predstavlja velik izziv pri odkrivanju novih protibakterijskih učinkovin (28).

Glikoziltransferaza je torej encim, ki katalizira povezovanje sladkornih enot v glikanska vlakna. Lipid II (undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-(pentapeptid)-GlcNAc) je substrat, ki se v več stopnjah sintetizira na notranji strani citoplazemske membrane. Ta se nato po do sedaj neznanem mehanizmu prenese preko citoplazemske membrane v periplazmo. V periplazmi se nahajajo encimi glikoziltransferaze in transpeptidaze. Glutamatni ostanek v glikoziltransferazi odcepi proton na 4-OH skupini GlcNAc lipida II. Lipid II postane reaktivni nukleofil, ki direktno napade C₁ atom MurNAc naraščajoče glikanske verige, ki ima elektrofilne lastnosti. pride do tvorbe vezi med njima (Slika 8). Undekaprenilfosfat je zaradi fosfata dobro izstopajoča skupina in se odcepi. Sledi še prečno premreženje glikanskih vlaken s pomočjo transpeptidaze in sintezna pot peptidoglikana je končana (29,30).



Slika 8: Proses transglikozilacije (povzeto po 29).

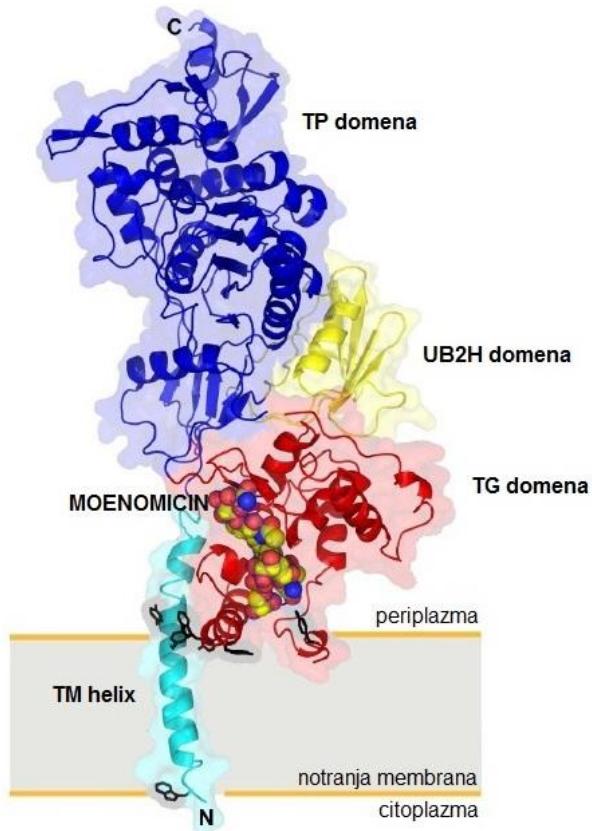
Če želimo ta proces biosinteze peptidoglikana prekiniti, moramo poiskati učinkovite inhibitorje obeh encimov. Glikoziltransferaza kot tarča protimikrobnih učinkovin je v primerjavi s transpeptidazo dokaj slabo raziskana. Kljub temu, da oba encima delujeta v zadnji stopnji biosinteze peptidoglikana, se je do nedavnega veliko več pozornosti posvečalo transpeptidazi. Inhibitorji transpeptidaze - β-laktamski antibiotiki so namreč najpogosteje uporabljen razred antibiotikov (29).

1.6 Glikoziltransferaza kot tarča potencialnih inhibitorjev

Glikoziltransferaza je zelo zanimiva tarča za razvoj novih antibiotikov predvsem iz dveh razlogov. Prvi razlog je ta, da procesi transglikozilacije potekajo na površini celice - zunanji strani citoplazemske membrane. Tako je olajšan dostop učinkovin do tarče, saj ni potreben prenos skozi citoplazemsko membrano. Ravno neprepustnost oz. zmanjšana permeabilnost citoplazemske membrane je pogost vzrok pojava rezistence. Iz tega lahko sklepamo, da bi bili inhibitorji glikoziltransferaze kot nove potencialne protimikrobne učinkovine manj podvrženi rezistenci. Drugi pomemben razlog je ta, da ogrodje peptidoglikana tudi v rezistentnih sevih ostaja nespremenjeno, medtem ko so peptidi na stranskih verigah nagnjeni k spremembam. Te spremembe pa so največkrat vzrok rezistence. Z inhibitorji glikoziltransferaz ustavimo proces transglikozilacije, kljub morebitnim prisotnim spremembam v peptidni verigi. Spremembe v peptidni verigi pri inhibiciji ne odigrajo nobene vloge. To je že drugo pomembno dejstvo, ki nakazuje na to, da bi bili inhibitorji glikoziltransferaz resnično manj podvrženi rezistenci (3). Tudi dejstva, da glikoziltransferaze ne najdemo v celicah sesalcev, ne gre zanemariti. Princip selektivne toksičnosti se bi tudi pri inhibitorjih glikoziltransferaz izrazil v popolni meri (31).

Do sedaj je bilo odkritih in objavljenih malo inhibitorjev glikoziltransferaz. Razvoj so do nedavnega ovirali slabo poznavanje encima, slaba dostopnost tako encima kot njegovega substrata (lipida II) in s tem povezana nezmožnost vzpostavitev učinkovitega testnega sistema. Lipid II je v bakterijski celici prisoten v zelo majhnih količinah, njegova izolacija iz bakterij pa je zaradi strukturne kompleksnosti, visoke lipofilnosti in kemijske nestabilnosti zelo zahtevna (27,28). Nezadostne količine lipida II izoliranega iz naravnih virov so pripeljale do dejstva, da je bilo potrebno poiskati alternativno rešitev. Iz naravnega substrata lipid I in encima MurG so s pomočjo kemijske sinteze pripravili lipid II. Na tak način so uspeli pripraviti zadostne količine lipida II za nadaljnje raziskave, s katerimi so uspeli razvozlati njegov mehanizem delovanja in njegove interakcije z glikoziltransferazo (24). Tudi slaba raziskanost encima je oteževala napredok na tem področju. S pridobitvijo kristalnih struktur PBP je postalo iskanje inhibitorjev bistveno lažje. Ugotovili so namreč, da je PBP1b iz *E. coli* zgrajen iz dveh encimskih domen, TP domene in TG domene, UB2H domene in TM vijačnice (slika 9). TP domena je odgovorna za transpeptidacijo, TG domena je odgovorna za transglikozilacijo, UB2H domena se nahaja med TP in TG domeno, njena funkcija in struktura sta še neznani, TM vijačnica je

pa odgovorena za pritrditev PBP na membrano (32). Ugotovili so, da sta za vezavo inhibitorja glikoziltransferaze-moenomicina odgovorni tako TG domena kot TM vijačnica ter da je tudi TG domena vključena v interakcije z membrano (33). Do danes jim je uspelo pridobiti kristalne strukture glikoziltransferaz iz različnih PBP. Poročali so o kristalni strukturi iz *S. aureus* in *Aquifex aeolicus*. Znane so kristalne strukture samega encima, encima v interakciji z moenomicinom (naravni inhibitor encima) in encima v interakciji z lipidom II (33,34). Pridobitev prečiščenega encima v topni in stabilni obliki in zadostne količine lipid II so omogočile vzpostavitev učinkovitega testnega sistema, na podlagi katerega so s pomočjo visoko-zmogljivostnega rešetanja uspeli pripraviti knjižnico inhibitorjev glikoziltransferaz. S tem smo korak bliže k razvoju protimikrobnih učinkovin z novim mehanizmom delovanja (3,34).

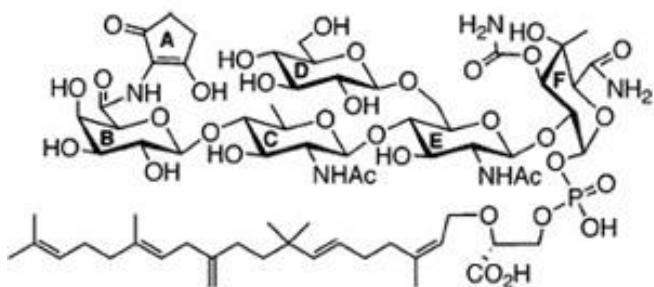


Slika 9: Kristalna struktura PBP1b iz *E. coli* (povzeto po 32).

1.6.1 Naravni inhibitorji glikoziltransferaz

Spojine, ki se neposredno vežejo na glikoziltransferazo: prvi in edini naravni inhibitorji, ki se vežejo direktno na encim so moenomicini. Najpomembnejši med njimi je moenomicin A, ki ima na mestu C₂₅ vezano verigo izoprena (Slika 10). Je zelo močan

inhibitor, z minimalno inhibitorno koncentracijo v razponu od 0,01 do 0,1 mg/ml (7). Učinkovit je predvsem proti G+ bakterijam, pri G- bakterijah je pa v glavnem neaktiv, najverjetneje zaradi nezmožnosti prehajanja skozi zunanj bakterijsko membrano. Izolirali so ga iz vrst *Streptomyces*, kot sta *Streptomyces ghanaensis* in *Streptomyces bambigiensis*. Pod imenom Flavomicin® se uporablja kot posepeševalec rasti v živalski krmi, v humani medicini pa se zaradi slabih farmakokinetičnih lastnosti ne uporablja. Ima dolgo razpolovno dobo, dokazane toksične učinke pri parenteralni uporabi, peroralno pa je neučinkovit (35). Zaradi izredno močnega inhibitornega učinka moenomicina so podrobnejše proučili odnos med njegovo strukturo in delovanjem ter njegovo biosintezeno in razgradno pot (36). Ugotovili so, da tudi razgradna produkta moenomicina, trisaharidni derivat, ki je sestavljen iz obročev C, E in F ter disaharidni derivati, ki ga sestavlja obroča E in F *in vitro* inhibira glikoziltransferazo v *E. coli* (Slika 10). Iz tega so sklepali, da bodo tudi enostavniji derivati moenomicina izkazovali inhibitorno aktivnost. Sinteza strukturno preprostejših derivatov je postala velik izziv. Pripravili so knjižnico disaharidnih derivatov ter jih testirali na protibakterijsko aktivnost. Pri tem so ugotovili, da spojine izkazovale aktivnost tudi proti *Enterococcus faecalis* sevom. Za te preprostejše derivate pričakujejo, da bodo izkazovali inhibitorno aktivnost, ki bo primerljiva z inhibitorno aktivnostjo vankomicina pri klinično pomembnih sevih (34).



Slika 10: Moenomycin A (37).

Spojine, ki se vežejo na substrat (lipid II): naravne spojine, ki se vežejo na lipid II so glikopeptidi. To sta vankomicin in teikoplanin. Vežeta se na D-Ala-D-Ala del lipida II. Vankomicin je prvi odkriti primer spojine, ki se veže na lipid II in na ta način zavira biosintezo peptidoglikana (4). Na lipid II se veže preko pet H-vez. V vankomicin odpornih enterokokih imamo D-Ala-D-Ala del nadomeščen z D-Ala-D-Lac, zato se tvori ena H-vez

manj in posledično se lahko zmanjša afiniteta vankomicina do lipida II tudi do 1000-krat. Posledično tudi vankomicin danes ni več kos rezistentim sevom (35).

Druga skupina so lantibiotiki, kot sta nizin in mersacidin. Nizin se veže na pirofosfatni del lipida II in s tem tvori pore v citoplazemski membrani. Vsako tako poro sestavlja 8 molekul nizina in 4 molekule lipida II. Z nastankom teh por pride do porušenja membranskega potenciala in membrana tako ni zmožna več opravljati svoje funkcije. Mersacidin se veže na terminalni GlcNAc lipida II in ima nižjo afiniteto vezave kot nizin. S svojo vezavo na lipid II prepreči nadaljnjo transglikozilacijo (4,31).

Substrat (lipid II) ima zaradi svoje strukturne raznolikosti številne prednosti pred drugimi tipi inhibitorjev. S tem, ko blokiramo substrat, hkrati blokiramo več stopenj sinteze peptidoglikana. Tako imamo združena dva različna tipa inhibicije v eni molekuli. Na primer, vankomicin z vezavo na D-Ala-D-Ala blokira tako glikoziltransferazo kot transpeptidazo. Tudi rezistenca se v tem primeru ne razvije tako pogosto, možna je le s horizontalnim prenosom genov, ki jih proizvaja sam organizem. Inhibicija substrata (lipida II) ima pa tudi nekaj slabosti. Inhibitorji so največkrat velike in polarne molekule in težko prehajajo zunanjo membrano pri G- bakterijah. Zato se največkrat uporabljajo parenteralno, spekter pa je omejen na G+ bakterije. Vankomicin in teikoplanin sta v klinični uporabi že desetletja (7).

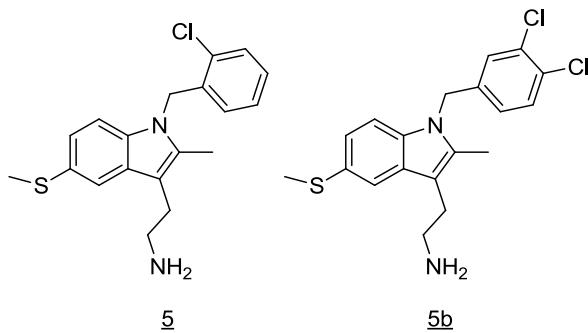
1.6.2 Sintezni inhibitorji glikoziltransferaz

Inhibitorji, ki se vežejo na encim: ti inhibitorji so bili zasnovani po zgledu moenomicina ali lipida II. Vsebujejo strukture elemente, ki naj bi bili odgovorni za direktno vezavo na glikoziltransferazo. Kot je bilo že prej omenjeno, so pripravili kombinatorično knjižnico disaharidnih analogov moenomicina. Tako so sintetizirali in preizkusili okrog 1300 analogov in nekatere spojine so se po aktivnosti približale moenomicinu. Sintezni analogi nam lahko zagotovijo boljše vpogled v sam mehanizem delovanja, kar pa posledično omogoča oblikovanje analogov z boljšimi lastnostmi (7).

Inhibitorji, ki se vežejo na substrat (lipid II): zaradi sevov, ki so postali odporni na vankomicin, so bili zasnovani novi lipoglikopeptidni analogi. Gre za N-alkilirane hidrofobne derivate, ki izkazujejo močno protimikrobnou aktivnost. Oritavancin je najmočnejše sredstvo proti vsem na vankomicin odpornim sevom in je v 3. fazi kliničnega testiranja. Dalbavancin je trenutno v predregistracijskem postopku, namenjen bo zdravljenju kožnih okužb. Telavancin je prav tako v 3. fazi kliničnega testiranja, namenjen

bo zdravljenju bolnišničnih pljučnih okužb. Ramoplamin je glikolipodepsipeptid, ki deluje predvsem na G+ bakterije, vključno na MRSA in VRE. Je v 2. fazi kliničnega testiranja, uporabljal se bo za zdravljenje infekcij povezanih s *Clostridium difficile*. Dejstvo je, da se te spojine od vankomicina razlikujejo le po dodatnih hidrofobnih delih molekule in so kljub temu učinkovite proti vankomicin odpornim sevom. Oritavancin in dalbavancin imata večjo možnost dimerizacije in se zaradi tega lažje vežeta na terminalni dipeptid lipida II. Hidrofobne verige lahko delujejo tudi kot membransko sidro, s čimer je molekula v tesnejšem stiku z lipidom II (35).

V zadnjem času se veliko pozornosti posveča majhnim triptaminskim derivatom, ki bi se prav tako vezali na lipid II in s tem zavrlji proces transglikozilacije. Na podlagi strukturno podprtrega virtualnega rešetanja knjižnice iz National Cancer Institute, kristalne strukture GT domene PBP2a iz *S. aureus* in uporabo računalniškega programa eHiTS so prišli do dveh majhnih analogov, spojine 5 in spojine 5b (Slika 11), ki kažeta veliko aktivnost proti različnim G+ bakterijam in omejeno aktivnost proti G- bakterijam (38).



Slika 11: Spojini 5 in 5b.

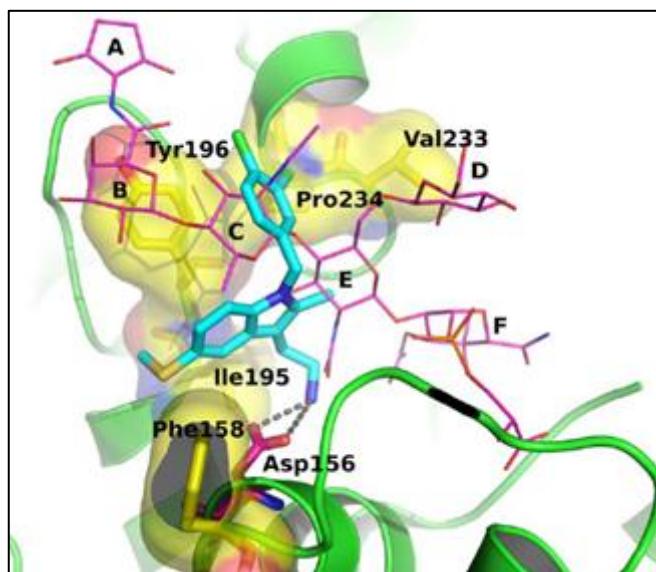
Računalniški program eHiTS nam omogoča identifikacijo aktivnega mesta encima in sidranje spojin v aktivno mesto. Tako iz obsežne knjižnice spojin na podlagi sidranja (prileganje virtualne učinkovine virtualni tarči) dobimo določeno število zadetkov.

Te zadetke so najprej opredelili z aktivnostjo na glikoziltransferazo PBP1b iz *E. coli*, nato pa še na druge PBP, vključno z PBP2 iz *S. aureus* in tako so zmanjšali število spojin za *in vitro* testiranja. Za biokemična testiranja so izbrali 30 najboljših zadetkov. Zaradi omejene topnosti določenih zadetkov se je število testiranih spojin še dodatno zmanjšalo na 21. Aktivnost topnih spojin so preiskušali *in vitro* pri 0,2 in 1mM koncentraciji. Spojinam so najprej merili sposobnost inhibicije PBP1b iz *E. coli* s fluorescenčnim testom, kjer so

določali vezavo spojine na lipid II, ki je bil predhodno fluorescenčno označen. Spojine, ki so inhibirale TG aktivnost in so reagirale s fluorescenčno označenim substratom so dodatno testirali z radioaktivnim testom (radioaktivno označenim substratom). Pri tem so prišli do spojine 5 (Slika 11), ki je inhibirala TG aktivnost z $IC_{50}= 59 \mu\text{M}$. V nadaljevanju so s pomočjo dvodimenzionalne strukture spojine 5 iskali podobne spojine in prišli do spojine 5b (Slika 11), ki je izkazovala dvakrat večjo aktivnost ($IC_{50}= 29 \mu\text{M}$) na PBP1b iz *E. coli* kot spojina 5.

Tako so ugotovili, da obe spojini zavreta glikoziltransferazno reakcijo v μM območju, poleg tega pa spojini 5 in 5b kažeta tudi protibakterijsko aktivnost proti večim pomembnima G+ bakterijam.

