

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NUŠA TROŠT

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA NOVIH
SULFONAMIDNIH INHIBITORJEV BAKTERIJSKIH
TRANSPEPTIDAZ**

**THE DESIGN AND SYNTHESIS OF NEW
SULFONAMIDE INHIBITORS OF BACTERIAL
TRANSPEPTIDASES**

Ljubljana, 2011

Diplomsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani, pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Samota Turka, mag. farm.. Spektroskopske meritve so opravili na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo in Fakulteti za Farmacijo Univerze v Ljubljani. *In vitro* testiranja na bakterijske transpeptidaze so izvedli na centru za proteinski inženiring v Liège-u (University of Liège, Belgija).

Zahvala

Za usmerjanje raziskovalnega dela, strokovni pregled in konstruktivne pripombe na diplomsko delo se iskreno zahvaljujem mentorju prof. dr. Stanislavu Gobcu ter somentorju asist. dr. Samotu Turku. Samotu se zahvaljujem tudi za izvedbo računalniških študij sidranja. Za pomoč in praktične nasvete pri eksperimentalnem delu iskrena zahvala tudi Izidorju Sosiču, Damijani Zalar in ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko kemijo.

Hvala staršem, sestri in prijateljem za vso podporo tekom študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca in somentorstvom asist. dr. Samota Turka.

Nuša Trošt

VSEBINA

POVZETEK	i
ABSTRACT	ii
SEZNAM OKRAJŠAV	iii
1. UVOD	1
1.1 RAZVOJ PROTIBAKTERIJSKIH UČINKOVIN.....	1
1.2 REZISTENCA.....	3
1.3 BAKTERIJSKA CELIČNA STENA IN PEPTIDOGLIKAN	5
1.3.1 Celična stena.....	5
1.3.2 Struktura peptidoglikana	6
1.3.3 Biosinteza peptidoglikana.....	8
1.4 BAKTERIJSKE TRANSPEPTIDAZE KOT POTENCIALNE TARČE PROTIBAKTERIJSKIH UČINKOVIN	10
1.4.1 Penicilin vezovi proteini	10
1.4.2 Rezistentne oblike transpeptidaz	11
1.4.2.1 Transpeptidaza PBP5fm iz bakterije <i>Enterococcus faecium</i>	12
1.4.2.2 Transpeptidaza PBP2a iz bakterije <i>S. aureus</i>	13
1.4.3 Načrtovanje nekovalentnih inhibitorjev transpeptidaz.....	15
2. NAMEN DELA.....	17
3. MATERIALI IN METODE.....	18
4. EKSPERIMENTALNO DELO	21
4.1 UVEDBA METILNE ZAŠČITE NA KARBOKSILNO KISLINO	21
4.2 TVORBA SULFONAMIDNE VEZI	22
4.3 ALKALNA HIDROLIZA	37
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	48
5.1 KOMENTAR K SINTEZNIM POSTOPKOM	48

5.1.1	Uvedba metilne zaščite na karboksilno skupino.....	48
5.1.2	Tvorba sulfonamidne vezi	48
5.1.3	Alkalna hidroliza	51
5.2	REZULTATI BIOLOŠKEGA TESTIRANJA SPOJIN	51
5.3	REZULTATI SIDRANJA NA ENCIM PBP2A	59
6.	SKLEP.....	61
7.	LITERATURA.....	62

POVZETEK

Bliskovit razvoj protibakterijskih učinkovin v drugi polovici prejšnjega stoletja je pomenil velik napredek za človeštvo. Stopnja smrtnosti zaradi infekcijskih bolezni je močno padla in zdelo se je, da smo v boju s patogeni izšli kot zmagovalci. Zaradi prevelike in velikokrat neutemeljene uporabe antibiotikov pa smo si prednost pred bakterijami zapravili. Bakterijski sevi, ki so hkrati odporni na več različnih razredov antibiotikov, predstavljajo danes velik javno-zdravstveni problem. Zato je potreba po novih protibakterijskih učinkovinah zelo velika.

Zaviranje sinteze celične stene bakterij je dobro poznan mehanizem delovanja različnih antibiotikov. V sintezi peptidoglikana, ki je glavna komponenta celične stene, sodeluje veliko encimov, in vsi predstavljajo potencialne tarče protibakterijskih učinkovin. Daleč najbolj poznana tarča pa so verjetno bakterijske transpeptidaze, na katere delujejo β -laktamski antibiotiki. Bakterije so se na β -laktame, ki delujejo kot kovalentni inhibitorji, dobro prilagodile. Eden izmed mehanizmov rezistence je tudi pridobitev transpeptidaz z nizko afiniteto do β -laktamov. Zaradi spremenjenih struktur transpeptidaznih domen je tvorba kovalentnega kompleksa med encimom in β -laktami ovirana, to pa seveda pomeni manjšo učinkovitost antibiotikov. Glavni namen diplomske naloge je bil pripraviti spojine z drugačnim tipom inhibicije transpeptidaz. Sintetizirali smo 15 sulfonamidnih spojin, ki delujejo kot nekovalentni inhibitorji transpeptidaz. Spojine smo pripravili iz različnih sulfonil kloridov, nanje pa smo pripenjali derivate anilina. V kolikor je bilo potrebno, smo v naslednji stopnji še hidrolizirali metilni ester do karboksilne kisline.

Spojine smo testirali na 3 različne transpeptidaze, in sicer PBP2a iz sevov MRSA, PBP5fm iz sevov *E. faecium* ter PBP1b iz sevov *S. pneumoniae*. Prva dva encima sta primera rezistentnih oblik transpeptidaz. Najboljše rezultate smo dobili na encimu PBP2a. Spojine so bile nekoliko slabši inhibitorji PBP1b encima, na encim PBP5fm pa ni delovala nobena od spojin. Kljub temu, da so sintetizirane spojine izkazovale le zmerno inhibitorno aktivnost (IC_{50} vrednosti so bile okrog 100 μM oziroma več), pa kot nekovalentni inhibitorji predstavljajo pomembno izhodišče za nadaljnjo optimizacijo in razvoj v učinkovita protibakterijska sredstva.

ABSTRACT

Fast development of antibacterial agents in the second half of the 20th century resulted in remarkable advances for humanity. The rate of mortality caused by infectious diseases has decreased dramatically and it appeared as we were the winners in the battle against pathogens. However, due to excessive and often improper use of antibiotics, all the advantage against bacteria has been lost. Multi-drug resistant bacterial strains nowadays represent a serious public-health problem. Therefore, the need for new antibacterial agents is very high.

Inhibition of bacterial cell wall synthesis is a well-known mechanism of action of various antibiotics. In the synthesis of peptidoglycan, which is a major component of the cell wall, a lot of enzymes are involved and all of them are potential targets for antibacterial agents. Bacterial transpeptidases, which are inhibited by β -lactam antibiotics, represent the most important target for drug discovery. β -lactams act as covalent inhibitors, however bacteria have already become adapted to them. One of the mechanisms of bacterial resistance is also the utilization of β -lactam insensitive transpeptidases. Due to altered structure of transpeptidase domain, the covalent complex formation between enzyme and β -lactams is hindered, resulting in less effective antibiotics. The main purpose of this thesis was to prepare compounds with different mode of inhibition of transpeptidases. 15 sulphonamide compounds, which act as non-covalent inhibitors of transpeptidases, have been synthesized. Compounds were prepared from different sulfonyl chlorides, which were coupled with different derivatives of aniline. When necessary, methyl ester was hydrolyzed to carboxylic acids in the next stage.

Compounds were tested for inhibition of three different transpetidases: PBP2a from MRSA strains, PBP5fm from *E. faecium* strains, and PBP1b from *S. pneumoniae* strains. The first two enzymes are representatives of resistant types of transpeptidases. Most promising results were obtained on PBP2a enzyme. The compounds were slightly weaker PBP1b inhibitors and none of the compounds were active on PBP5fm enzyme. Despite the fact that the synthesized compounds exhibit moderate inhibitory activity (IC_{50} values were around 100 μ M or more), as non-covalent inhibitors they represent an important starting point for further optimization and their development into effective anti-bacterial agents.