Spojini 5 in 5b so v nadaljevanju ovrednotili z različnimi testi. Vezavo spojine 5b v aktivno mesto encima so napovedali s pomočjo eHiTS predikcije. Model kaže, da se spojina 5b (modre barve) delno prekriva s ko-kristalom obročev C in E moenomicina (roza barve), vendar se sidra globlje zaradi dodatnih hidrofobnih interakcij. Moenomicin zaradi svoje hidrofilne narave ne oblikuje hidrofobnih interakcij. Prosta amino skupina spojine 5b tvori dve H-vezi z Asp 156 (Slika 12).



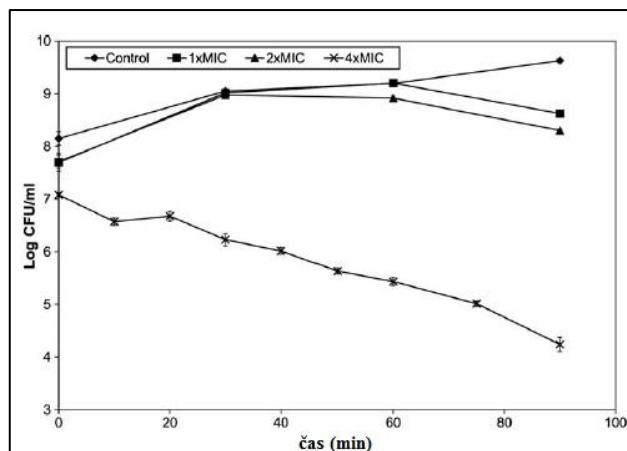
Slika 12: Sidranje spojine 5b v aktivno mesto PBP2 iz *S. aureus* (povzeto po 38).

Za določitev mehanizma delovanja oz. mehanizma inhibicije TG aktivnosti so se poslužili različnih testov. Rezultati modro-belega testa kažejo na interakcijo spojin 5 in 5b z lipidom II. S pomočjo NMR spektrov lipida II v prisotnosti in odsotnosti spojine 5b so dokazali, da je pirofosfatni del lipida II ključnega pomena za nastanek kompleksa med spojino 5b in

lipidom II. Z LIVE/DEAD BacLight™ testom so določali intergiteto celične membrane po 10 minutni inkubaciji s spojino 5b. Ugotovili so, da pri koncentraciji spojine 4xMIC celica ohrani le 33% celovitosti membrane (38).

Zaključili so, da spojini 5 in 5b izkazujeta inhibitorno delovanje po dveh različnih mehanizmih. Neposredno z depolarizacijo celične membrane in posledično s porušenjem njene integritete, ter posredno z inhibicijo biosinteze celične stene.

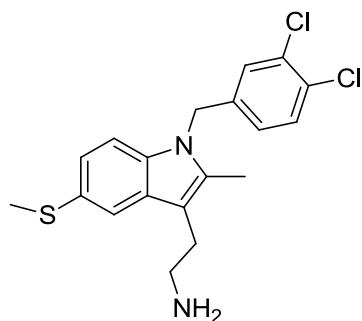
Spojinama 5 in 5b so določili tudi MIC. Spojina 5b je pri testiranju na *S. aureus* dosegla MIC $4\mu\text{g}/\text{ml}$, spojina 5 pa MIC $8\mu\text{g}/\text{ml}$. Pri *E. coli* je bila določena MIC sicer slabša, za spojino 5 je znašala $64\mu\text{g}/\text{ml}$ in za spojino 5b pa $16\mu\text{g}/\text{ml}$. Vzrok temu je najverjetneje dodatna zunanja membrana pri G-bakterijah, ki nam otežuje dostop spojine v citoplazmo. Dokazali so tudi, da spojina 5b pri 4xMIC deluje baktericidno, saj so takoj po dodatku spojine dosegli zmanjšanje števila kolonij, po 120 minutah pa praktično več ni bilo živih kolonij (Slika 13). Podatek, da spojina 5b pri testiranju na *S. aureus* doseže MIC $4\mu\text{g}/\text{ml}$, je zelo obetajoč, saj nam danes največji problem predstavljajo rezistentne bakterije kot je npr. MRSA (38).



Slika 13: Učinek spojine 5b na preživetje *S. aureus* (povzeto po 38).

2. NAČRT DELA

Cilj diplomskega dela je načrtovanje, sinteza in biološko vrednotenje potencialnih inhibitorjev bakterijske glikoziltransferaze. Izhajamo iz nedavno objavljenega članka A. Derouaux in sodelavcev (38), ki so ugotovili, da ustrezeno *N*-substituirani 3-metil-5-metiltiotriptamini zavirajo glikoziltransferazo preko vezave na lipid II in imajo protibakterijsko delovanje. Objavljene spojine so zmerno citotoksične, zato bi s sistematičnimi spremembami spojine vodnice (Slika 14) poskusili ohraniti inhibitorno delovanje na glikoziltransferazo in protimikrobo delovanje, hkrati pa se bi poskusili znebiti citotoksičnega učinka.

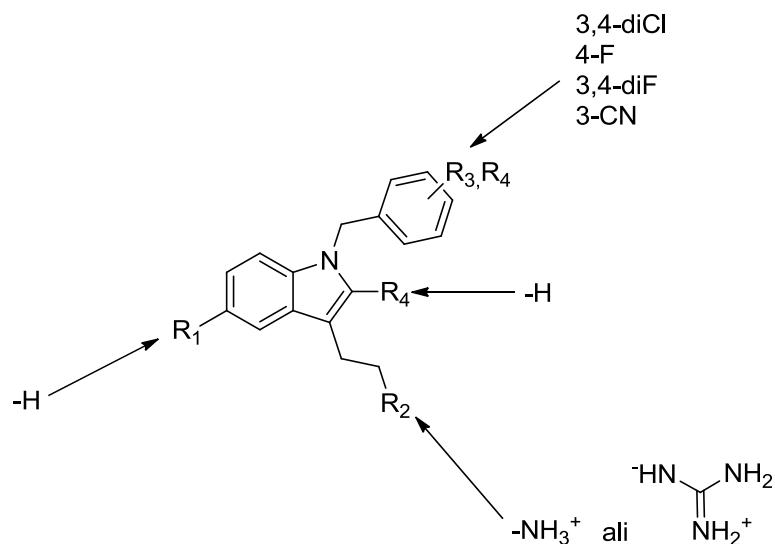


Slika 14: Spojina vodnica.

Spojino vodnico bomo sistematično preoblikovali (Slika 15).

- *-SMe* skupino bomo zamenjali s *-H*. Ugotovili so, da prisotnost *-SMe* v spojini vodi do največje aktivnosti, vendar je njena slabost velika citotoksičnost. Zato bomo slednjo zamenjali *-H*, kar bo primernejše s stališča zmanjšanja citotoksičnosti.
- Bazične skupine v spojini so nujne za vezavo na lipid II. V preliminarnih neobjavljenih rezultatih sinteze in testiranj so na Katedri za farmacevtsko kemijo ugotovili, da so gvanidini primernejši od aminov. Predvidevamo namreč, da amini oz. gvanidini tvorijo ionske interakcije z enim od fosfatov lipida II. Glede na naravo gvanidina je ta nedvomno boljši ligand za fosfatno skupino, saj poleg ionske vezi lahko tvori še dodatne 3 vodikove vezi, kar nedvoumno prispeva k celotni prosti vezavni entalpiji. Sintetizirali bomo tako aminske kot gvanidinske derivate, ter poizkusili dodatno potrditi prej omenjeno ugotovitev na večjem številu sintetiziranih analogov.
- *-CH₃* skupino na mestu 2 indolnega skeleta bomo zamenjali s *-H*. Vpliv te zamenjave zaenkrat še ni bil raziskan.

- Podrobneje želimo raziskati vpliv substituentov na aromatskem delu N-benzilne skupine, saj prav halogeni na aromatskem jedru lahko vplivajo na povečano citotoksičnost spojin.

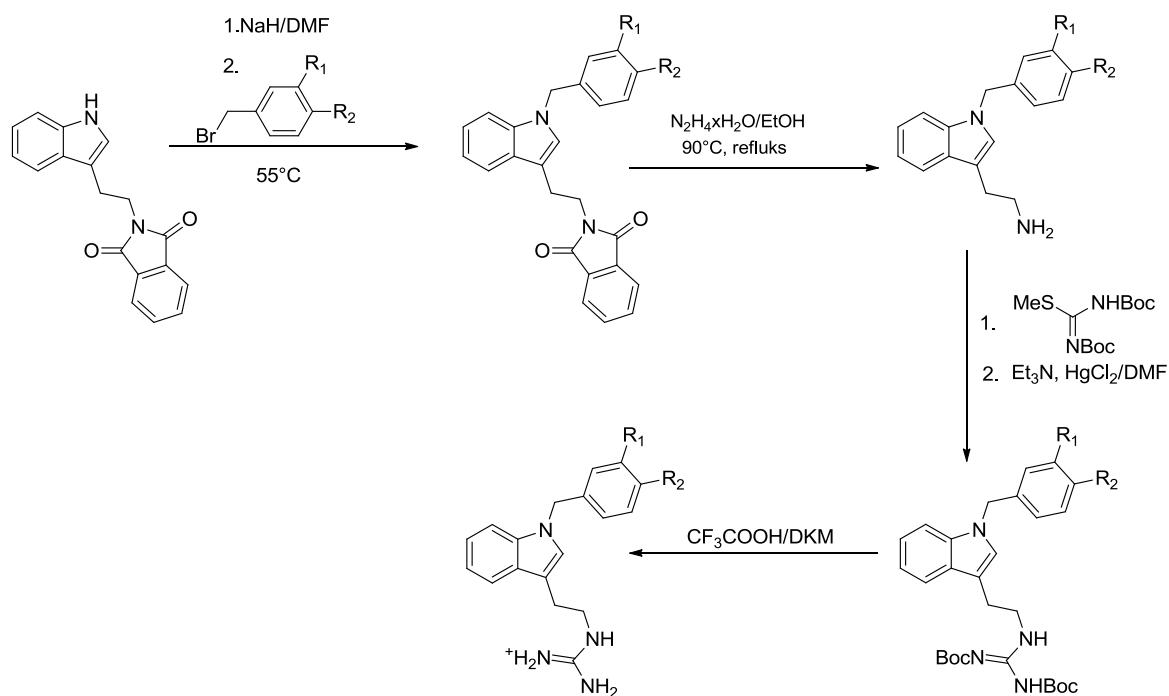
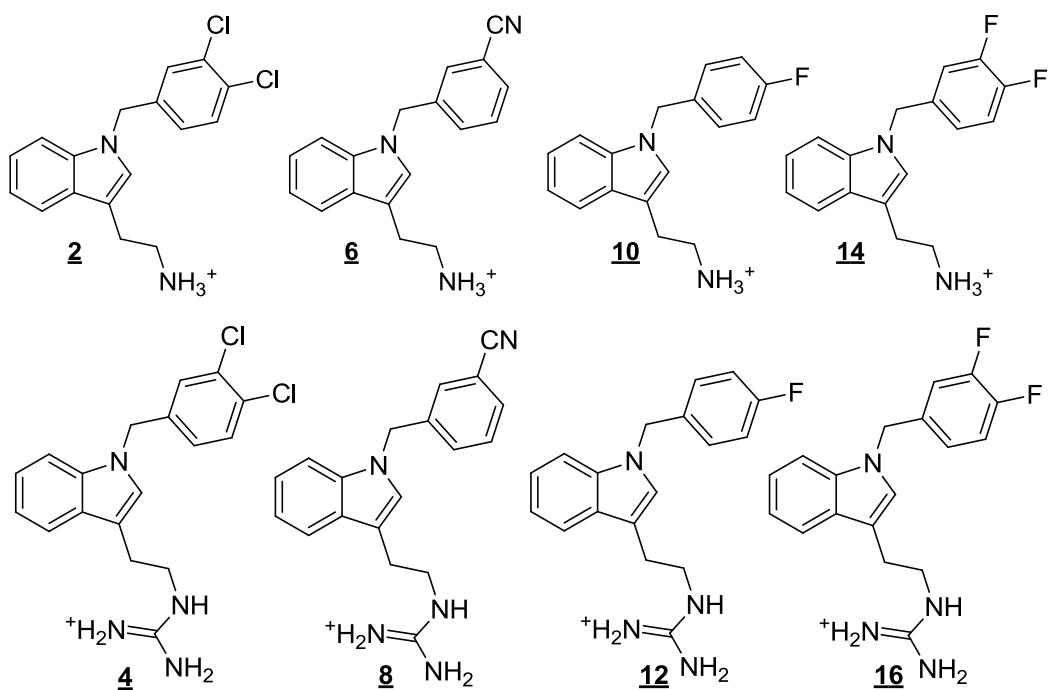


Slika 15: Uvedene spremembe spojine vodnice

Omeniti velja, da vse načrtovane spojine niso bile del le ene diplomske naloge in je delo potekalo hkrati. Dejansko je obseg opravljenega dela bistveno večji in bolj sistematičen, kot je to možno sklepati le iz te diplomske naloge.

V okviru diplomske naloge bomo sintetizirali 8 končnih spojin, kar je predstavljeno na splošni sintezni shemi (Slika 16). Štiri od teh bodo aminski derivati, preostali štirije pa gvanidinski derivati (Slika 17).

Sintetizirane spojine bomo testirali z MTS testom za testiranje citotoksičnosti. Naš namen bo ugotoviti, ali so predlagane zamenjave v strukturi spojine vodnice dejansko pripomogle k zmanjšanju citotoksičnosti. Spojine bodo ovrednotene tudi s testom inhibicije bakterijske glikoziltransferaze in določanja zaviralnega delovanja spojin na rast bakterij, kar izražamo kot minimalne inhibitorne koncentracije (MIC).

**Slika 16:** Splošna sintezna shema.**Slika 17:** Končne spojine za testiranje citotoksičnosti, inhibicije glikoziltransferaze in zaviralnega delovanja na rast bakterij.

3. MATERIALI IN METODE

- **reagenti in topila**

Uporabljali smo kemikalije in topila proizvajalcev Sigma-Aldrich, Fluka, Acros Organics in Merck .

- **programska oprema**

Za risanje struktur in računanje stehiometrijskih razmerij smo uporabljali programski paket ChemBioDraw 12.0 ponudnika CambridgeSoft.

- **kromatografske metode**

Pri izvedbi TLC (tankoplastne kromatografije) smo uporabljali plošče Kiselgel 60 F₂₅₄ izdelovalca Merck z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminjastem nosilcu in dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Za detekcijo lis smo uporabljali UV lučke ($\lambda=254$ nm) in orositveni reagent ninhidrin.

Za čiščenje produktov s kolonsko kromatografijo smo uporabljali silikagel proizvajalca Merck velikosti 0,040 do 0,063 mm za kolonsko "flash" kromatografijo.

- **določanje tališča**

Tališča smo določali na mikroskopu Leica z ogrevalno mizico in so nekorigirana.

- **jedrska magnetna resonanca**

NMR spektre so posneli na spektrometu Bruker Avance DPX 400 s TMS kot internim standardom na Fakulteti za farmacijo in Bruker Avance DPX 300 s TMS kot internim standardom na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopljalji v DMSO-d₆, CDCl₃ in CD₃OD. Za procesiranje FID oblike spektrov smo uporabljali program MestReC proizvajalca MESTRECLAB RESEARCH SL.

- **masna spektrometrija**

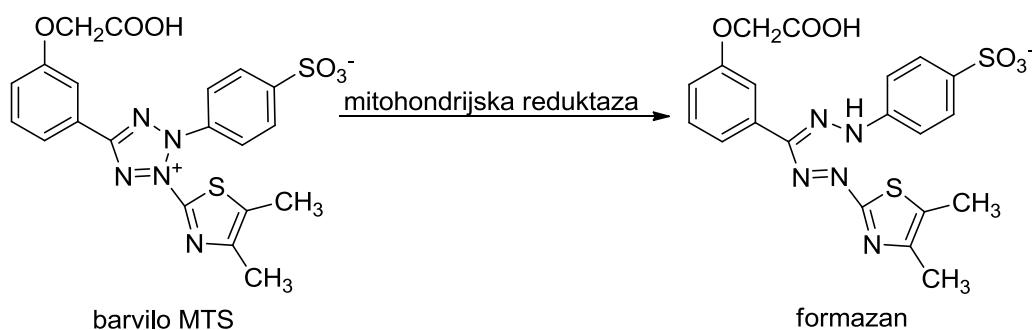
MS spektre so posneli na spektrometu Q-TOF Premier z ESI metodo ionizacije na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

- infrardeča spektroskopija

IR spektre so posneli na spektrofotometrih Perkin Elmer 1600 FT-IR in Nicolet Nexus FT-IR na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

- MTS test

Citotoksičnost so določali z MTS testom na Fakulteti za farmacijo (Katedri za klinično biokemijo), Univerze v Ljubljani. MTS je kolorimetrični test, ki meri aktivnost encimov v živih celicah ozziroma metabolno aktivnih celicah, ki so sposobne reducirati MTS barvilo (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazol) do vijolično obarvanega formazana (Slika 18). Spektrofotometrijsko merimo absorbanco nastalega formazana pri valovni dolžini 490 nm (39).



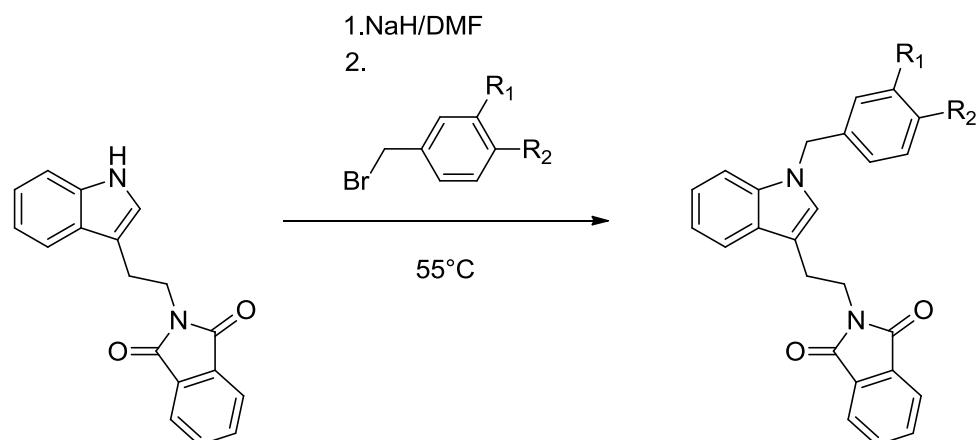
Slika 18: Dokazna reakcija testa za določanje citotoksičnosti.

Iz izmerjene absorbance dobimo količino nastalega formazana, ki pa je sorazmeren s številom metabolno aktivnih celic v kulturi. Žive in metabolno aktivne celice vsebujejo encim (mitohondrijsko reduktazo), ki je sposobna reducirati barvilo MTS do formazana. S tem testom torej merimo odstotek metabolne aktivnosti PBMC celic (mononuklearne celice periferne krvi). S pomočjo te meritve naredimo vzporednico s sposobnostjo preživetja celic. Slabost tega testa je, da toksična substanca lahko celice spremeni oziroma jim okvari encim, ki je odgovoren za redukcijo barvila. Tako dobimo negativne rezultate testiranja, celice pa kljub temu preživijo. Kljub tej slabosti test daje dobre preliminarne rezultate testiranja citotoksičnosti (39).

4. EKSPERIMENTALNO DELO

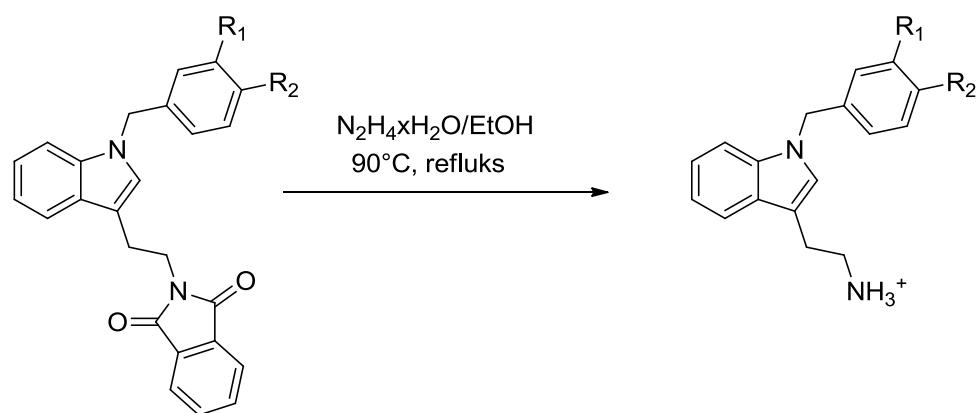
4.1 REAKCIJSKE SHEME

4.1.1 Alkiliranje (indolnega dušika) triptamina z različno substituiranimi benzilbromidi



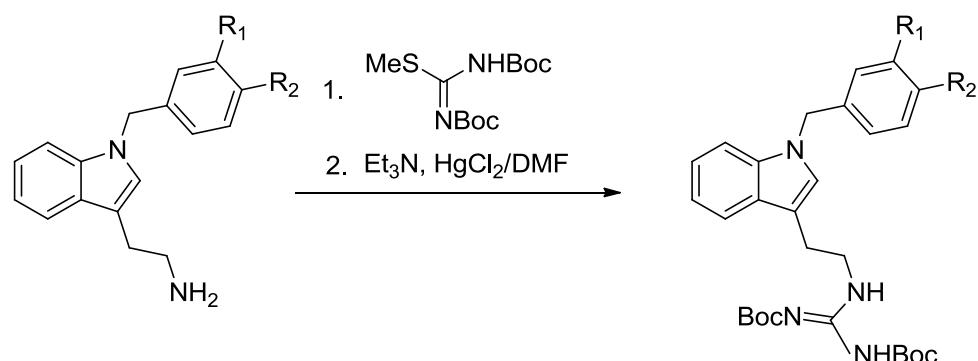
R ₁ =	R ₂ =	spojina
-Cl	-Cl	1
-CN	-H	5
-H	-F	9
-F	-F	13

4.1.2 Odščita ftalimidne zaščite s hidrazinolizo



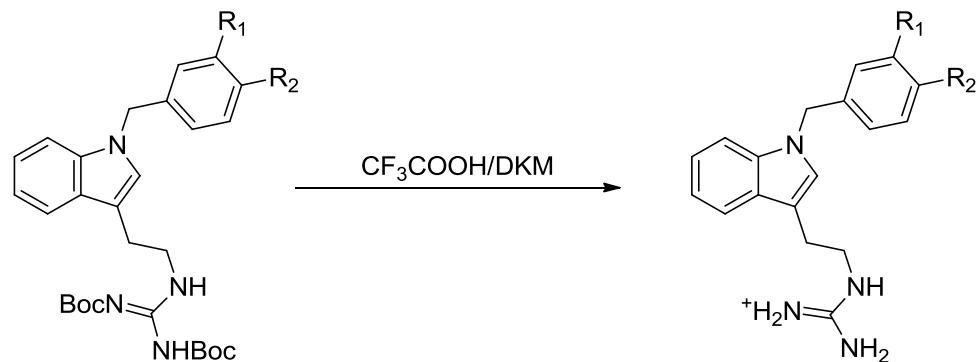
R ₁ =	R ₂ =	spojina
-Cl	-Cl	2
-CN	-H	6
-H	-F	10
-F	-F	14

4.1.3 Sinteza različno substituiranih gvanidinov (nukleofilna substitucija med *N,N'*-di(tercbutoksikarbonil)-S-metilizotiosečnino in triptaminom)



$\text{R}_1 =$	$\text{R}_2 =$	spojina
-Cl	-Cl	<u>3</u>
-CN	-H	<u>7</u>
-H	-F	<u>11</u>
-F	-F	<u>15</u>

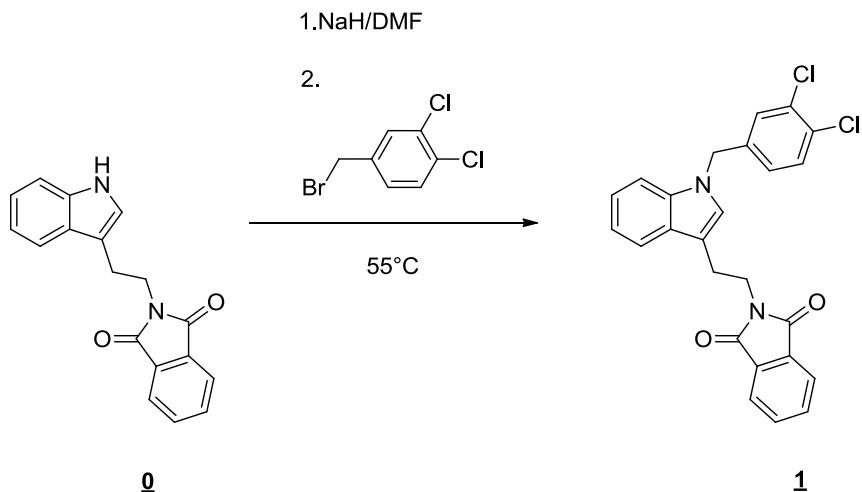
4.1.4 Odščita Boc zaščite z acidolizo



$\text{R}_1 =$	$\text{R}_2 =$	spojina
-Cl	-Cl	<u>4</u>
-CN	-H	<u>8</u>
-H	-F	<u>12</u>
-F	-F	<u>16</u>

4.2. SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ

4.2.1 Síntese 2-(2-(1-(3,4-diklorobenzil)-1*H*-indol-3-il)etil)izoindolin-1,3-diona (1)



V suspenzijo NaH (0,03 g, 60% (m/m) v tekočem parafinu, 0,83 mmol) v brezvodnem DMF po kapljicah dodajamo raztopino izhodne spojine **1** (0,20 g, 0,69 mmol) v brezvodnem DMF. Reakcijsko zmes pustimo mešati pri sobni temperaturi 30 minut. Nato vanjo dodamo raztopino 3,4-diklorobenzilbromida (0,20 g, 0,83 mmol) v brezvodnem DMF in pustimo mešati pri 55°C čez noč. Za izvedbo same reakcije so potrebni brezvodni pogoji, zato reakcijo izvajamo pod argonovo atmosfero. Po poteku reakcije, reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo, topilo odparimo z rotavaporjem, zaostanek pa raztopimo v 40 ml EtOAc. Prenesemo v lij ločnik in organsko fazo spiramo s 3 x 20 ml destilirane vode, 1 x 20 ml nasičene raztopine NaHCO₃ in 1 x 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, odfiltriramo sušilno sredstvo in z rotavaporjem odparimo topilo. Produkt čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=1/3 (V/V).

Opis: rumena snov amorfne oblike

η : 24%

R_f: EtOAc/heksan=1/3 (V/V), 0,38

T_{tal.}: 163-165°C

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ= 3,06 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz, -CH₂CH₂N-), 3,87 (t, 2H, *J* = 7,2 Hz, -CH₂CH₂N-), 5,36 (s, 2H, -NCH₂C₆H₃Cl₂), 6,99-7,03 (m, 2H, C(4)H-indol +

C(6)H-indol), 7,07-7,11 (ddd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 7,0$ Hz, $J_3 = 1,0$ Hz, C(5)H-indol), 7,35 (s, 1H, C(2)H-indol), 7,38-7,40 (m, 1H, C(6)H-C₆H₃Cl₂), 7,44 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, C(2)H-C₆H₃Cl₂), 7,50 (d, 1H, $J = 8,3$ Hz, C(5)H-C₆H₃Cl₂), 7,57-7,59 (m, 1H, C(7)H-indol), 7,83-7,84 (m, 4H, C₆H₄-ftalimid) ppm.

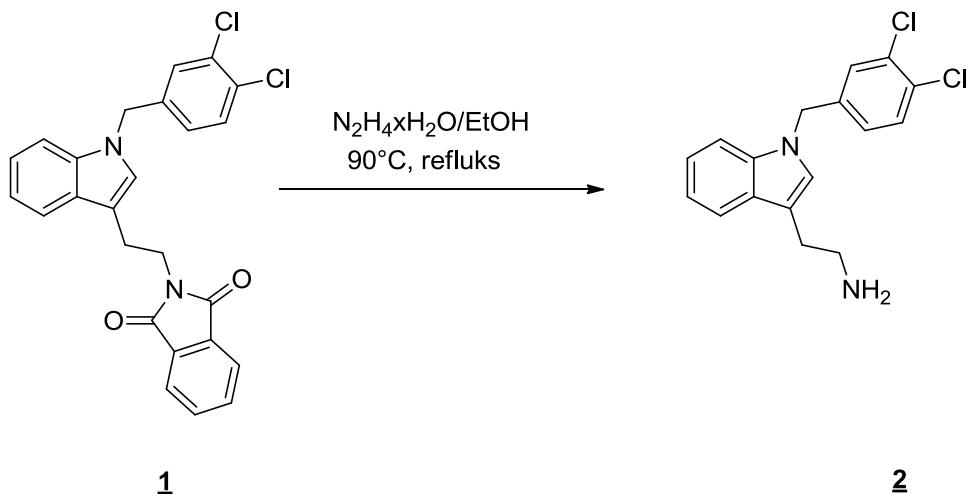
¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ= 24.33, 38.50, 48.87, 109.42, 112.23, 119.28, 119.58, 122.24, 123.19, 125.92, 126.02, 128.23, 128.65, 130.76, 131.65, 132.14, 132.89, 133.90, 136.40, 137.93, 168.34 ppm.

IR v(max) = 3448, 3055, 2944, 2370, 2346, 1793, 1767, 1752, 1734, 1707, 1467, 1449, 1431, 1397, 1376, 1361, 1320, 1288, 1255, 1243, 1210, 1178, 1131, 1110, 1086, 1016, 987, 970, 870, 847, 834, 789, 777, 747, 720, 712, 610, 528, 504, 464 cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES+): 449,1 (MH⁺)

HRMS: izračunano (za C₂₅H₁₉N₂O₂Cl₂) 449,0824; izmerjeno 449,0829 (1,3 ppm).

4.2.2 Sinteza 2-(1-(3,4-diklorobenzil)-1*H*-indol-3-il)etanamina (**2**)



V bučko natehtamo spojino **1** (0,90 g, 2,00 mmol) in jo raztopimo v 35 ml EtOH. Postopoma po kapljicah dodamo 5 ekv. hidrazina (0,92 ml, 35% (m/m), 10,02 mmol). Reakcijsko zmes pustimo mešati čez noč pri 90°C pod refluksom. Po poteku reakcije vidimo, da nam izпадa oborina. To previdno odfiltriramo s pomočjo teflonskega filtra in presesalne erlenmajerice. Naredimo TLC iz katerega vidimo, da se spojina nahaja v oborini, delno pa tudi v matičnici. Oborino posušimo v vakumu z membransko črpalko, preostanek surovega produkta iz matičnice pa čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo DKM/MeOH=9/1 (V/V) +1% TEA. Združimo zaostanek produkta iz oborine, z zaostankom produkta iz matičnice. Raztopimo ga v 50 ml EtOAc. Prenesemo v lij ločnik

in spiramo organsko fazo z 1 x 25 ml destilirane vode. Vodno fazo med ekstrakcijo večkrat naalkalimo z 1M NaOH dokler ne dosežemo pH vodne faze 11-12. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, odfiltriramo sušilno sredstvo in z rotavaporjem odparimo topilo. Spojino pretvorimo še v hidroklorid. Zaostanek po zadnjem rotavapiranju raztopimo v 5 ml absolutnega EtOH, dodamo 3 ekv. 1M HCl/EtOH, katero smo predhodno pripravili *in situ*. Ponovno odparimo topilo. Oljnato tekočino, ki jo dobimo po koncu rotavapiranja, trituiramo z 10 ml EtOEt dokler izpada bela oborina, katero sušimo 1 h v vakumu z membransko črpalko.

Opis: beli igličasti kristali

η : 81%

R_f : DKM/MeOH=9/1 (V/V) + 1% TEA, 0,36

T_{tal} : 203-206°C

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ = 1,44 (s, 2H, -CH₂CH₂NH₂), 2,94 (t, 2H, J = 6,8 Hz, -CH₂CH₂NH-), 3,07 (t, 2H, J = 6,8 Hz, -CH₂CH₂N-), 5,25 (s, 2H, -NCH₂C₆H₃Cl₂), 6,91-6,93 (m, 1H, C(4)H-indol), 6,97 (s, 1H, C(2)H-indol), 7,11-7,15 (ddd, 1H, J₁ = 7,8 Hz, J₂ = 4,4 Hz, J₃ = 3,6 Hz, C(5)H-indol), 7,19-7,20 (m, 2H, C(6)H-C₆H₃Cl₂ + C(7)H-indol), 7,22 (d, 1H, J = 2,0 Hz, C(2)H-C₆H₃Cl₂), 7,35 (d, 1H, J = 8,4 Hz, C(5)H-C₆H₃Cl₂), 7,63-7,65 (ddd, 1H, J₁ = 7,8 Hz, J₂ = 1,0 Hz, J₃ = 0,8 Hz, C(6)H-indol) ppm.

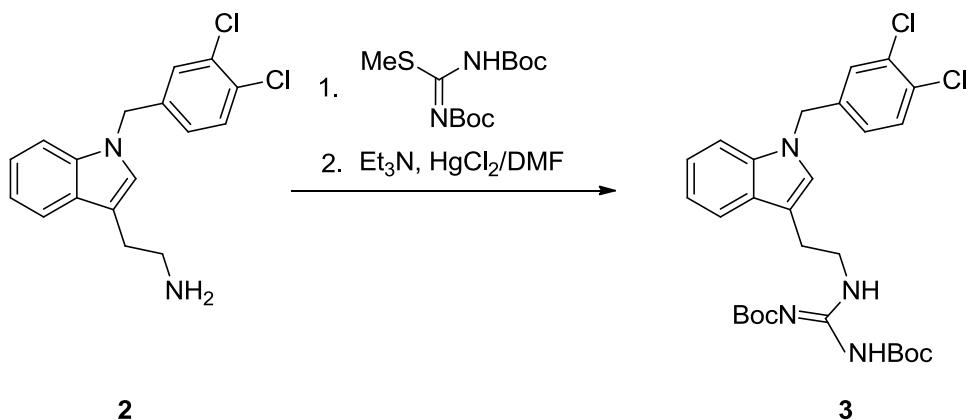
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ = 22.89, 40.10, 47.72, 110.0, 110.12, 118.65, 119.01, 121.66, 127.05, 127.43, 129.10, 129.90, 130.71, 131.05, 135.96, 139.45 ppm.

IR v(max) = 3420, 3030, 2896, 2597, 2468, 2057, 1612, 1600, 1560, 1550, 1534, 1511, 1481, 1469, 1441, 1401, 1378, 1352, 1336, 1271, 1256, 1205, 1177, 1147, 1130, 1116, 1030, 1014, 978, 963, 926, 886, 870, 831, 820, 790, 744, 736, 697, 628, 480, 466 cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES+): 319,1 (22%), 302,0 (100%)

HRMS: izračunano (za C₁₇H₁₇N₂Cl₂) 319,0769; izmerjeno 319,0780 (3,4 ppm).

4.2.3 Sinteza *terc*-butil (1-((2-(1-(3,4-diklorobenzil)-1*H*-indol-3-il)etil)amino)etiliden)karbamata (3)



V bučko natehtamo spojino **2** (0,30 g, 0,94 mmol) in jo raztopimo v 10 ml DMF. Dodamo *N,N'*-di-(*terc*-butoksikarbonil)-*S*-metilizotiosečnino (0,27 g, 0,94 mmol), Et₃N (0,26 ml, 1,88 mmol) in HgCl₂ (0,26 g, 0,94 mmol) v navedenem zaporedju. Reakcijsko zmes pustimo mešati pri sobni temperaturi čez noč. Po poteku reakcije najprej s pomočjo presesalne erlenmajerice odfiltriramo nastalo neraztopljeno sol Hg(SMe)Cl. Filtratu odparimo topilo z rotavaporjem, zaostanek pa raztopimo v 20 mL EtOEt. Prenesemo v lijločnik in spiramo organsko fazo s 3 x 10 ml destilirane vode, 1 x 10 ml z nasičeno raztopino NaHCO₃ in 1 x 10 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, odfiltriramo sušilno sredstvo in z rotavaporjem odparimo topilo. Produkt čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=1/5 (V/V).

Opis: bela snov amorfne oblike

η : 63%

R_f: EtOAc/heksan=1/5 (V/V), 0,34

T_{tal} : 149-153°C

¹H NMR (300MHz, CDCl₃): δ= 1,47 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃), 1,53 (s, 9H, =NCOOC(CH₃)₃), 3,06 (t, 2H, J = 7,0 Hz, -CH₂CH₂N-), 3,7 (t, 2H, J = 7,0 Hz, -CH₂CH₂NH-), 5,24 (s, 2H, -NCH₂C₆H₃Cl₂), 6,88-6,92 (dd, 1H, J₁ = 8,3 Hz, J₂ = 2,1 Hz, C(6)H-C₆H₃Cl₂), 7,02 (s, 1H, C(2)H-indol), 7,12-7,18 (m, 1H, C(5)H-indol), 7,19-7,21 (m, 2H, C(2)H-C₆H₃Cl₂ + C(6)H-indol), 7,36 (d, 1H, J = 8,3 Hz, C(5)H-C₆H₃Cl₂), 7,66-7,69 (m, 1H, C(7)H-indol), 8,44 (t, 1H, J = 6,1 Hz, -CH₂CH₂NH-), 11,49 (s, 1H, -NH₂Boc) ppm.

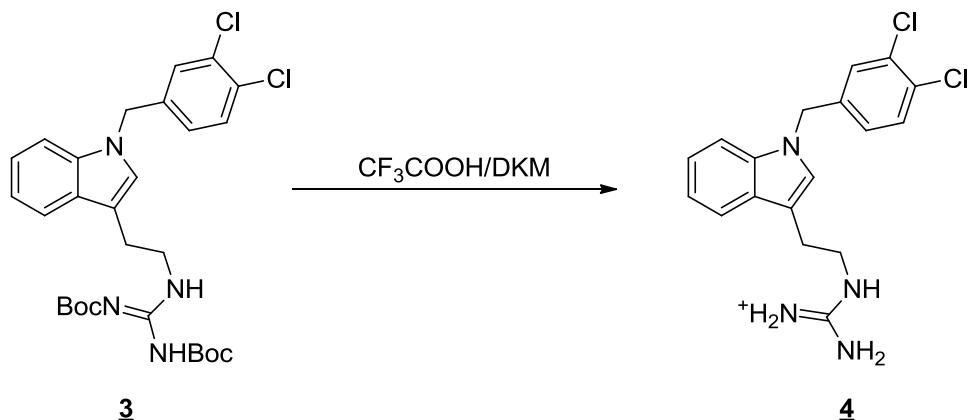
^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): $\delta = 24.82, 27.98, 28.29, 41.04, 48.91, 79.20, 82.90, 109.44, 112.46, 119.23, 119.45, 122.21, 126.00, 126.09, 128.05, 128.61, 130.79, 131.61, 132.82, 136.49, 137.87, 153.12, 156.04, 163.62 \text{ ppm}.$

IR $\nu(\text{max})$ = 3348, 3333, 3087, 2981, 2931, 2363, 2345, 1719, 1684, 1637, 1617, 1508, 1472, 1449, 1433, 1412, 1389, 1373, 1328, 1284, 1251, 1229, 1155, 1136, 1104, 1062, 1032, 1021, 1004, 876, 853, 810, 798, 766, 746, 687, 622, 611, 464 cm^{-1} .