SEZNAM OKRAJŠAV

AcOH	ocetna kislina
Ala	alanin
Asn	asparagin
CDCl ₃	devteriran kloroform
(CD ₃) ₂ CO	devteriran aceton
CH ₂ Cl ₂	diklorometan
d	dublet
dd	dublet dubleta
ddd	dublet dubleta dublet
DMSO	dimetil sulfoksid
DMSO-d ₆	devteriran dimetil sulfoksid
dt	dublet tripleta
ESI	»electrospray« ionizacija
Et ₃ N	trietilamin
EtOAc	etilacetat
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
Glu	glutaminska kislina
Gly	glicin
His	histidin
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti
HRMS	masna spektroskopija visoke ločljivosti

IC_{50}	koncentracija inhibitorja, ki zniža delovanje encima na polovico
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitvena konstanta
Lys	lizin
m	multiplet
mDAP	mezo-diaminopimelinska kislina
mM	mili mol/l (molarnost)
MDR	multidrug resistant (rezistenca na več zdravil)
MDRP	na več razredov antibiotikov odporen <i>P. aureginosa</i>
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MRSA	na meticilin odporen <i>S. aureus</i>
MS	masna spektroskopija
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NMR	jedrska magnetna resonanca
PBP	penicillin vezovi proteini
PRSP	na penicilin odporen <i>S. pneumoniae</i>
RA	rezidualna aktivnost
R_f	retencijski koeficient
s	singlet
Ser	serin
t	triplet

THF	tetrahidrofuran
Thr	treonin
TLC	tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
Tyr	tirozin
Val	valin
VRE	na vankomicin odporni enterokoki
δ	kemijski premik
λ	valovna dolžina

1. UVOD

Protibakterijske učinkovine, njihovo odkritje, razvoj in uvedba v splošno klinično prakso, so pomenile dramatične spremembe za zdravljenje infekcijskih bolezni ter tudi za usodo človeka (1). Delujejo po principu selektivne toksičnosti, kar pomeni, da posegajo v procese ključne za rast in preživetje bakterij, hkrati pa niso škodljive za gostitelja (evkariotsko celico). Protibakterijske učinkovine delimo na antibiotike, ki so naravnega oziroma polsinteznega izvora ter sintezne kemoterapeutike (2).

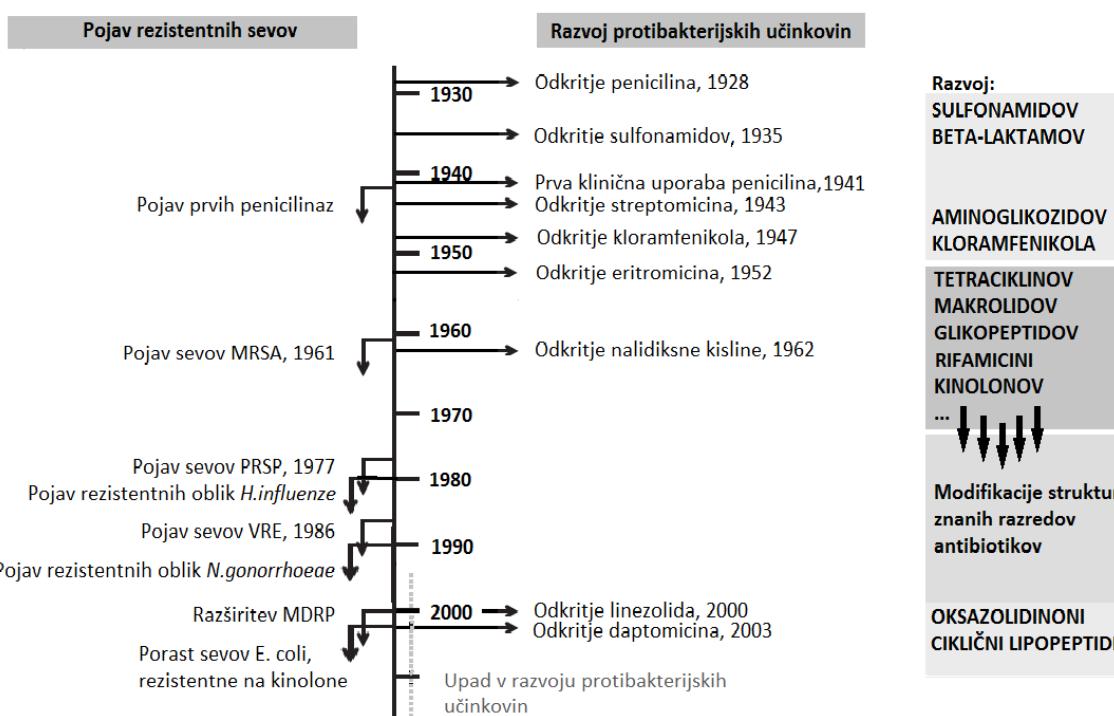
1.1 RAZVOJ PROTIBAKTERIJSKIH UČINKOVIN

Zdravljenje bakterijskih okužb je vse do 20. stol. temeljilo na principih tradicionalne medicine. Nenaden pojav, hiter razvoj in pa nepoznavanje etiologije infekcijskih bolezni, so bili razlogi, zakaj so se zdravljenja največkrat končala neuspešno. Korak naprej k razumevanju problematike zdravljenja so prispevala doganja mikrobiologov s konca 19. stoletja. Odkritje, da so mikroorganizmi povzročitelji infekcijskih bolezni, je omogočilo razvoj racionalnejše terapije. Nova strategija boja proti infekcijskim boleznim je tako postala ciljana, proti mikroorganizmom usmerjena kemoterapija (1, 3).

Prva protibakterijska učinkovina je bila salvarsan. Razvil jo je Ehrlich leta 1910 in se je uporabljala za zdravljenje sifilisa. Sulfonamidi so prišli v uporabo v tridesetih letih prejšnjega stoletja. Penicilin, kot izjemno učinkovito in varno zdravilo, pa je v splošno klinično prakso prišel šele dobro desetletje kasneje, po odkritju leta 1928 (Fleming) (1, 3). S tem pa se je razvoj protibakterijskih učinkovin komaj začel. V naslednjih dvajsetih letih je tržišče doseglo vse več novih razredov antibiotikov oz. kemoterapeutikov, odkritja katerih v kronološkem zaporedju prikazuje slika 1. Velik nabor protibakterijskih učinkovin z različnimi mehanizmi delovanja, je imel vpliv na zmanjšanje obolenosti in smrtnosti ljudi zaradi patogenih bakterij in ustvaril prepričanje, da bodo infekcijske bolezni v kratkem premagane (1, 3, 4).

Vendar pa se optimistične napovedi niso uresničile. Kot odgovor na široko uporabo antibiotikov oz. kemoterapeutikov v zadnjih 60 letih so mikroorganizmi razvili številne mehanizme odpornosti. Precejšnjo skrb vzbujajo predvsem sevi, ki so hkrati odporni na več skupin protibakterijskih zdravil. Čeprav bi bili novi razredi antibiotikov zelo dobrodošli, je dejanska situacija ravno nasprotna. Vse od leta 1970 pa do danes, sta bili

registrirani le dve učinkovini, ki predstavljata dva nova razreda antibiotikov in s tem nova mehanizma delovanja. Gre za linezolid (oksazolidinoni) ter daptomicin (ciklični lipopeptidi) in sta namenjena zdravljenju okužb z gram pozitivnimi bakterijami (4, 5, 6, 7). Ostala protibakterijska zdravila, ki so bila v tem času uvedena na trg, pa so le spojine z modificiranimi osnovnimi skeleti, značilnimi za posamezne razrede. Te spojine naj bi imele boljše farmakodinamične lastnosti, večjo varnost, širši spekter delovanja in/ali večjo protimikrobnou aktivnost (1, 4). Prav zaradi tega nam danes že primanjkuje takšnih protibakterijskih učinkovin, ki bi bila učinkovita proti MDR sevom (ang. multidrug resistant), ki so hkrati odporni na več razredov antibiotikov.