MS m/z (TOF MS ES+): 561,2 (MH^+)

HRMS: izračunano (za $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_4\text{Cl}_2$) 561,2035; izmerjeno 561,2038 (0,5 ppm).

4.2.4 Sinteza 1-(2-(1-(3,4-diklorobenzil)-1*H*-indol-3-il)etil)gvanidina (4)



V bučko natehtamo spojino **3** (0,19 g, mmol) in jo raztopimo v 5 ml brezvodnega DKM. Bučko zatesnimo s septumom ter prepihamo sistem z argonom. Z iglo previdno po kapljicah dodamo 2 ml 97% CF_3COOH . Reakcijsko zmes pustimo mešati pri sobni temperaturi čez noč. Ko reakcija poteče, odparimo topilo z rotavaporjem. Spojino pretvorimo še v hidroklorid. Zaostanek po rotavapiranju raztopimo v 5 ml absolutnega EtOH, dodamo 3 ekv. 1M HCl/EtOH, katero smo predhodno pripravili *in situ*. Ponovno odparimo topilo. Oljnato tekočino, ki jo dobimo po koncu rotavapiranja trituriramo z 10 ml EtOEt dokler izpada bela oborina, katero sušimo 1 h v vakumu z membransko črpalko.

Opis: rjava snov amorfne oblike

η : 100%

R_f : EtOAc/heksan= 1/1 (V/V), 0,76

^1H NMR (300MHz, DMSO- d_6): $\delta = 2.93$ (t, 2H, $J = 7,1 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}-$), 3,44 (t, 2H, $J = 7,1 \text{ Hz}$, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}-$), 5,40 (s, 2H, $-\text{NCH}_2\text{C}_6\text{H}_3\text{Cl}_2$), 7,02-7,04 (m, 1H, C(5)H- indol),

7,07-7,10 (dd, 1H, $J_1 = 9,4$ Hz, $J_2 = 1,0$ Hz, C(4)H-indol), 7,11-7,15 (m, 2H, C(5)H-indol + C(6)H-C₆H₃Cl₂), 7,39 (s, 1H, C(2)H-indol), 7,43 (d, 1H, $J = 8,1$ Hz, C(7)H-indol), 7,51 (d, 1H, $J = 2,0$ Hz, C(2)H-C₆H₃Cl₂), 7,56-7,61 (m, 2H, C(5)H-C₆H₃Cl₂ + H-gvanidin), 7,72 (t, 1H, $J = 5,4$ Hz, -CH₂CH₂NH-) ppm.

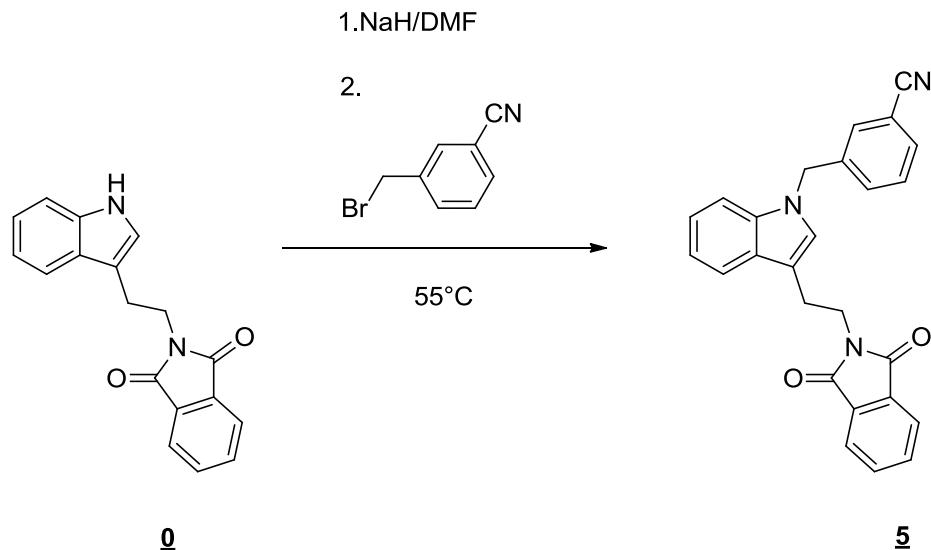
¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆): δ= 24.32, 41.27, 47.68, 110.01, 111.05, 118.79, 118.90, 121.55, 127.00, 127.35, 127.63, 129.04, 129.87, 130.76, 131.04, 135.86, 139.52, 156.94 ppm.

IR v(max) = 3337, 3153, 2370, 2346, 1664, 1654, 1648, 1508, 1498, 1467, 1438, 1398, 1379, 1332, 1251, 1202, 1178, 1132, 1050, 1030, 969, 871, 812, 802, 778, 742, 722, 687, 670, 594, 519, 467 cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES+): 361,1 (MH⁺)

HRMS: izračunano (za C₁₈H₁₉N₄Cl₂) 361,0987; izmerjeno 361,0985 (-0,6 ppm).

4.2.5 Sinteza 3-((3-(2-(1,3-dioksoisoindolin-2-il)ethyl)-1H-indol-1-il)metil)benzonitrila (5)



V suspenzijo NaH (0,16 g, 60% (m/m) v tekočem parafinu, 0,41 mmol) v brezvodnem DMF po kapljicah dodajamo raztopino izhodne spojine **0** (1,00 g, 3,43 mmol) v brezvodnem DMF. Reakcijsko zmes pustimo mešati pri sobni temperaturi 30 minut. Nato vanjo dodamo α -bromo-*m*-tolunitrila (0,81 g, 0,41 mmol) raztopljen v brezvodnem DMF. Reakcijsko zmes pustimo mešati pri 55°C čez noč. Za izvedbo same reakcije so potrebni brezvodni pogoji, zato reakcijo izvajamo pod argonovo atmosfero. Po poteku reakcije reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo, topilo odparimo z rotavaporjem,

zaostanek pa raztopimo v 40 ml EtOEt. Prenesemo v lij ločnik in spiramo organsko fazo s 3 x 20 ml destilirane vode, 1 x 20 ml nasičene raztopine NaHCO₃ in 1 x 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, odfiltriramo sušilno sredstvo in z rotavaporjem odparimo topilo. Sledi prekristalizacija iz EtOH (20 ml). Preostanek surovega produkta iz matičnice čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo toluen/EtOAc=9/1 (V/V).

Opis: rumena snov amorfne oblike

η : 35%

R_f : toluen/EtOAc=9/1 (V/V), 0,4

T_{tal} : 137-140°C

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ= 3,06 (t, 2H, J = 7,2 Hz, -CH₂CH₂N-), 3,87 (t, 2H, J = 7,2 Hz, -CH₂CH₂N-), 5,41 (s, 2H, -NCH₂C₆H₄CN), 6,99-7,03 (m, 1H, C(5)H-indol), 7,07-7,10 (m, 1H, C(6)H-indol), 7,34-7,39 (m, 2H, C(4)H-indol + C(7)H-indol), 7,37 (s, 1H, C(2)H-indol), 7,47 (t, 1H, J = 7,7 Hz, C(5)H-C₆H₄CN), 7,57-7,59 (m, 1H, C(6)H-C₆H₄CN), 7,63-7,64 (m, 1H, C(2)H-C₆H₄CN), 7,70-7,73 (m, 1H, C(4)H-C₆H₄CN), 7,81-7,87 (m, 4H, C₆H₄-ftalimid) ppm.

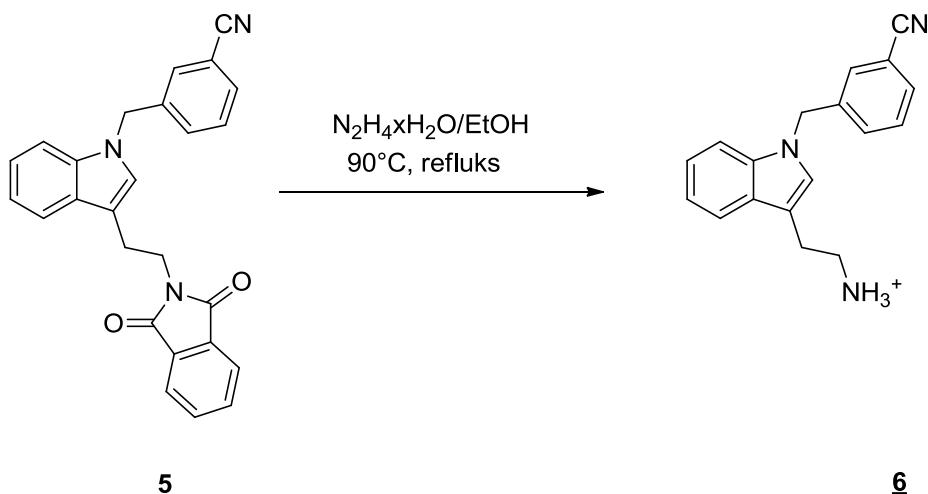
¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ= 24.32, 38.55, 49.17, 109.33, 112.46, 112.98, 119.33, 119.67, 122.32, 123.19, 125.90, 128.31, 129.62, 130.09, 130.96, 131.36, 132.15, 133.91, 136.35, 139.31, 168.34 ppm.

IR v(max) = 3448, 2926, 2229, 1763, 1706, 1467, 1430, 1399, 1364, 1174, 1086, 1016, 991, 870, 793, 712, 530 cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES+): 406,2 (MH⁺)

HRMS: izračunano (za C₂₆H₂₀N₃O₂) 406,1556; izmerjeno 406,1550 (-1,5 ppm).

4.2.6 Sinteza 3-((3-(2-aminoetil)-1*H*-indol-1-il)metil)benzonitrila (**6**)



V bučko natehtamo spojino **5** (0,70 g, 1,73 mmol) in jo raztopimo v 35 ml EtOH. Postopoma po kapljicah dodamo 5 ekv. hidrazina (0,79 ml, 35% (m/m), 8,63 mmol). Reakcijsko zmes pustimo mešati čez noč pri 90°C pod refluksom. Po poteku reakcije vidimo, da nam izpade oborina. To previdno odfiltriramo s pomočjo teflonskega filtra in presesalne erlenmajerice. Naredimo TLC iz katerega vidimo, da se naša spojina nahaja v oborini, delno pa tudi v matičnici. Oborino posušimo v vakumu z membransko črpalko, preostanek surovega produkta iz matičnice pa čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo DKM/MeOH=9/1 (V/V) +1%TEA. Združimo zaostanek produkta iz oborine z zaostankom produkta iz matičnice. Raztopimo ga v 50 ml EtOAc. Prenesemo v ljiljančnik in spiramo organsko fazo z 1 x 25 ml destilirane vode. Vodno fazo med ekstrakcijo večkrat naalkalimo z 1M NaOH dokler ne dosežemo pH vodne faze 11-12. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, odfiltriramo sušilno sredstvo in z rotavaporjem odparimo topilo. Spojino pretvorimo še v hidroklorid. Zaostanek po zadnjem rotavapiranju raztopimo v 5 ml absolutnega EtOH, dodamo 3 ekv. 1M HCl/EtOH, katero smo predhodno pripravili *in situ*. Ponovno odparimo topilo. Oljnato tekočino, ki jo dobimo po koncu rotavapiranja trituiramo z 10 ml EtOEt dokler izpada bela oborina, katero sušimo 1 h v vakumu z membransko črpalko.

Opis: rjava snov amorfne oblike

η : 74 %

R_f : DKM/MeOH=9/1 (V/V) +1%TEA, 0,3

T_{tal} : 207-209°C

^1H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ = 3,05-3,07 (m, 4H, -CH₂CH₂NH-), 5,46 (s, 2H, -NCH₂C₆H₄CN), 7,04-7,08 (ddd, 1H, J_1 = 8,0 Hz, J_2 = 7,5 Hz, J_3 = 1,1 Hz, C(5)H-indol), 7,12-7,16 (ddd, 1H, J_1 = 8,0 Hz, J_2 = 7,2 Hz, J_3 = 1,1 Hz, C(6)H-indol), 7,43-7,45 (m, 2H, C(2)H-indol + C(5)H-C₆H₄CN), 7,53-7,54 (m, 2H, C(4)H-indol + C(2)H-C₆H₄CN), 7,61-7,63 (dd, 1H, J_1 = 7,5 Hz, J_2 = 1,1 Hz, C(7)H-indol), 7,72-7,75 (m, 2H, C(4)H-C₆H₄CN + C(6)H-C₆H₄CN), 8,12 (s, 3H, -CH₂CH₂NH₃⁺) ppm.

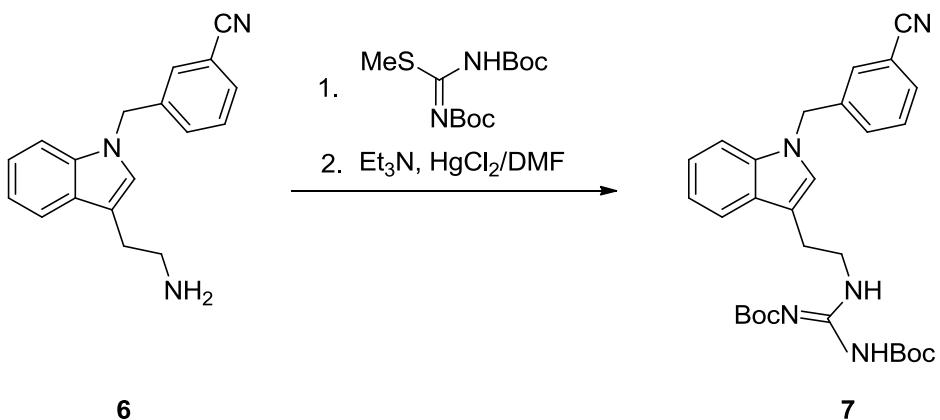
^{13}C NMR (100MHz, DMSO-d₆): δ = 29,40, 42,58, 47,99, 109,87, 111,35, 113,10, 118,65, 118,84, 121,33, 126,39, 128,00, 129,82, 130,54, 131,12, 131,87, 135,90, 140,15 ppm.

IR v(max) = 3448, 2930, 2228, 1623, 1466, 1354, 1188, 794, 738 cm⁻¹

MS m/z (TOF MS ES+): 276,1 (MH⁺)

HRMS: izračunano (za C₁₈H₁₈N₃) 276,1501; izmerjeno 276,1511 (3,6 ppm).

4.2.7 Sinteza *terc*-butil (1-((2-(1-(3-cianobenzil)-1*H*-indol-3-il)ethyl)amino)etiliden)karbamata (7)



V bučko natehtamo spojino **6** (0,34 g, 1,24 mmol) in jo raztopimo v 10 ml DMF. Dodamo ji *N,N'*-di-(*terc*-butoksikarbonil)-*S*-metilizotiosečnino (0,36 g, 1,24 mmol), Et₃N (0,34 ml, 2,45 mmol) in HgCl₂ (0,34 g, 1,24 mmol) v navedenem zaporedju. Reakcijsko zmes pustimo mešati pri sobni temperaturi čez noč. Po poteku reakcije najprej s pomočjo presesalne erlenmajerice odfiltriramo nastalo neraztopljeno sol Hg(SMe)Cl. Filtratu odparimo topilo z rotavaporjem, zaostanek pa raztopimo v 20 ml EtOEt. Prenesemo v lij ločnik in spiramo organsko fazo s 3 x 10 ml destilirane vode, 1 x 10 ml nasičene raztopine NaHCO₃ in 1 x 10 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄,

odfiltriramo sušilno sredstvo in z rotavaporjem odparimo topilo. Produkt čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=1/3 (V/V).

Opis: brezbarvna oljnata tekočina

η : 33%

R_f : EtOAc/heksan=1/3 (V/V), 0,31

1H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ = 1,42 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃), 1,45 (s, 9H, =NCOOC(CH₃)₃), 2,95 (t, 2H, J = 7,2 Hz, -CH₂CH₂N-), 3,60 (t, 2H, J = 7,2 Hz, -CH₂CH₂NH-), 5,44 (s, 2H, -NCH₂C₆H₄CN), 7,00-7,04 (ddd, 1H, J_1 = 8,1 Hz, J_2 = 7,5 Hz, J_3 = 1,0 Hz, C(5)H- indol), 7,09-7,13 (ddd, 1H, J_1 = 7,7 Hz, J_2 = 7,0 Hz, J_3 = 1,0 Hz, C(6)H- indol), 7,39 (s, 1H, C(2)H-indol), 7,41 (d, 1H, J = 8,1 Hz, C(4)-indol), 7,44-7,47 (ddd, 1H, J_1 = 8,0 Hz, J_2 = 1,7 Hz, J_3 = 1,7 Hz, C(4)H-C₆H₄CN), 7,50 (t, 1H, J = 7,5 Hz, C(5)H-C₆H₄CN), 7,70 (t, 1H, J = 1,1 Hz, C(2)H-C₆H₄CN), 7,72-7,74 (ddd, 1H, J_1 = 7,5 Hz, J_2 = 1,7 Hz, J_3 = 1,7 Hz, C(6)H-C₆H₄CN), 7,75 (d, 1H, J = 7,7 Hz, C(7)-indol), 8,46 (t, 1H, J = 5,6 Hz, -CH₂CH₂NH-), 11,51 (s, 1H, -NH₂Boc) ppm.

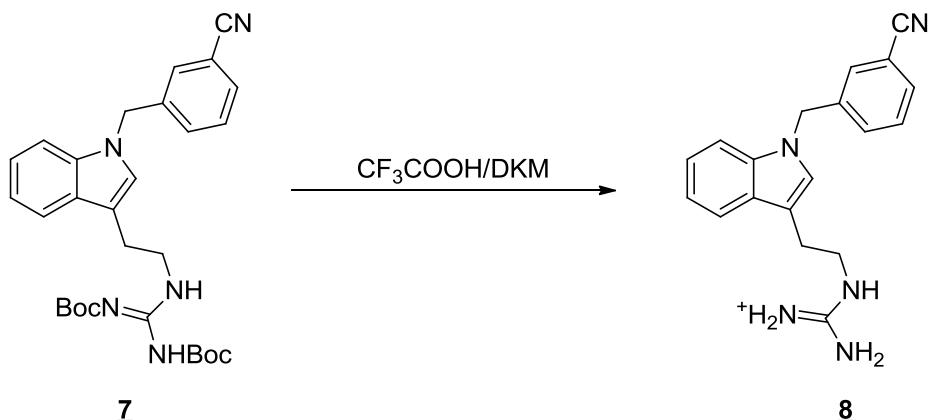
^{13}C NMR (100MHz, DMSO-d₆): δ = 24.46, 27.56, 27.98, 40.81, 48.06, 78.04, 82.79, 109.89, 111.39, 111.68, 118.62, 118.79, 119.21, 121.56, 126.58, 127.81, 129.79, 130.53, 131.14, 131.80, 135.95, 140.05, 151.94, 155.19, 163.12 ppm.