Slika 1: S prvimi protibakterijskimi učinkovinami na trgu so se začeli pojavljati tudi prvi rezistentni sevi bakterij. MRSA – na meticilin odporen *S. aureus*; PRSP – na penicilin odporen *S. pneumoniae*; VRE – na vankomicin odporni enterokoki; MDRP – na več razredov antibiotikov odporen *P. aeruginosa* (1, 3, 6).

Vzrok za upad novih protibakterijskih entitet na trgu je prav gotovo postopno umikanje farmacevtske industrije s področja razvoja protibakterijskih učinkovin. Stroga regulativa pri razvoju novih antibiotikov, dejstvo, da je večina tarč, ki omogočajo selektivno toksičnost že poznanih ter omejevanje uporabe novih antibiotikov (kot preventivni ukrep, da se ne bi nanje prehitro razvila rezistenca) so glavni, ne pa tudi edini razlogi, da je

področje protibakterijskih zdravil postalo ekonomično manj privlačno. Ključen razlog pa so zaslužki farmacevtskih podjetij, ki so pri razvoju zdravil za kronične bolezni veliko večji (7, 8). Čeprav situacija na prvi pogled ni najboljša (upad protibakterijskih učinkovin na eni strani, na drugi strani pa porast rezistentnih sevov), optimizem vzbuja podatek, da so bile s sekveniranjem bakterijskega genoma odkrite nekatere nove tarče, npr. peptidna deformilaza. Prvi inhibitorji le-teh pa so že v različnih fazah kliničnih testiranj (7).

Glede na mehanizem delovanja in kemično zgradbo protibakterijskih učinkovin ločimo 5 glavnih skupin (2, 9):

- (i) zaviralci sinteze celične stene (β -laktami, glikopeptidni antibiotiki...),
- (ii) zaviralci sinteze bakterijskih proteinov (aminoglikozidi, tetraciklini, makrolidi...),
- (iii) zaviralci sinteze nukleinskih kislin (kinoloni, rifampicin...),
- (iv) zaviralci metabolizma folne kisline (sulfonamidi, trimetoprim),
- (v) zaviralci funkcije plazemske membrane (polimiksini).

1.2 REZISTENCA

»Verjetno ni kemoterapeutika, proti kateremu bakterija v ustreznih okoliščinah ne bi mogla razviti odpornosti« (10).¹

Alexander Fleming, 1946

S prekomerno in nepravilno rabo protibakterijskih učinkovin smo na patogene izvajali selekcijski pritisk in s tem pospešili razvoj sevov odpornih na enega ali več (razredov) antibiotikov. Bakterije so sposobne neverjetnega evolucijskega prilagajanja. Spontane mutacije v genomu bakterij so sicer redke (1 mutacija na 10^7 bakterij), vendar če upoštevamo, da je v enem infekcijskem ciklu tudi do 10^{10} bakterij, se verjetnost ugodne genske spremembe, ki bakteriji omogoča preživetje, precej poveča. Zaradi kratkega generacijskega časa (hitrega razmnoževanja) in pa izjemno učinkovitih načinov prenosa oziroma izmenjave genskega materiala pa se informacija tudi hitro razširi (12). Sam prenos

¹ "There is probably no chemotherapeutic drug to which in suitable circumstances the bacteria cannot react by in some way acquiring 'fastness' [resistance]."

ni omejen samo na bakterije istega rodu, ampak se lahko dogaja tudi med evolucijsko zelo oddaljenimi organizmi, kot so gram pozitivne in gram negativne bakterije (10).

Poznamo dva tipa rezistence, prirojeno in pridobljeno. **Intrinzično** oziroma **prirojeno odpornost** določajo geni, ki so že naravno prisotni na bakterijskem kromosomu (10). Povedano drugače, prirojeno odpornost ima tista vrsta bakterij, ki je že naravno odporna, brez kakršnihkoli dodatnih genskih modifikacij. Tipičen primer je *Pseudomonas aeruginosa*, ki visoko intrinzično rezistenco dosega s kombinacijo slabo permeabilne zunanje membrane, učinkovitih membranskih črpalk in pa kromosomsko kodiranih β -laktamaz (11). Za razvoj **pridobljene odpornosti** pa je ključna izpostavitev antibiotiku, ki tako tvori selekcijski pritisk na bakterijske celice. Tako izzove različne mehanizme prilagajanja - mutacije znotraj bakterijskega genoma (v genih, ki jih ciljajo antibiotiki) in/ali prenos determinant rezistence s pomočjo plazmidov, bakteriofagov in transpozonov (gre za t.i. horizontalni prenos med bakterijami). Mehanizmi pridobljene odpornosti, po katerih bakterije obidejo delovanje protibakterijskih učinkovin, se razlikujejo glede na razred antibiotika in glede na vrsto bakterije. Najpomembnejši med njimi so (10, 11, 12, 13):

- (i) Zmanjšan privzem učinkovine v celico oziroma zmanjšana permeabilnost zunanje membrane (npr. mutirani porini v enterobakterijah).
- (ii) Aktivno izčrpavanje antibiotika iz bakterijske celice s pomočjo membranskih črpalk (npr. prisotnost tetraciklina je v *E. coli* povzročila tandem duplikacijo acrAB lokusa in s tem preveliko izražanje AcrAB membranske črpalke).
- (iii) Sprememba tarčnega proteina oziroma prijemališča za učinkovine (npr. rezistenco na vankomicin nekateri enterokoki dosežejo tako, da konec pentapeptida, D-Ala-D-Ala, kamor se veže vankomicin, zamenjajo z depsidipeptidom, D-Ala-D-laktat, do katerega ima antibiotik 1000x manjšo afiniteto; tudi modifikacije v strukturi PBP-jev sodijo v to skupino).
- (iv) Pridobitev gena, ki kodira alternativni encim oziroma alternativno pot (npr. sevi MRSA so prek horizontalnega prenosa pridobili gen *mecA*, ki kodira na meticilin-odporen PBP2a; primer je tudi zapis za encim dihidropteroat sintaza, ki je neobčutljiv na delovanje trimetoprima in sulfonamidov).
- (v) Inaktivacija antibiotika z encimi (npr. β -laktamaze povzročijo hidrolizo laktamskega obroča penicilinov, cefalosporinov in karbapenemov (imipenem); inaktivacija

aminoglikozidov poteka prek acetilacije amino skupin ter prek fosforilacije in adenilacije hidroksilnih skupin antibiotika).

Danes predstavljajo odporne patogene bakterije že velik javno-zdravstveni problem. Najbolj problematični so seveda MDR sevi ozziroma t.i. superbakterije, ki so prek izmenjave genskega materiala pridobile več mehanizmov odpornosti. Tipične predstavnike označuje kratica ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* in *Enterobacter spp.*). Zaskrbljujoče pa je dejstvo, da bo visoko odpornih sevov lahko kmalu še bistveno več. Zadnja poročila strokovnjakov namreč pričajo o pojavu novih vrst encimov, ki lahko hkrati deaktivirajo različne razrede antibiotikov in se že prenašajo med bakterijami s pomočjo prenosljivih genskih elementov. NDM-1 (ang. New Delhi metallobeta-lactamase) je primer metalo β -laktamaze, ki povzroča hidrolizo β -laktamskega obroča pri penicilinih, cefalosporinih in tudi pri karbapenemih. Metilaza iz stafilokokov pa z modifikacijo bakterijskega ribosoma hkrati deaktivira kar pet različnih razredov antibiotikov s prijemališčem na ribosomu (linezolid, kloramfenikol, klindamicin, streptogramin B in pleuromutilini). Med njimi je tudi linezolid, ki je do nedavnega veljal za enega redkih še učinkovitih orožij proti okužbam z na meticilin odpornim *S. aureus* (14).