IR v(max) = 3345, 3133, 2979, 2927, 2228, 1726, 1640, 1616, 1571, 1470, 1434, 1417, 1362, 1332, 1286, 1234, 1164, 1122, 1072, 1060, 1040, 1017, 1000, 932, 879, 851, 812, 798, 772, 747, 686, 629, 614 cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES+): 518,3 (MH⁺)

HRMS: izračunano za (C₂₉H₃₆N₅O₄) 518,2767; izmerjeno 518,2769 (0,4 ppm).

4.2.8 Sinteza 1-(2-(1-(3-cianobenzil)-1*H*-indol-3-il)etil)gvanidina (**8**)



V bučko natehtamo spojino **7** (0,20 g, mmol) in jo raztopimo v 15 ml brezvodnega DKM. Bučko zatesnimo s septumom ter prepihamo sistem z argonom. Z iglo previdno po kapljicah dodamo 3 ml 97% CF_3COOH . Reakcijsko zmes pustimo mešati pri sobni temperaturi čez noč. Ko reakcija poteče, odparimo topilo z rotavaporjem. Spojino pretvorimo še v hidroklorid. Zaostanek po rotavapiranju raztopimo v 5 ml absolutnega EtOH, dodamo 3 ekv. 1M HCl/EtOH, katero smo predhodno pripravili *in situ*. Ponovno odparimo topilo. Oljnato tekočino, ki jo dobimo po koncu rotavapiranja trituriramo z 10 ml EtOEt dokler izpada bela oborina, katero sušimo 1 h v vakumu z membransko črpalko.

Opis: brezbarvna oljnata tekočina

η : 81%

R_f : DKM/MeOH=4/1 (V/V) +1% TEA, 0,54

$^1\text{H NMR}$ (300MHz, DMSO- d_6): $\delta = 2,93$ (t, 2H, $J = 7,1$ Hz, -CH₂CH₂N-), 3,44 (t, 2H, $J = 7,1$ Hz, -CH₂CH₂N-), 5,45 (s, 2H, -NCH₂C₆H₄CN), 7,03-7,07 (m, 1H, C(5)H-indol), 7,11-7,1 (m, 1H, C(6)H-indol), 7,42 (s, 1H, C(2)H-indol), 7,45 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz, C(4)-indol), 7,48-7,50 (m, 1H, C(4)H-C₆H₄CN), 7,53 (t, 1H, $J = 7,7$ Hz, C(5)H-C₆H₄CN), 7,60 (d, 1H, $J = 7,7$ Hz, -CH₂CH₂NH-), 7,67-7,7 (m, 1H, C(6)H-C₆H₄CN), 7,71-7,75 (m, 2H, C(7)H-indol + C(6)H-C₆H₄CN) ppm.

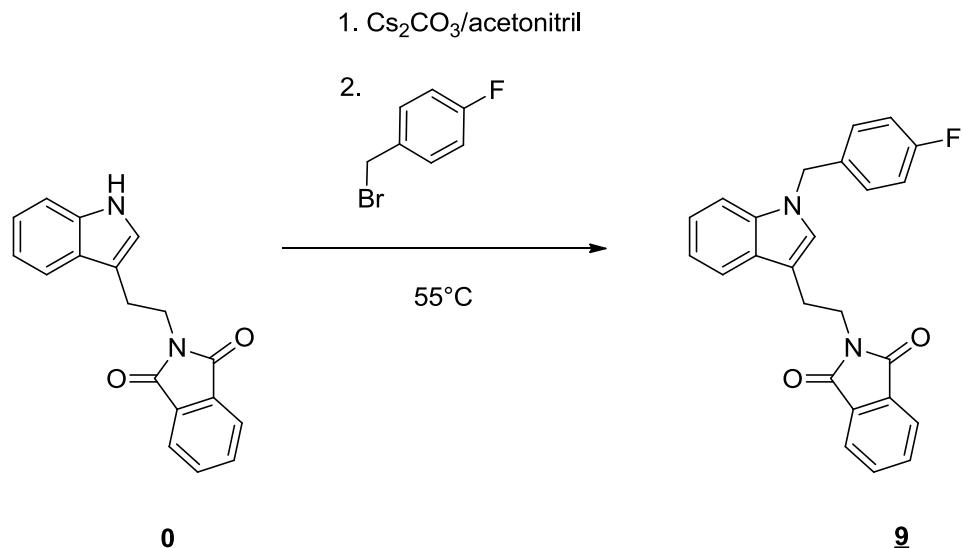
$^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, DMSO- d_6): $\delta = 24.32, 41.25, 48.07, 110.01, 111.05, 111.37, 118.65, 118.79, 118.91, 121.57, 126.98, 127.62, 129.86, 130.57, 131.19, 131.95, 135.87, 139.98, 156.85$ ppm.

IR $\nu(\text{max})$ = 3374, 2928, 2232, 1664, 1467, 1438, 1332, 1180, 744 cm^{-1} .

MS m/z (TOF MS ES+): 318,2 (M^+)

HRMS: izračunano (za C₁₉H₂₀N₅) 318,1719; izmerjeno 318,1710 (-2,8 ppm).

4.2.9 Síntese 2-(2-(1-(4-fluorobenzil)-1*H*-indol-3-il)etil)izoindolin-1,3-diona (9)



V bučko natehtamo izhodno spojino **9** (1,00 g, 3,43 mmol) ter Cs₂CO₃ (2,80 g, 8,58 mmol). Suspendiramo ju v 30 ml acetonitrila. Dodamo 1,2 ekv. 4-fluorobenzilbromida (0,51 ml, 4,12 mmol). Reakcijsko zmes pustimo mešati pri 55°C čez noč. Po poteku reakcije reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo in odfiltriramo neraztopljeno sol. Matičnici odparimo topilo z rotavaporjem. Sledi prekristalizacija iz EtOH (20 ml). Dobimo bele, igličaste kristale.

Opis: beli igličasti kristali

η : 88%

R_f: EtOAc/heksan = 1/3 (V/V), 0,36

T_{tal} : 111-115°C

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ= 3,18 (t, 2H, J = 7,7 Hz, -CH₂CH₂N-), 4,03 (t, 2H, J = 7,7 Hz, -CH₂CH₂N-), 5,25 (s, 2H, -NCH₂C₆H₄F), 6,95-6,99 (m, 2H, C(4)H-indol + C(5)H-indol), 7,02 (s, 1H, C(2)H-indol), 7,04-7,08 (m, 2H, C(5)H-C₆H₄F + C(6)H-C₆H₄F), 7,12-7,16 (m, 1H, C(3)-C₆H₄F), 7,16-7,21 (m, 1H, C(6)H-indol), 7,23-7,26 (m, 1H, C(2)H-indol), 7,72-7,74 (m, 2H, C₆H₄-ftalimid), 7,75-7,78 (m, 1H, C(7)H-indol), 7,84-7,86 (m, 2H, C₆H₄-ftalimid) ppm.

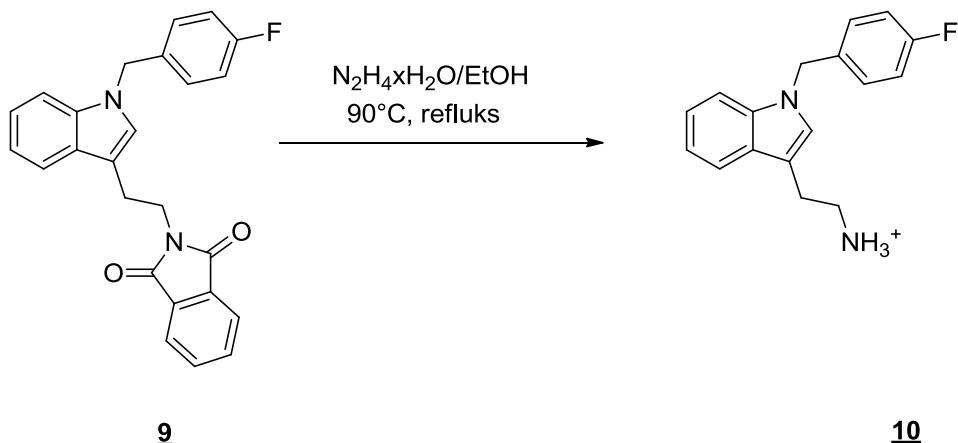
^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): $\delta = 24.31, 38.50, 49.17, 109.51, 117.70, 115.46, 115.67, 119.13, 119.31, 121.94, 123.12, 125.96, 128.09, 128.33, 128.41, 132.12, 133.28, 133.82, 136.44, 160.89$ in 163.34 (podvojen signal za C-F), 168.28 ppm.

IR $\nu(\text{max})$ = 3047, 2943, 1770, 1708, 1508, 1466, 1429, 1399, 1361, 1326, 1290, 1264, 1246, 1219, 1177, 1154, 1130, 1110, 1084, 1016, 988, 837, 747, 732, 718, 531, 504, 480 cm^{-1} .

MS m/z (TOF MS ES+): 399,2 (MH^+)

HRMS: izračunano (za $\text{C}_{25}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{F}$) 399,1509; izmerjeno 399,1501 (-2,0 ppm).

4.2.10 Sinteza 2-(1-(4-fluorobenzil)-1*H*-indol-3-il)etanamina (**10**)



V bučko natehtamo spojino **9** (1,10 g, 2,76 mmol) in jo raztopimo v 50 ml EtOH. Postopoma po kapljicah dodamo 5 ekv. hidrazina (1,26 ml, 35% (m/m), 13,78 mmol). Reakcijsko zmes pustimo mešati čez noč pri 90°C pod refluksom. Po poteku reakcije vidimo, da nam izпадa oborina. To previdno odfiltriramo s pomočjo teflonskega filtra in presesalne erlenmajerice. Naredimo TLC iz katerega vidimo, da se naša spojina nahaja v oborini, delno pa tudi v matičnici. Oborino sušimo v vakumu z membransko črpalko, preostanek surovega produkta iz matičnice pa čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo DKM/MeOH=9/1 (V/V) +1%TEA. Združimo zaostanek produkta iz oborine, z zaostankom produkta iz matičnice. Raztopimo ga v 50 ml EtOAc. Prenesemo v ljiljan in spiramo organsko fazo z 1 x 25 ml destilirane vode. Vodno fazo med ekstrakcijo večkrat naalkalimo z 1M NaOH dokler ne dosežemo pH vodne faze 11-12. Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , odfiltriramo sušilno sredstvo in z rotavaporjem odparimo topilo. Spojino

pretvorimo še v hidroklorid. Zaostanek po zadnjem rotavapiranju raztopimo v 5 ml absolutnega EtOH, dodamo 3 ekv. 1M HCl/EtOH, katero smo predhodno pripravili *in situ*. Ponovno odparimo topilo. Oljnato tekočino, ki jo dobimo po koncu rotavapiranja trituiramo z 10 ml EtOEt dokler izpada bela oborina, katero sušimo 1 h v vakumu z membransko črpalko.

Opis: bela snov amorfne oblike

η: 79%

Rf: DKM/MeOH=9/1 (V/V) +1%TEA, 0,36

T_{tal}: 173-179°C

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ= 3,02-3,08 (m, 4H, -CH₂CH₂N-), 5,37 (s, 2H, -NCH₂C₆H₄F), 7,04-7,07 (ddd, 1H, J₁ = 7,9 Hz, J₂ = 7,0 Hz, J₃ = 1,0 Hz, C(5)H-indol), 7,11-7,16 (m, 3H, C(6)H-indol + C(4)H-indol + C(2)H-C₆H₄F), 7,26-7,30 (m, 2H, C(5)H-C₆H₄F + C(6)H-C₆H₄F), 7,41 (s, 1H, C(2)H-indol), 7,43-7,61 (d, 1H, J = 8,2 Hz, C(2)H-C₆H₄F), 7,59-7,61 (m, 1H, C(7)H-indol), 8,07 (s, 1H, -CH₂CH₂NH₃⁺) ppm.

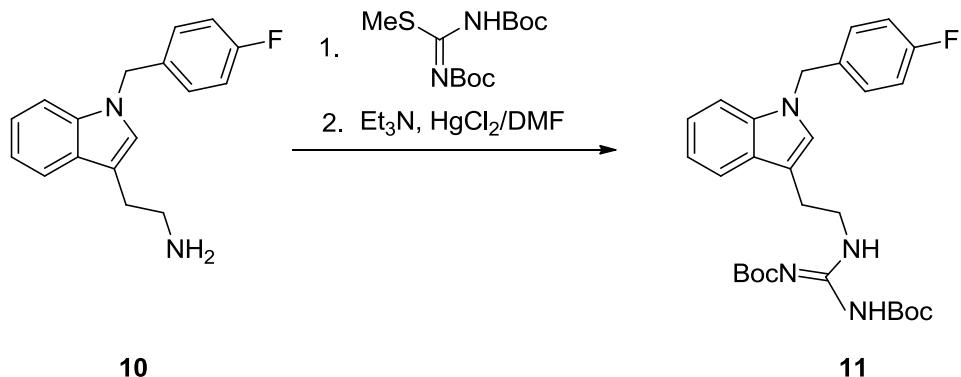
¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆): δ= 22.97, 48.20, 109.62, 110.21, 115.16, 115.37, 118.55, 118.86, 121.52, 127.02, 127.42, 129.11, 129.19, 134.42, 135.99, 160.18 in 162,60 (podvojen signal za C-F) ppm.

IR ν(max) = 3436, 2960, 2458, 1601, 1509, 1480, 1467, 1438, 1393, 1352, 1336, 1299, 1274, 1224, 1184, 1158, 1112, 1014, 957, 940, 832, 760, 745, 678, 518, 482 cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES+): 269,1 (MH⁺)

HRMS: izračunano (za C₁₇H₁₈N₂F) 269,1454; izmerjeno 269,1458 (1,5 ppm).

4.2.11 Sinteza *terc*-butil (1-((2-(1-(4-fluorobenzil)-1*H*-indol-3-il)ethyl)amino)ethyliden)karbamata (11)



V bučko natehtamo spojino **10** (0,28 g, 1,04 mmol) in jo raztopimo v 10 ml DMF. Dodamo ji *N,N'*-di-(*terc*-butoksikarbonil)-*S*-metilizotiosečnino (0,30 g, 1,04 mmol), Et₃N (0,51 ml, 3,65 mmol) in HgCl₂ (0,28 g, 1,04 mmol) v navedenem zaporedju. Reakcijsko zmes pustimo mešati pri sobni temperaturi čez noč. Po poteku reakcije najprej s pomočjo presesalne erlenmajerice odfiltriramo nastalo neraztopljeno sol Hg(SMe)Cl. Filtratu odparimo topilo z rotavaporjem, zaostanek pa raztopimo v 30 ml EtOEt. Prenesemo v lijločnik in spiramo organsko fazo s 3 x 15 ml destilirane vode, 1 x 15 ml z nasičene raztopine NaHCO₃ in 1 x 15 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, odfiltriramo sušilno sredstvo in z rotavaporjem odparimo topilo. Produkt čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=1/5 (V/V).

Opis: brezbarvna oljnata tekočina

η: 41%

Rf: EtOAc/heksan=1/5 (V/V), 0,31

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ= 1,48 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃), 1,53 (s, 9H, =NCOOC(CH₃)₃), 3,05 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz, -CH₂CH₂N-), 3,78 (t, 2H, *J* = 6,8 Hz, -CH₂CH₂NH-), 5,27 (s, 2H, -NCH₂C₆H₄F), 6,98-7,02 (m, 2H, C(5)H- indol + C(2)H-C₆H₄F), 7,03 (s, 1H, C(2)H-indol) 7,11-7,14 (m, 2H, C(2)H-C₆H₄F + C(3)H-C₆H₄F), 7,15-7,16 (m, 1H, C(4)H-indol), 7,18-7,22 (ddd, 1H, *J*₁ = 7,4 Hz, *J*₂ = 6,7 Hz, *J*₃ = 1,2 Hz, C(6)H-indol), 7,23-7,25 (m, 1H, C(6)H-C₆H₄F), 8,44 (t, 1H, *J* = 5,0 Hz, -CH₂CH₂NH-), 11,51 (s, 1H, -NHBOC) ppm.

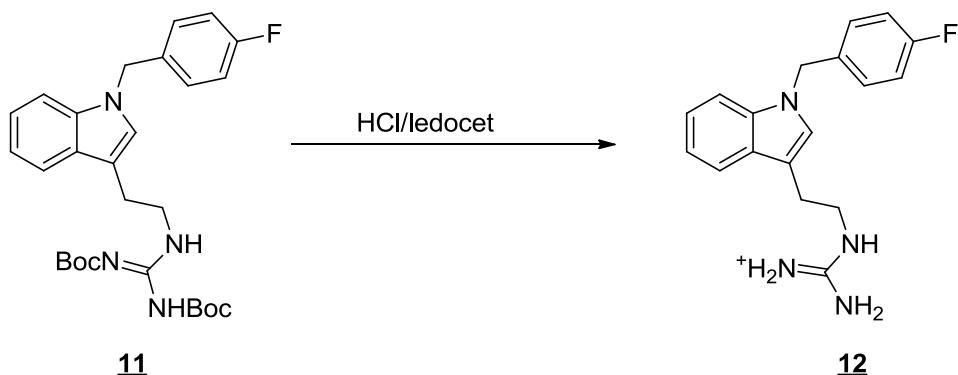
^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): $\delta = 24.89, 28.04, 28.33, 41.12, 49.38, 79.23, 82.90, 109.65, 111.99, 115.55, 115.76, 119.14, 119.25, 121.99, 126.24, 128.03, 128.45, 128.53, 133.28, 133.31, 136.60, 153.14, 156.08, 160.96, 163.41$ in 163.66 (podvojen signal za C-F) ppm.

IR $\nu(\text{max})$ = 3351, 3135, 2974, 2932, 1721, 1631, 1561, 1513, 1469, 1437, 1416, 1391, 1366, 1332, 1284, 1228, 1156, 1131, 1074, 1061, 1039, 1022, 1001, 877, 844, 815, 751, 613, 496 cm^{-1} .

MS m/z (TOF MS ES+): 511,3 (MH^+)

HRMS: izračunano (za $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_4\text{F}$) 511,2721 izmerjeno 511,2725 (0,8 ppm).

4.2.12 Sinteza 1-(2-(1-(4-fluorobenzil)-1*H*-indol-3-il)ethyl)gvanidina (**12**)



V dvogrolo bučko natehtamo spojino **11** (0,22 g, 0,43 mmol) in jo raztopimo v 20 ml ledocta (brezvodne acetne kisline). En vrat bučke zatesnimo s steklenim zamaškom, drugi vrat pa priključimo na sistem za prepohovanje s plinastim HCl. Prepohujemo 5 minut. Nato zatesnimo tudi drugi vrat bučke s steklenim zamaškom in reakcijsko zmes pustimo mešati čez noč. Naslednji dan odparimo topilo z rotavaporjem. Spojino pretvorimo še v hidroklorid. Zaostanek po rotavapiranju raztopimo v 5 ml absolutnega EtOH, dodamo 3 ekv. 1M HCl/EtOH, katero smo predhodno pripravili *in situ*. Ponovno odparimo topilo. Oljnato tekočino, ki jo dobimo po koncu rotavapiranja trituiramo z 10 ml EtOEt dokler izpada bela oborina, katero sušimo 1 h v vakumu z membransko črpalko.