1.3 BAKTERIJSKA CELIČNA STENA IN PEPTIDOGLIKAN

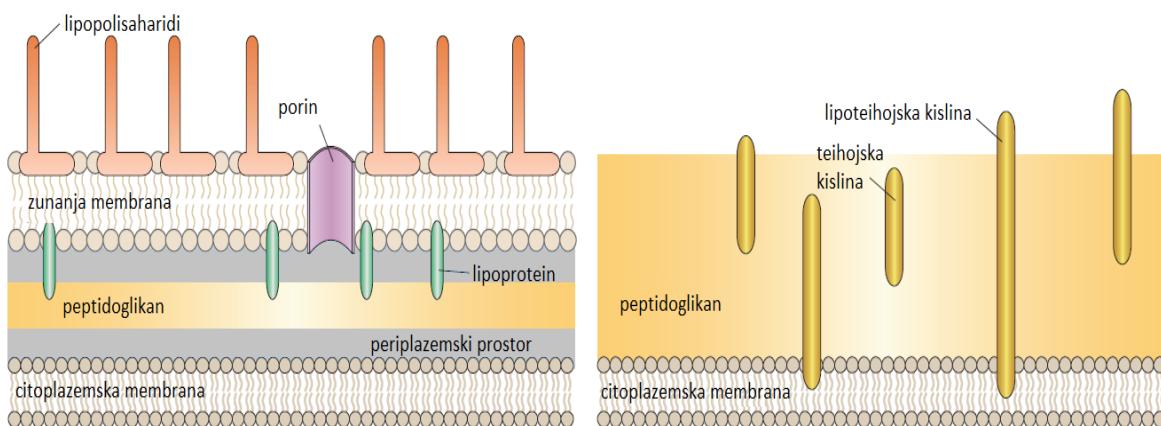
1.3.1 Celična stena

Bakterijska celična stena je kompleksna makromolekularna struktura, ki obdaja bakterije in opravlja številne funkcije:

- (i) kot polprepustna bariera omogoča prehod le želenim snovem v celico,
- (ii) zagotavlja dovolj močno mehansko oporo, ki zaščiti celico pred lizo, ko pride do sprememb v okoliškem osmotskem tlaku (hipotonična raztopina),
- (iii) varuje bakterijo pred prebavo z gostiteljevimi encimi,
- (iv) vzdržuje (konstantno) obliko celic,
- (v) sodeluje pa tudi pri celični delitvi in rasti (3, 15).

Celična stena je torej ključnega pomena za preživetje bakterij, s tem pa tudi zanimiva tarča za protibakterijske učinkovine. Glavna komponenta celične stene je peptidoglikan in večina protibakterijskih učinkovin deluje tako, da blokira njegovo biosintezo. Ker je specifičen za bakterije, v sesalskih celicah ga ne najdemo, to omogoča selektivno toksičnost (3).

Po zgradbi celične stene delimo bakterije na po Gramu pozitivne ter po Gramu negativne. Za celično steno prvih je značilen debel, večslojni peptidoglikan (20 – 80 nm), v katerega so vključeni še anionski polisaharidi (molekule teihohajske in lipoteihohajske kisline). Zgradba celične stene pri po Gramu negativnih bakterijah pa je kompleksnejša, kar je tudi razlog, da nekatere protibakterijske učinkovine nanje ne delujejo. Sestavlja jo: periplazemski prostor v katerem so razni encimi, tanek - le nekaj slojen peptidoglikan (1-7 nm) in pa zunanja membrana, skupaj z lipopolisaharidi (slika 2) (2, 16).