Opis: brezbarvna oljnata tekočina

η : 88%

Rf: DKM/MeOH=4/ (V/V) + 1%TEA, 0,52

T_{tal}: /

¹H NMR (400MHz, CD₃OD): δ= 2,94 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, -CH₂CH₂N-), 3,41 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, -CH₂CH₂N-), 5,22 (s, 2H, -NCH₂C₆H₄F), 6,87-6,92 (m, 2H, C(5)H-indol + C(5)H-C₆H₄F), 6,95-6,97 (m, 1H, C(6)H-indol), 7,00-7,02 (m, 1H, C(6)H-C₆H₄F), 7,03-7,07 (m, 2H, C(2)H-C₆H₄F + C(4)H-indol), 7,09 (s, 1H, C(2)H-indol), 7,18-7,02 (m, 1H, C(3)H-C₆H₄F), 7,46-7,49 (m, 1H, C(7)H-indol) ppm.

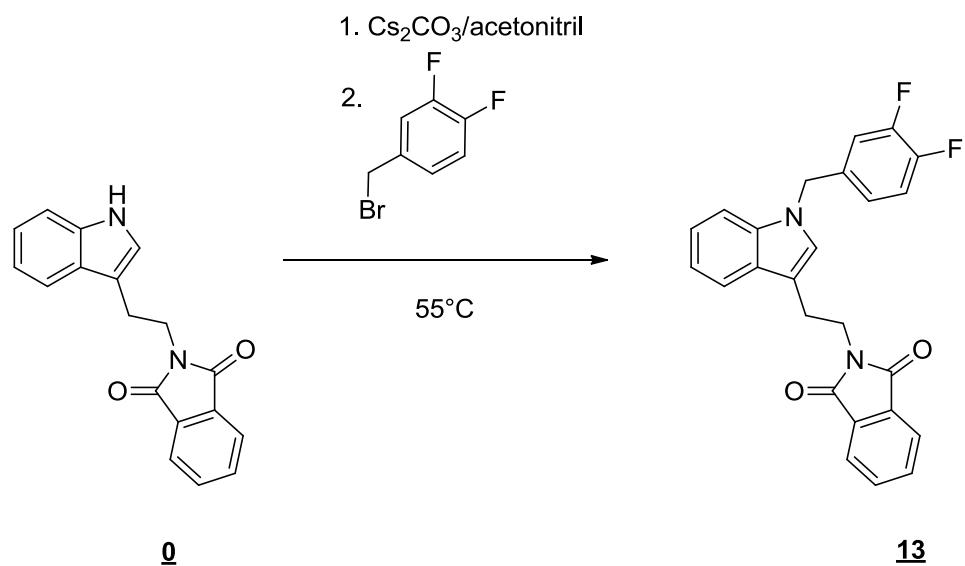
¹³C NMR (100MHz, CD₃OD): δ= 25.67, 43.17, 49.92, 110.99, 112.31, 116.21, 116.42, 119.61, 120.30, 122.94, 127.83, 129.41, 129.84, 129.92, 135.64, 138.08, 158.61 in 162.36 (podvojen signal za C-F), 164.78 ppm.

IR ν (max) = 3328, 3155, 1654, 1509, 1466, 1221, 1157, 823, 741 cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES+): 311,2 (M^+)

HRMS: izračunano (za C₁₈H₂₀N₄F) 311,1672; izmerjeno 311,1666 (-1,9 ppm).

4.2.13 Sinteza 2-(2-(1-(3,4-difluorobenzil)-1*H*-indol-3-il)etil)izoindolin-1,3-diona (13)



V bučko natehtamo izhodno spojino **9** (1,00 g, 3,43 mmol) ter Cs_2CO_3 (2,80 g, 8,58 mmol). Suspendiramo ju v 30 ml acetonitrila. Dodamo 1,2 ekv. 3,4-difluorobenzilbromida (0,53 ml, 4,12 mmol). Reakcijsko zmes pustimo mešati pri 55°C čez noč. Po poteku reakcije reakcijsko zmes ohladimo na sobno temperaturo in odfiltriramo neraztopljeno sol. Filtratu odparimo topilo z rotavaporjem. Zaostanek raztopimo v 50 ml EtOEt. Prenesemo v lij ločnik in spiramo organsko fazo s 3 x 25 ml destilirane vode, 1 x 25 ml z nasičeno raztopino NaHCO_3 in 1 x 25 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , odfiltriramo sušilno sredstvo in z rotavaporjem odparimo topilo. Sledi prekristalizacija iz EtOH (100 ml). Dobimo bele, igličaste kristale.

Opis: beli igličasti kristali

η: 63%

R_f: EtOAc/heksan= 1/3 (V/V), 0,34

T_{tal}: 128-130°C

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ= 3,05 (t, 2H, J = 7,0 Hz, -CH₂CH₂N-), 3,87 (t, 2H, J = 7,0 Hz, -CH₂CH₂N-), 5,33 (s, 2H, -NCH₂C₆H₃F₂), 6,90-6,94 (m, 1H, C(2)H-C₆H₃F₂), 6,99-7,03 (ddd, 1H, J₁ = 8,0 Hz, J₂ = 7,0 Hz, J₃ = 1,0 Hz, C(5)H-indol), 7,07-7,11 (ddd, 1H, J₁ = 8,0 Hz, J₂ = 7,0 Hz, J₃ = 1,0 Hz, C(6)H-indol), 7,16-7,22 (m, 1H, C(4)-indol), 7,27-7,32 (m, 1H, C(6)H-C₆H₃F₂), 7,33 (s, 1H, C(2)H-indol), 7,38 (d, 1H, J = 8,2 Hz, C(5)H-C₆H₃F₂), 7,57-7,59 (m, 1H, C(7)H-indol), 7,82-7,84 (m, 4H, C₆H₄-ftalimid) ppm.

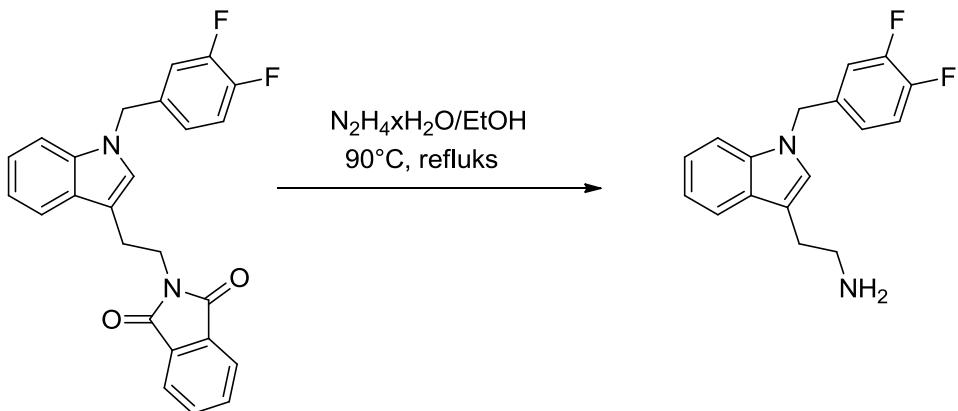
¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆): δ= 23.5, 38.1, 47.7, 110.0, 110.8, 115.8, 116.0, 117.3, 117.5, 118.4, 118.8, 121.4, 122.9, 123.55-123.56 (sklopitev z dvema F-atomoma), 126.7, 127.7, 131.5, 134.3, 135.8, 136.11-136.14 (sklopitev z dvema F-atomoma), 167.7 ppm.

IR v(max) = 3448, 3058, 2926, 1768, 1705, 1608, 1518, 1482, 1469, 1434, 1397, 1379, 1343, 1331, 1275, 1210, 1189, 1172, 1124, 1112, 1088, 1033, 1016, 1006, 950, 927, 882, 858, 832, 818, 782, 738, 720, 573, 532 cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES+): 417,1 (MH⁺)

HRMS: izračunano (za C₂₅H₁₉N₂O₂F₂) 417,1415; izmerjeno 417,1401 (-3,4 ppm).

4.2.14 Sinteza 2-(1-(3,4-difluorobenzil)-1*H*-indol-3-il)etanamina (**14**)



13

14

V bučko natehtamo spojino **13** (0,90 g, 2,09 mmol) ter jo raztopimo v 50 ml EtOH. Postopoma po kapljicah dodamo 5 ekv. hidrazina (0,96 ml, 35% (m/m), 10,45 mmol).

Reakcijsko zmes pustimo mešati čez noč pri 90°C pod refluksom. Po poteku reakcije vidimo, da nam izпадa oborina. To previdno odfiltriramo s pomočjo teflonskega filtra in presesalne erlenmajerice. Naredimo TLC iz katerega vidimo, da se naša spojina nahaja v oborini, delno pa tudi v matičnici. Oborino sušimo v vakumu z membransko črpalko, matičnici pa odparimo topilo z rotavaporjem. Združimo zaostanek produkta iz oborine, z zaostankom produkta iz matičnice. Raztopimo ga v 50 ml EtOAc. Prenesemo v lij ločnik in spiramo organsko fazo z 1 x 25 ml destilirane vode. Vodno fazo med ekstrakcijo večkrat naalkalimo z 1M NaOH dokler ne dosežemo pH vodne faze 11-12. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, odfiltriramo sušilno sredstvo in z rotavaporjem odparimo topilo. Spojino pretvorimo še v hidroklorid. Zaostanek po zadnjem rotavapiranju raztopimo v 5 ml absolutnega EtOH, dodamo 3 ekv. 1M HCl/EtOH, katero smo predhodno pripravili *in situ*. Ponovno odparimo topilo. Oljnato tekočino, ki jo dobimo po koncu rotavapiranja trituiramo z 10 ml EtOEt dokler izpada bela oborina, katero sušimo 1 h v vakumu z membransko črpalko.

Opis: rjava snov amorfne oblike

η: 85%

Rf: DKM/MeOH=9/1 (V/V) + 1% TEA, 0,32

Tališče: 153-159°C

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ= 3,01-3,09 (m, 4H, -CH₂CH₂NH₂), 5,38 (s, 2H, -NCH₂C₆H₃F₂), 7,04-7,08 (m, 2H, C(5)H-indol + C(6)H-C₆H₃F₂), 7,12-7,16 (ddd, 1H, *J*₁ = 7,9 Hz, *J*₂ = 7,0 Hz, *J*₃ = 1,1 Hz, C(6)H-indol), 7,31-7,34 (m, 1H, C(2)H-C₆H₃F₂), 7,35-7,41 (m, 1H, C(4)H-indol), 7,43 (s, 1H, C(2)H-indol), 7,44-7,46 (d, 1H, *J* = 8,2 Hz, C(5)H-C₆H₃F₂) 7,60-7,62 (dd, 1H, *J*₁ = 7,9 Hz, *J*₂ = 1,1 Hz, C(7)H-indol) ppm.

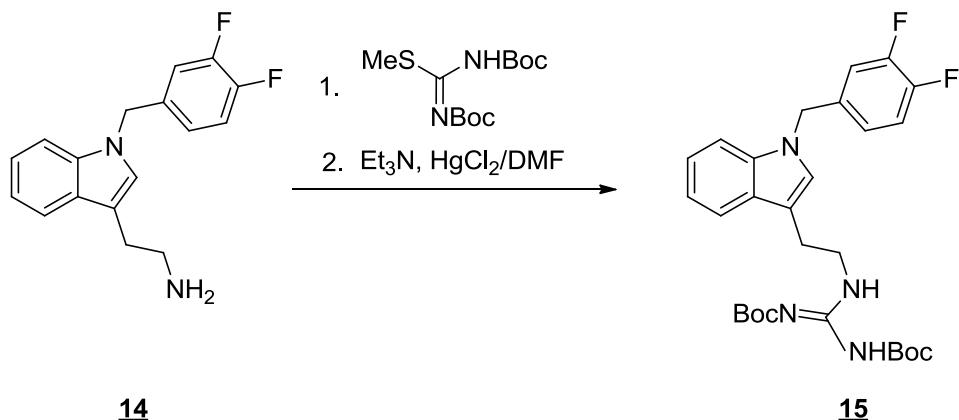
¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆): δ= 22.92, 47.86, 109.82, 110.15, 116.16 in 116.33 (podvojen signal zaradi sklopite s C-F-F) 117.47 in 117.64 (podvojen signal zaradi sklopite s C-F-F), 118.60, 118.96, 121.61, 123.90, 127.04, 127.46, 135.94, 147.34-148.11 (početveren signal zaradi sklopite s C-F-F), 149.90-150.54 (početveren signal zaradi sklopite s C-F-F) ppm.

IR ν(max) = 3347, 2960, 1612, 1509, 1466, 1438, 1334, 1287, 1210, 1113, 942, 818, 779, 745 cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES⁺): 287,1(M⁺) (38%), 270,1 (100%)

HRMS: izračunano (za C₁₇H₁₇N₂F₂) 287,1360; izmerjeno 287,1364 (1,4 ppm).

4.2.15 Sinteza *terc*-butil (1-((2-(1-(3,4-difluorobenzil)-1*H*-indol-3-il)etil)amino)etilliden)karbamata (15)



V bučko natehtamo spojino **14** (0,40 g, 1,40 mmol) in jo raztopimo v 10 ml DMF. Dodamo ji *N,N'*-di-(*terc*-butoksikarbonil)-*S*-metilizotiosečnino (0,41 g, 1,40 mmol), Et₃N (0,68 ml, 4,89 mmol) in HgCl₂ (0,39 g, 1,40 mmol) v navedenem zaporedju. Reakcijsko zmes pustimo mešati pri sobni temperaturi čez noč. Po poteku reakcije najprej s pomočjo presesalne erlenmajerice odfiltriramo neraztopljeno sol Hg(SMe)Cl, ki nastane pri reakciji. Filtratu z rotavaporjem odparimo topilo. Produkt čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=1/5 (V/V).

Opis: beli kristali

η : 74%

Rf: EtOAc/heksan=1/5 (V/V), 0,26

T_{tal}: 77-82°C

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ= 1,47 (s, 9H, -NHCOOC(CH₃)₃), 1,54 (s, 9H, =NCOOC(CH₃)₃), 3,06 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, -CH₂CH₂NH-), 3,80 (t, 2H, *J* = 7,0 Hz, -CH₂CH₂N-), 5,25 (s, 2H, -NCH₂C₆H₄CN), 6,84-6,88 (m, 1H, C(6)H-C₆H₃F₂), 6,92-6,97 (m, 1H, C(5)H-indol), 7,03 (s, 1H, C(2)H-indol), 7,06-7,13 (m, 1H, C(6)H-indol), 7,14-7,17 (m, 1H, C(4)H-indol), 7,20 (d, 1H, *J* = 1,0 Hz, C(2)-C₆H₃F₂), 7,21 (t, 1H, *J* = 1,1 Hz, C(7)H-indol), 7,66-7,69 (m, 1H, C(5)H-C₆H₃F₂), 8,45 (t, 1H, *J* = 4,7 Hz, -CH₂CH₂NH-), 11,51 (s, 1H, -NH₂Boc) ppm.

¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ= 24.86, 28.01, 28.33, 41.06, 49.09, 79.24, 82.94, 109.52, 112.38, 115.70, 115.88, 117.49, 117.66, 119.45, 122.19, 126.15, 128.10, 136.52, 148.46-

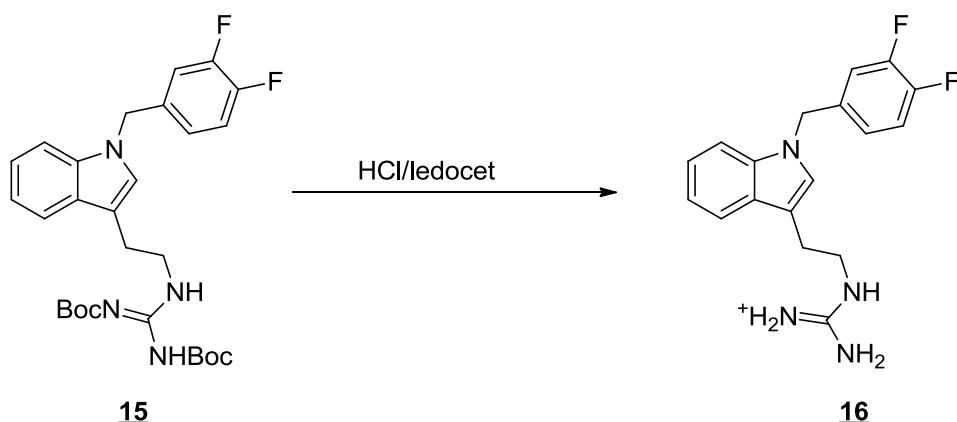
149.34 (početveren signal zaradi sklopite s **C-F-F**), 150.91-151.81 (početveren signal zaradi sklopite s **C-F-F**), 153.16, 156.09, 163.66 ppm.

IR $\nu(\text{max})$ = 3361, 3144, 2973, 1722, 1629, 1561, 1523, 1468, 1435, 1414, 1366, 1331, 1284, 1230, 1155, 1131, 1074, 1061, 1040, 1022, 1002, 940, 877, 853, 810, 772, 749, 611, 579 cm^{-1} .

MS m/z (TOF MS ES+): 529,3 (MH^+)

HRMS: izračunano (za $\text{C}_{28}\text{H}_{35}\text{N}_4\text{O}_4\text{F}_2$) 529,2626; izmerjeno 529,2637 (2,1 ppm).

4.2.16 Sinteza 1-(2-(1-(3,4-difluorobenzil)-1*H*-indol-3-il)ethyl)gvanidina (**16**)



V dvogrlo bučko natehtamo spojino **15** (0,50 g, 0,95 mmol) in jo raztopimo v 20 ml ledocta (brezvodne acetne kisline). En vrat bučke zatesnimo s steklenim zamaškom, drugi vrat pa priključimo na sistem za prepihanje s plinastim HCl. Prepihujemo 5 minut. Nato zatesnimo tudi drugi vrat bučke s steklenim zamaškom in reakcijsko zmes pustimo mešati čez noč. Naslednji dan odparimo topilo z rotavaporjem. Zaostanek po rotavapiranju raztopimo v 5 ml absolutnega EtOH, dodamo 3 ekv. 1M HCl/EtOH, katero smo predhodno pripravili *in situ*. Ponovno odparimo topilo. Oljnato tekočino, ki jo dobimo po koncu rotavapiranja trituriramo z 10 ml EtOEt dokler izpada bela oborina, katero sušimo 1 h v vakumu z membransko črpalko.

Opis: brezbarvna oljnata tekočina

η: 39%

Rf: DKM/MeOH=4/1 (V/V) + 1%TEA, 0,53

Tališče: /

¹H NMR (300MHz, DMSO-d₆): δ= 2,92 (t, 2H, J = 7,2 Hz, -CH₂CH₂N-), 3,41-3,45 (m, 2H, -CH₂CH₂N-), 5,38 (s, 2H, -NCH₂C₆H₃F₂), 7,02-7,15 (m, 4H, H-indol in H-gvanidin), 7,31-7,46 (m, 6H, H-indol in Ar-C₆H₃F₂), 7,59 (d, 1H, J = 7,8 Hz C(4)H-indol), 7,67 (širok s, 1H, H-gvanidin) ppm.

¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆): δ= 24.82, 41.77, 65.40, 110.53, 111.46, 116.59, 116.76, 118.02, 118.19, 119.25, 119.35, 122.00, 127.42, 128.12, 136.35, 157.36 ppm.

IR v(max) = 3154, 2362, 1655, 1518, 1466, 1438, 1283, 1178, 1115, 743 cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES+): 329,2 (M⁺)

HRMS: izračunano (za C₁₈H₁₉N₄F₂) 329,1578; izmerjeno 329,1564 (-4,3 ppm).

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Sintezni postopki

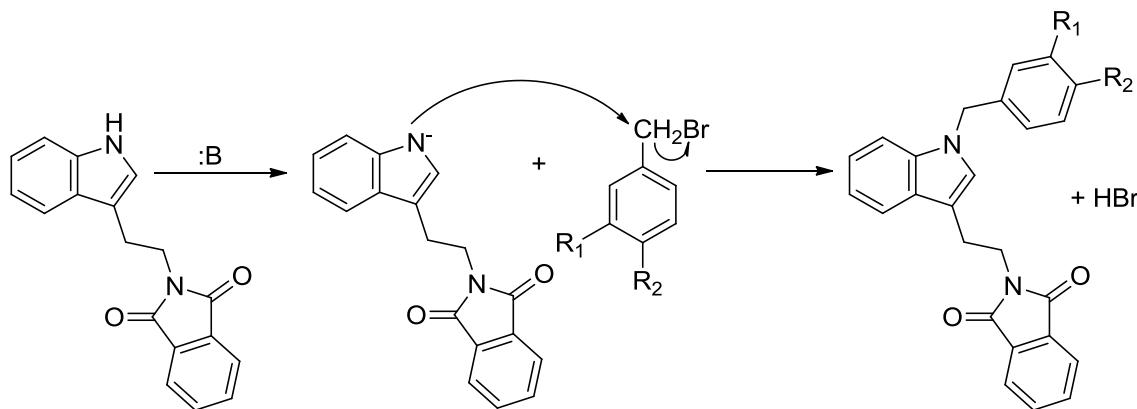
Uspešno smo sintetizirali 8 končnih spojin. Štiri od teh so primarni amini, preostale štiri pa gvanidini. Reakcijska pot je bila sestavljena iz 4 stopenj.

V prvi stopnji smo na indolni dušik triptamina pripnjali različno substituirane benzilbromide. Ker smo želeli, da nam reakcija selektivno poteče na indolnem dušiku, smo primarno amino skupino morali predhodno zaščititi. Zaščitili smo jo s pomočjo ftalanhidrida, tako da je nastala ftalimidna zaščita skupina. Za zaščito te primarne amino skupine bi lahko uporabili tudi kakšno drugo zaščitno skupino. Pri zaščiti amino skupin se pogosto uporablja zaščite v obliki amidov (formamidov, acetamidov) in karbamatov (metilkarbamati, trifluoroethylkarbamati, terciarni butikarbamati). Vendar večina omenjenih skupin ne izpolnjuje pogoja selektivnosti alkiliranja z benzilbromidom. Po zaščiti namreč nastanejo amidi ali karbamati, ki vsebujejo šibko kisli proton. Tega lahko odcepimo namesto protona na indolnem dušiku in reakcija ne bi potekla selektivno. Pri zaščiti primarnega amina v obliki ftalimida s tem nimamo težav, saj nastane dvojni amid – imid, ki ne vsebuje prostega protona. Dobre zaščitne skupine so tiste, ki se odstranjujejo enostavno, selektivno in z dobrimi izkoristki. Spojina, ki nastane po uvedbi zaščitne skupine pa mora biti stabilna pri različnih reakcijskih pogojih, ter pri različnih postopkih izolacije in čiščenja spojin (40).

V prvi reakcijski stopnji poteče nukleofilna substitucija. Z bazo (NaH/DMF ali $\text{Cs}_2\text{CO}_3/\text{acetonitril}$) odcepimo proton na indolnem obroču triptamina. S tem postane naša izhodna spojina boljši nukleofil, ki direktno napade primarni C-atom benzilbromida. Ta je zaradi svojega negativnega induktivnega efekta broma dober elektrofil. pride do tvorbe vezi med njima, pri tem pa izstopijo bromidni ioni, ki pa veljajo za dobre izstopajoče skupine (Slika 19).

Nukleofilnost aniona je precej odvisna od stopnje solvatacije, zato je izbira primernega topila zelo pomembna za izvedbo nukleofilne substitucije (41). Pri sintezi spojin **1** in **5** smo uporabili NaH/DMF . Pri delu smo morali zagotoviti brezvodne pogoje, saj nam v prisotnosti vode reakcija ne bi potekla. Naša izhodna spojina bi ostala protonirana in ne bi

bila dovolj nukleofilna, da bi lahko napadla primarni C-atom benzilbromida. Pri nukleofilnih reakcijah prevlada produkt, ki nastane s tistim nukleofilom, ki ga je največ, zato lahko potečejo reakcije tudi s topilom. Zaradi slednjega bi kot stranski produkt lahko nastal primarni alkohol na benzilbromidu. Brezvodne pogoje smo zagotovili s popolnoma suho steklovino, katero smo zatesnili s septumi, reakcijo smo pa izvajali pod argonovo atmosfero.

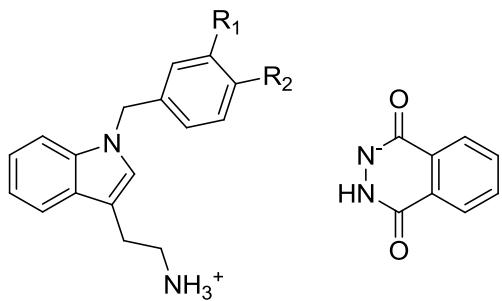


Slika 19: Mehanizem nukleofilne substitucije prve stopnje sintezne poti.

Kljub zagotavljanju brezvodnih pogojev sta bila izkoristka spojin **1** (24%) in **5** (35%) slaba. Iz TLC je bilo razvidno, da nam v reakcijski zmesi ostaja nezreagirana izhodna spojina, kljub dodatku prebitka baze in benzilbromida. Sinteze spojin **9** in **13** smo se lotili na drug način. Kot bazo smo uporabili Cs_2CO_3 v acetonitrilu. Cs_2CO_3 je sicer šibkejša baza kot NaH , vendar tukaj odigra pomembno vlogo tako imenovani cezijev efekt. Cezijev ion ima velik kationski radij, nizko gostoto in veliko polarizabilnost. Zaradi velikega kationskega radija imajo cezijeve soli najnižjo stopnjo solvatacije. Cezijevi ioni poskrbijo, da je tudi protion, v našem primeru deprotoniran indolni dušik triptamina bolj izpostavljen oz. bolj reaktiv. V nukleofilnih substitucijah imajo tako imenovani goli ioni (z nizko stopnjo solvatacije) največjo reaktivnost. Pomembna je tudi topnost soli v aprotičnih topilih, kajti večja topnost v topilu vodi k večji reaktivnosti. Cezijev karbonat ima v primerjavi s kalijevim karbonatom boljšo topnost v različnih topilih (42,43). Pri sintezi spojin **9** (88%) in **13** (63%) smo zabeležili boljši izkoristek reakcije. Sklepamo, da je na izkoristek reakcij odločilno vplivala zamenjava baze in topila. K večjemu izkoristku je morda pripomogla tudi drugačna izolacija omenjenih spojin. Ker smo zaradi cezijevega karbonata v reakcijski zmesi dobili oborino, smo le to najprej odfiltrirali s pomočjo sistema za filtriranje pri znižanem tlaku, nato smo spojini iz matičnice prekristalizirali iz EtOH .

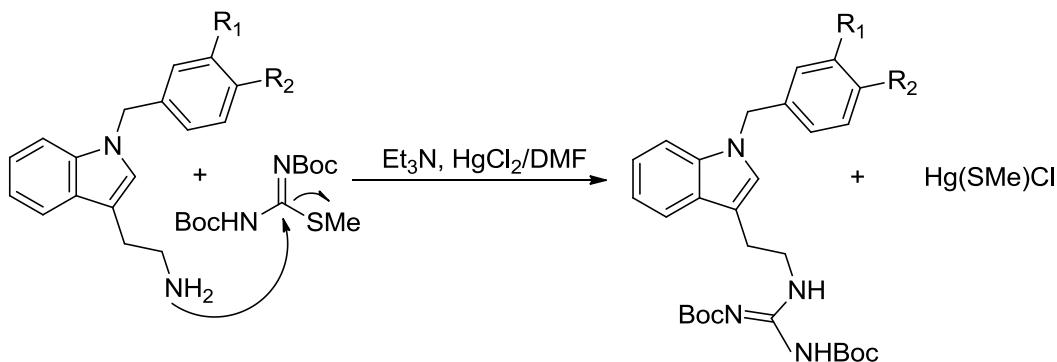
Dobili smo velike igličaste kristale. Menimo, da so večje izgube pri izolaciji s kolonsko kromatografijo, kakor pri izolaciji s prekristalizacijo.

V drugi stopnji smo se lotili odstranitve ftalimidne zaščite $-\text{NH}_2$ skupine. Izvedli smo jo s hidrazinolizo (5 ekv. 35% hidrazina) pri 90°C ob refluxu. Omenjeno zaščitno skupino bi lahko odstranrnili tudi z uporabo KOH/EtOH (40). Izolacija tovrstnih spojin nam ni delala večjih težav, na začetku smo se poslužili filtracije, saj je reakcijska zmes bila v obliki oborine, sledila je kolonska kromatografija. Iz NMR spektrov po izolaciji in čiščenju spojin smo ugotovili, da so sintetizirane spojine te stopnje v bistvu soli naše spojine in ftalimida v razmerju 1:1 (Slika 20). Ftalimid predstavlja stranski produkt in se ga je bilo potrebno znebiti. Lotili smo se ekstrakcije, kjer smo postopoma vodno fazo naalkalili do pH 11-12. Dosegli smo, da je ftalimid prešel v vodno fazo, medtem, ko je naša spojina neionizirana ostala v organski fazi. Izkoristki druge sintezne stopnje so bili mnogo boljši.



Slika 20: Sol spojine in ftalimida.

V tretji stopnji sinteze smo se ponovno srečali z nukleofilno substitucijo. Odščitena primarna $-\text{NH}_2$ skupina je s svojim prostim elektronskim parom dober nukleofil, ki napade sečninski karbonilni C-atom z Boc zaščitene S-metilizotiosečnine gvanidina. Pri tem pride do nastanka nove vezi in MeS- kot dobro izstopajoča skupina izstopi (Slika 21). Za potek reakcije so pomembni Hg²⁺ ioni, saj ti dobro vežejo žveplo. Zaradi slednjega pri reakciji uporabimo HgCl₂ v prebitku. Del HgCl₂ se porabi za nastanek soli Hg(SMe)Cl, iz prebitka HgCl₂ se pa sproščajo Cl⁻ ioni, ki naprej reagirajo do nastanka HCl. Pri zagotavljanju želenega poteka reakcije so pomembni tudi bazični pogoji. Za zagotavljanje le-teh uporabimo Et₃N. Z njim nevtraliziramo nastalo HCl. S tem dosežemo, da je $-\text{NH}_2$ skupina v neprotonirani obliki in je tako mnogo boljši nukleofil, kot protonirana oblika (NH₃⁺) (44).



Slika 21: Mehanizem nukleofilne substitucije tretje stopnje sintezne poti.

Izoacija produktov te stopnje se prične s filtracijo, saj nam v reakciji nastane sol Hg(SMe)Cl, ki jo želimo odstraniti. Sledi ekstrakcija filtrata s pomočjo presesalne erlenmajerice in čiščenje surovega produkta s kolonsko kromatografijo. Pri tej stopnji bi žeeli izpostaviti spojino **15** (74%), pri sintezi katere smo dobili najboljši izkoristek. Pri tej spojini smo se izolacije lotili s filtracijo, nadaljevali smo pa direktno s kolonsko kromatografijo brez vmesne ekstrakcije. Iz tega lahko sklepamo, da ekstrakcija z uporabo etilacetata povzroča največje izgube pri izolaciji naših spojin. Etilacetat se v majhni meri meša z vodo, zato nam pri vsaki ekstrakciji del spojine tako preide tudi v vodno fazo in posledično imamo zato slabše izkoristke. Kot organsko fazo pri ekstrakciji bi bilo bolje uporabiti diklorometan, ki se v manjši meri meša z vodno fazo.

V četrti stopnji sinteze smo se lotili odstranitve Boc zaščitnih skupin na amino skupinah gyanidina. Boc zaščite lahko odstranimo na več načinov. Možno je odstranjevanje z acidolizo s CF₃COOH ali HCl/AcOH ali HBr/AcOH. Pri spojinah **4** in **8** smo Boc zaščito brez težav odstranili z uporabo CF₃COOH. Dobili smo sol (trifluoroacetat), ki smo jo nato pretvorili še v hidroklorid. Hidrokloridi so bolj stabilni in tvorijo lepše kristale. Spojine smo iz oljnatih tekočin pretvorili v trdno obliko s pomočjo trituracije z EtOEt. Na ta način smo se tudi znebili morebitnih nečistot, ki so topne v etru. Spojina je bila v obliki soli in namreč ni topna v etru. Pri odstranjevanju Boc zaščite spojin **12** in **16** smo imeli več težav. Boc zaščite smo najprej poskušali odstraniti z uporabo CF₃COOH. Iz NMR smo ugotovili, da nam kljub uporabi CF₃COOH ni uspelo v celoti odstraniti Boc zaščit. Zato smo se odstranjevanja poslužili na drug način. Spojino smo raztopili v ledoctu (brezvodni ocetni kislini) in jo preprihovali s plinastim HCl. Na ta način nam je uspelo odstraniti te zaščitne skupine.

5.2 Biološko testiranje

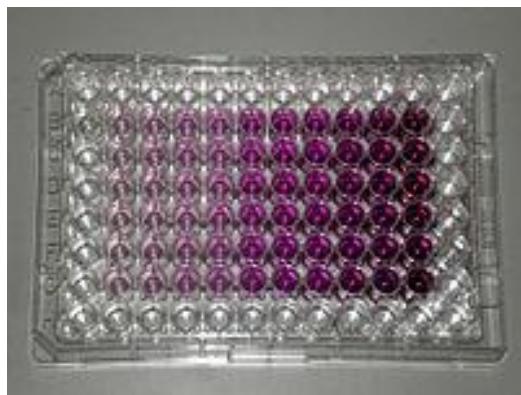
5.2.1 Testiranje citotoksičnosti

MTS test za testiranje citotoksičnosti so opravili na Katedri za klinično biokemijo, Fakultete za farmacijo.

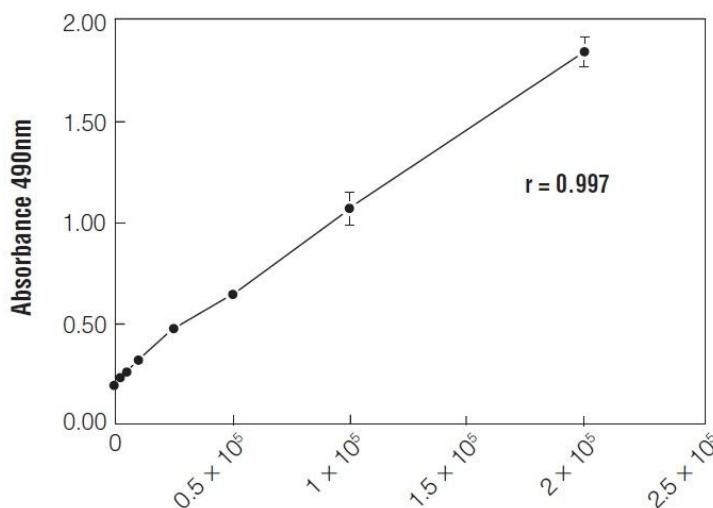
Izvedba samega testa je naslednja:(45,46)

- PBMC celicam (mononuklearne celice periferne krvi) dodamo v DMSO raztopljeni spojine, ki jih želimo testirati. Raztopine pripravimo v koncentraciji 8 μ g/mL,
- pomešane celice z našo vzorčno raztopino (100 μ L) prenesemo v vsako od 96-vdolbinic mikrotitrsko ploščice in vse skupaj inkubiramo 24h,
- nato v vsako od 96-vdolbinic dodamo 20 μ L MTS reagenta in vse skupaj inkubiramo 1-4h pri 37°C in 5% CO₂,
- po tem času spektrofotometrijsko določamo absorbanco (A) vijolično obarvanega formazana (Slika 22). Iz umeritvene krivulje f(št. metabolno aktivnih celic)=A, na podlagi izmerjene absorbance odčitamo št. metabolno aktivnih celic in izračunamo % metabolno aktivnih celic glede na začetno število celic. (opomba: Slika 23 je zgolj prikaz umeritvene krivulje MTS testa in se ne ujema z našimi podatki)

Za zagotavljanje točnosti metode moramo uporabiti kontorolo (ctrl). Ta vsebuje samo celice in MTS reagent. Kot kontrolo uporabimo tudi DMSO in s tem dokažemo, da topilo nima vpliva na test.



Slika 22: Obarvana mikrotitrskna ploščica pri izvedbi MTS testa (39).

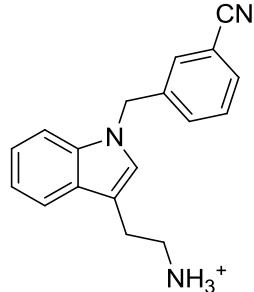
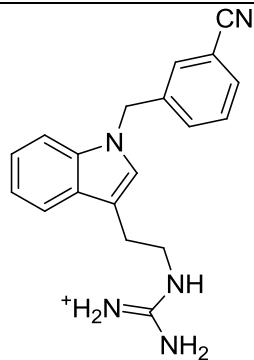
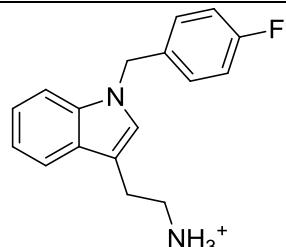
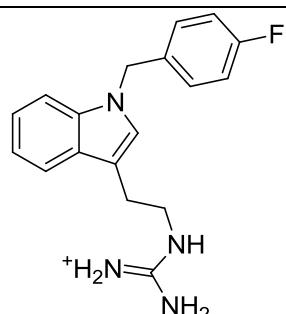
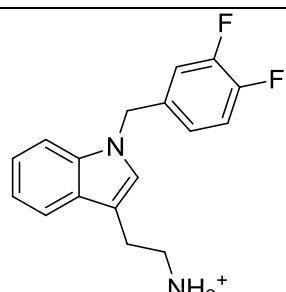


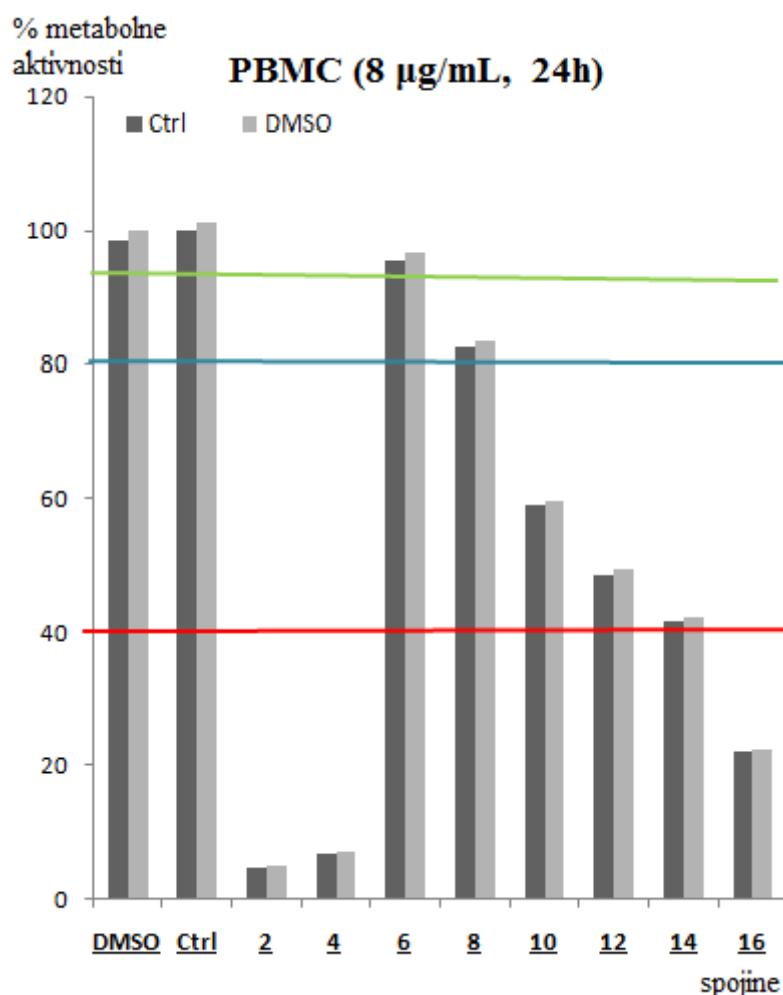
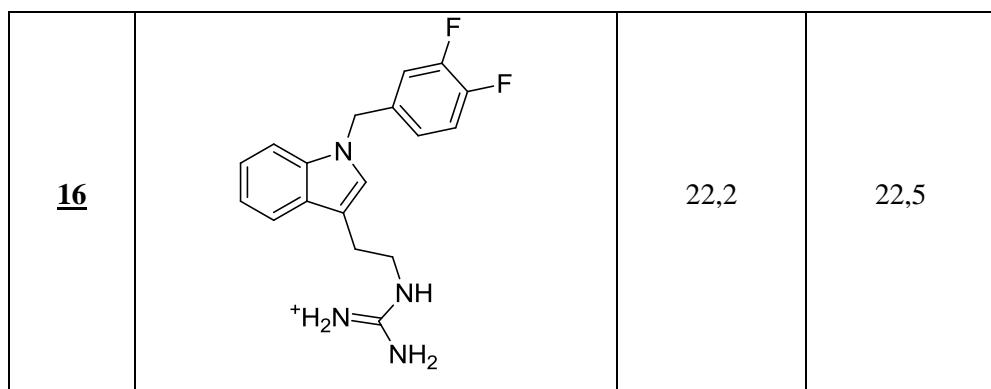
Slika 23: Diagram: odvisnost absorbance od števila preživelih celic (46).

Rezultati testiranja citotoksičnosti po MTS testu so naslednji:

Preglednica 1: Rezultati testiranja citotoksičnosti.

oznaka	struktura	% metabolne aktivnosti	
		Ctrl	DMSO
Ctrl	kontrola	98,67	100,00
DMSO	kontrola, da topilo ne vpliva na test	100,00	101,35
2		4,9	5,0
4		7,1	7,2

6		95,3	96,6
8		82,4	83,5
10		58,8	59,6
12		48,5	49,1
14		41,7	42,3



Slika 24: Diagram testiranja citotoksičnosti.

Iz preglednice 1 in diagrama (Slika 24) vidimo, da naše spojine povzročajo različno stopnjo citotoksičnost. Spojine, pri katerih je % metabolne aktivnosti pod 40% (pod rdečo črto na grafu) so močno toksične in neprimerne za nadaljno obravnavo. Rezultati med 40

in 80% veljajo za zmerno toksične. Spojine, ki izkazujejo več kot 95% metabolne aktivnosti, se obravnavajo kot praktično netoksične (nad zeleno črto na grafu). Metoda je sicer natančna, vendar ni dovolj občutljiva, zato je potrebno upoštevati 10% odstopanja.

Spojini **2** in **4** sta precej citotoksični, saj je njuna metabolna aktivnost oz. sposobnost preživetja celic po izvedbi MTS testa le slabih 5%. V svoji strukturi imata dva klorova atoma. Spojini **14** in **16** sta prav tako dajeta slabe rezultate. Njuna metabolna aktivnost znaša 42,3% za spojino **14** in 22,5% za spojino **16**. Ti dve spojini v svoji strukturi vsebuje dva fluorova atoma. Iz tega lahko sklepamo, da so spojine, ki v svoji strukturi vsebujejo dva ista halogena elementa precej toksične. Spojini **6** in **8** sta se pri testiranju najbolje izkazali. Spojini sta ciano derivata. Spojino **6** gre izpostaviti, saj je izmed vseh testiranih spojin izkazala najvišji % metabolne aktivnosti, in sicer 95%, kar predstavlja izredno nizko stopnjo toksičnosti. Spojini **10** in **12** padeta v sredino testiranih spojin.

Na splošno lahko zaključimo, da so gvanidinski derivati spojin v primerjavi z aminskimi derivati spojin z istimi substituenti na benzilnem obroču večinoma bolj toksični.

Klorovi derivati so se v primerjavi s fluorovimi derivati izkazali za bolj toksične. Domnevamo, da je toksičnost v tem primeru posledica encimsko aktiviranega mehanizma in nastanka toksičnih metabolitov. Vemo, da je C-F vez izredno močna oz. stabilna in da zelo težko poteče njena cepitev. C-Cl vez je labilnejša v primerjavi s C-F vezjo, njena cepitev lažje poteče, zato so klorovi derivati reaktivnejši. Metabolizem klorovih spojin gre lažje proti mehanizmu nastanka radikalov in posledično toksičnih metabolitov, medtem ko fluorove spojine zaradi stabilnosti C-F vezi ne gredo v smer radikalskega mehanizma.

Kot je bilo pričakovano so ciano derivati izkazovali najnižjo stopnjo toksičnosti. Vemo namreč, da halogeni elementi prisotni v strukturi odločilno vplivajo na toksičnost spojin. Prisotnost enega halogenega elementa, v primerjavi s prisotnostjo dveh halogenih elementov v strukturi se je izkazala za sprejemljivejšo. Mono-halogenirani derivati so bili manj toksični v primerjavi z di-halogeniranimi derivati.

6. SKLEP

V okviru diplomske naloge smo načrtovali in uspešno sintetizirali 8 končnih spojin. Sintetizirane spojine so potencialni inhibitorji bakterijske glikoziltransferaze in so v obliki aminov in gvanidinov. Sintezna stopnja je bila sestavljena iz 4 stopenj.

V prvi stopnji smo na indolni dušik triptamina pripnjali različno substituirane benzilbromide. Primarna amino skupina triptamina je bila predhodno zaščitena s ftalimidno zaščitno skupino. V drugi stopnji je sledila odščita te ftalimidne zaščitne skupine. Na to odščiteno primarno amino skupino smo v tretji stopnji vezali z Boc zaščiten gvanidin. V zadnji, četrtni stopnji smo odstranili Boc zaščite na gvanidinu.

Pri izvedbi in poteku samih reakcij nismo imeli večjih težav, smo pa prišli do pomembnih ugotovitev, ki so vplivale na izkoristke naših reakcij.

1) Cs_2CO_3 se je v primerjavi z NaH izkazal za boljšo izbiro pri poteku reakcij v prvi stopnji sintezne poti. Tukaj odigra pomembno vlogo tako imenovani cezijev efekt: cezijev ion ima velik kationski radij, nizko gostoto in veliko polarizabilnost. Zaradi velikega kationskega radija imajo cezijeve soli najnižjo stopnjo solvatacije in s tem večjo reaktivnost kationa (Cs^+) kot tudi svojega protiona. Pri nukleofilnih substitucijah je pomembna tudi topnost soli v aprotičnih topilih, kajti večja topnost v topilu vodi k večji reaktivnosti. Cezijev karbonat ima v primerjavi s kalijevim karbonatom boljšo topnost v različnih topilih.

2) Ekstrakcija z uporabo etilacetata opazno vpliva na izkoristek reakcije. Etilacetat se v majhni meri meša z vodo, zato nam pri vsaki ekstrakciji del spojine tako preide tudi v vodno fazo in posledično imamo zato slabše izkoristke. Kot organsko fazo pri ekstrakciji bi bilo bolje uporabiti diklorometan, ki se v manjši meri meša z vodno fazo.

3) Prekristalizacija iz določenega topila je iz stališča izkoristkov boljša metoda čiščenja kakor kolonska kromatografija. Je enostavnješa za samo izvedbo, potrebne so manjše količine topila, pa tudi časovno gledano je hitrejša metoda.

Sintetizirane spojine smo ovrednotili z MTS testom testiranja citotoksičnosti. Test temelji na merjenju sposobnosti redukcije MTS barvila doobarvanega formazana. Spektrofotometrično merimo absorbanco nastalega formazana, ki je pa sorazmerna številu

metabolno aktivnih celic. Ta rezultat dobro korelira s preživelostjo celic, zato nam ta test daje dobre preliminarne rezultate toksičnosti spojin.

Spojini **2** in **4** (dikloro derivata) sta se izkazali kot močno toksični, spojini **6** in **8** pa kot praktično netoksični (ciano derivata). Na splošno lahko zaključimo, da so gvanidinski derivati spojin v primerjavi z aminskimi derivati spojin z istimi substituenti na benzilnem obroču bolj toksični. Klorovi derivati so se v primerjavi s fluorovimi derivati izkazali za bolj citotoksične. Ciano derivati so izkazovali najnižjo stopnjo toksičnosti. Mono-halogenirani derivati so manj toksični v primerjavi z di-halogeniranimi derivati.

Sintetizirane končne spojine smo žeeli testirati tudi na testih inhibicije IC₅₀, ter na MIC testu. Spojine smo poslali v testiranje na Centre d’Ingenierie des Proteines, Universite’ de Lie`ge (Belgija), vendar do zaključka tega diplomskega dela žal nismo dobili rezultatov želenih testiranj.

7. LITERATURA

1. Williams, D.A.; Lemke, T.L. In *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*, 5th ed., Lippincott Williams&Wilkins: Baltimore, 2002; 367-395
2. Patrick, G.L. In *An Introduction to medicinal Chemistry*, 3rd ed., Oxford University Press: Oxford, 2005; 579
3. Liu, H.; Wong, C.H. Characterization of a transglycosylasendomain of *Streptococcus pneumoniae* PBP1b. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2006**, 14, 7187-7195
4. Breukink, E.; de Kruijff, B. Lipid II as a target for antibiotics. *Nature Reviews Drug Discovery*, Advance online publication, marec **2006**, 1-10
5. Devetak, D.; Devetak, B.; Tome, D.; Vrezac, A.; Belušič, G.; Žinko, B. *Biologija v gimnaziji- izbirni del (Biotehnologija in mikrobiologija)*, DZS, Ljubljana, 2011; 70-81
6. Štrukelj, B.; Kos, J. *Biološka zdravila-od gena do učinkovine*, SFD: Ljubljana, 2007; 71-91
7. Ostash, B.; Walker, S. Bacterial transglycosylase inhibitors. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2005**, 9, 459-466
8. <http://sl.wikipedia.org/wiki/Linezolid> (dostop: 31.8.2011)
9. <http://en.wikipedia.org/wiki/Daptomycin> (dostop: 31.8.2011)
10. Gubina, M.; Ihan, A.; *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo*, Medicinski razgledi: Ljubljana, 2002; 427-446
11. Dragaš, A.Z. *Mikrobiologija z epidemiologijo*, DZS: Ljubljana, 1998; 19-30
12. Cerar, T.; Ružić-Sabljić, E.; Steyer, A.; Strašek, K.; Cvitković-Špik, V. *Osnutek praktikuma iz mikrobiologije*, Medicinska fakulteta: Ljubljana, 2007, 11-53
13. http://wsimson.tripod.com/10TH/sci_pdf/sci_Copy_1.html (dostop: 1.7.2011)
14. <http://schools-wikipedia.org/wp/b/Bacteria.htm> (dostop: 1.7.2011)
15. Van Heijenoort, J. Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Natural product Reports*, **2001**, 18, 503-519
16. Di Guilmi, A.M.; Dessen, A.; Dideberg, O.; Vernet, T. Bifunctional Penicillin-Binding Proteins: Focus on the Glycosyltransferase Domain and its Specific Inhibitor Moenomycin. *Current Pharmaceutical Biotechnology*, **2002**, 3, 63-75
17. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1945/> (dostop: 2.9.2011)

18. Green, D.W. The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2002, Vol.6, No.1, 1-20
19. Rang, H.P.; Dale, M.M.; Ritter, J.M.; Moore, P.K. In *Pharmacology*, 6th ed., Churchill Livingstone: Edinburgh, 2007; 647-678
20. Green, D.W. The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2002, 6, 1-19
21. Barreteau, H.; Kovač, A.; Boniface, A.; Sova, M.; Gobec, S., Blanot, D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*. 2008, 32, 168-207
22. Bouhss, A.; Trunkfield, A. E.; Bugg, T.D.H.; Mengin-Lecreux, D. The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiology Reviews*. 2008, 32, 208-233
23. Sauvage, E.; Kerff,F.; Terrak, M.; Ayala, J.A.; Charlier, P. The penicillin.binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*. 2008, 32, 234-258
24. Zidar, N. Načrtovanje in sinteza heterocikličnih inhibitorjev ligaz Mur C-E, Doktorska dizertacija, Fakulteta za farmacijo, 2011
25. Offant, J.; Michoux, F.; Bermiaux, A.; Biton, J.; Boure, Y. Functional characterization of the glycosyltransferase domain of penicillin-binding protein 1a from *Thermotoga maritima*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2006, 1764, 1036-1042
26. Di Guilmi, A.M.; Mouz, N.; Martin, L.; Hoskins, J.; Jaskunas, S.R.; Dideberg, O.; Vernet, T. Glycosyltransferase Domain of Penicillin-Binding Protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* Is Membrane Associated. *Journal of Bacteriology*, 1999, 181, 2773-2781
27. Wang, Q.M.; Peery, R.B.; Johnson, R.B.; Alborn, W.E.; Yeh, W.K.; Skatrud, P.L. Identification and Characterization of a Monofunctional Glycosyltransferase from *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 2001, 183, 4779-4785
28. Vollmer, W.; Höltje, J.V. A Simple Screen for Murein Transglycosylase Inhibitors. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 2000, 44, 1181-1185
29. Terrak, M. Peptidoglycan Glycosyltransferase Inhibition: New Perspectives for An Old Target. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, 2008, 7, 180-192
30. Shih, H.W.; Chen, K.T.; Chen, S.K.; Huang, C.Y.; Cheng, T.J.R.; Ma, C.; Wong, C.H.; Cheng, W.C. Combinatorial approach toward synthesis of small molecule

- libraries as bacterial transglycosylase inhibitors. *Organic & Biomolecular Chemistry*, **2010**, 8, 2586-2593
31. Lovering, A.L.; de Castro, L.H.; Lim, D.; Strynadka, C.J. Structural Insight into the Transglycosylation Step of Bacterial Cell-Wall Biosynthesis. *Science*, **2007**, 315, 1402-1405
32. Sung, M.T.; Ali, Y.T., Huang, C.Y.; Chou, L.Y.; Shih, H.W.; Cheng, W.C., Wong, C.H., Ma, C. Crystal structure of the membrane-bound bifunctional transglycosylase PBP1B from *E.coli*. *PNAS early edition* **2009**, 1-6
33. Di Guilmi, A.M.; Dessen, A.; Dideberg, O.; Vernet, T. The Glycosyltransferase Domain of Penicillin-Binding Protein 2a from *Streptococcus pneumoniae* Catalyzes the polymerization of Murein Glycan Chains. *Journal of Bacteriology*, **2003**, 185, 4418-4423
34. Cheng, T.J.R.; Sung, M.T.; Liao, H.Y.; Chang, Y.F.; Chen, C.W.; Huang, C.Y.; Chou, L.Y.; Wu, Y.D.; Chen, Y.H.; Cheng, Y.S.E.; Wong, C.H.; Ma, C.; Cheng, W.C. Domain requirement of moenomycin binding to bifunctional transglycosylases and development of high-throughput discovery of antibiotics. *PNAS*, **2008**, 105, 431-436
35. Halliday, J.; McKeveney, D.; Muldoon, C.; Rajaratnam, P.; Meutermans, W. Targeting the forgotten transglycosylases. *Biochemical pharmacology*, **2006**, 71, 957-967
36. Fuse, S.; Tsukamoto, H.; Yuan, Y.; Wang, T.S.A.; Zhang, Y.; Bolla, M.; Walker, S.; Sliz, P.; Kahne, D. Functional and Structural Analysis of a Key Region of the Cell Wall Inhibitor Moenomycin. *ACS Chemical Biology*, **2010**, 5, 701-711
37. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2553521/> (dostop: 2.9.2011)
38. Derouaux, A.; Turk, S.; Olrichs, N.K.; Gobec, S.; Breukink, E.; Amoroso, A.; Offant, J.; Bostock, J.; Mariner, K.; Chopra, I.; Vernet, T.; Zervosen, A.; Joris, B.; Frère, J.M.; Nguyen-Distèche, M.; Terrak, M. Small molecule inhibitors of peptidoglycan synthesis targeting the lipid II precursor. *Biochem. Pharmacol.* **2011**, 81, 1098-1105
39. http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay (dostop: 5.9.2011)
40. Pečar, S.; Sollner Dolenc, M. *Vaje iz farmacevtske kemije III*, Fakulteta za farmacijo: Ljubljana, 2000, 79-90
41. Tišler, M. *Organska kemija*, Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1988, 121-140

42. http://www.acros.com/_Rainbow/pdf/brochure_cesium_v2.pdf (dostop: 5.9.2011)
43. Lide, D.R., Handbook of Chemistry and Physics, 83rd ed., CRC press, 2002-2003
44. Danilewicz, J.C.; Abel, S.M.; Brown, A.d.; Fish, P.V.; Hawkeswood, E.; Holland, S.J.; James, K.; McElroy, A.; Overington, J.; Powling, M.J.; Rance, D.J. Design of Selective Thrombin Inhibitors Based on the (R)-Phe-Pro-Arg Sequence. *Journal of Medicinal Chemistry*. **2002**, *45*, 2432-2453
45. <http://www.promega.com/resources/product-guides-and-selectors/protocols-and-applications-guide/cell-viability/> (dostop: 5.9.2011)
46. CellTiter 96 AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation systems protocol, Technical bulletin, Promega