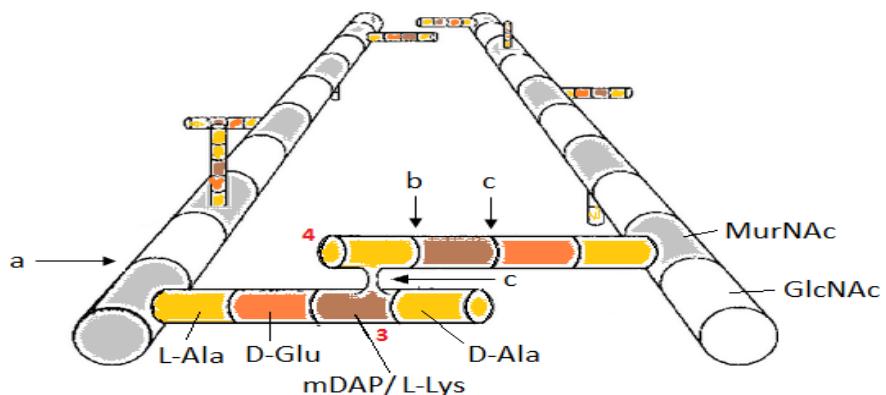
Slika 2: Zgradba celične stene pri po Gramu negativnih (levo) ter pozitivnih (desno) bakterijah (16).

1.3.2 Struktura peptidoglikana

Peptidoglikan, drugače imenovan tudi murein, je heteropolimer, ki ga gradijo linearne polisaharidne verige (glikanska vlakna). Slednje medsebojno prečno povezujejo kratki peptidi. Verige glikana so sestavljene iz izmenjujočih se enot *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc), dolžina verig pa med bakterijskimi vrstami močno varira. Na primer, povprečna dolžina glikanskih vlaken pri *S. aureus* je 18 disaharidnih enot, pri nekaterih vrstah bacilov pa tudi do 250. Ne glede na dolžino verige, so sladkorne enote medsebojno povezane z β -1,4 glikozidno vezjo. Peptidi, ki prečno

povezujejo glikanska vlakna v makromolekularno mrežo, so prek amidnih vezi pritrjeni na D-laktoilne skupine vseh MurNAc ostankov. Ti peptidi štejejo 5 aminokislin v nastajajočem in 4 aminokisline v izgrajenem peptidoglikanu in imajo značilno sestavo: L-alanin, D-glutaminska kislina, mezo-diaminopimelinska kislina (pri večini gram-negativnih bakterij) ali L-lizin (večina gram-pozitivnih bakterij) ter dve oziroma ena enota D-alanina. Samo zaporedje aminokislin je včasih lahko tudi drugačno in je odvisno od specifičnosti encimov, ki pripenjajo aminokisline v peptidno verigo. Omenjeni encimi so t.i. ligaze Mur (MurC, MurD, MurE, MurF), ki sodelujejo v prvi fazi biosinteze peptidoglikana (slika 4). Variacije se pojavljajo predvsem na tretjem mestu pentapeptida. Poleg mezo-diaminopimelinske kislino in L-lizina se lahko pojavijo tudi L-homoserin, L-diaminobutanojska kislina, mezo-lantionin, L-ornitin itd. (15)

Prečne povezave glikanskih vlaken potekajo s peptidi (slika 3). Dve peptidni verigi se med seboj povežeta preko aminokisline (D-alanin), ki je na četrtem mestu prve verige ter aminokisline (mezo-diaminopimelinska kislina ali L-lizin), ki je na tretjem mestu druge peptidne verige (slika 3). Pri po Gramu negativnih bakterijah je ta povezava večinoma direktna, pri po Gramu pozitivnih mikroorganizmih pa se med omenjenima aminokislinsama pojavlja še vmesni peptidni most (sestavlja ga nekje med 1 – 7 aminokislin). Npr. pri *Staphylococcus aureus* je peptidni most sestavljen iz petih glicinskih ostankov (15).



Slika 3: **Struktura bakterijskega peptidoglikana.** S puščicami so označena mesta delovanja nekaterih encimov: a) *N*-acetilglukozaminidaze, b) karboksipeptidaze, c) endopeptidaze. (L-Ala:L-alanin; D-Glu: D-glutaminska kislina; mDAP: mezodiaminopimelinska kislina; L-Lys:L-lizin; D-Ala:D-alanin) (16).

Obstaja več mehanizmov, ki privedejo do dodatnih razlik v strukturi peptidoglikana med posameznimi bakterijskimi vrstami. Mednje spadajo: (i) sekundarne modifikacije

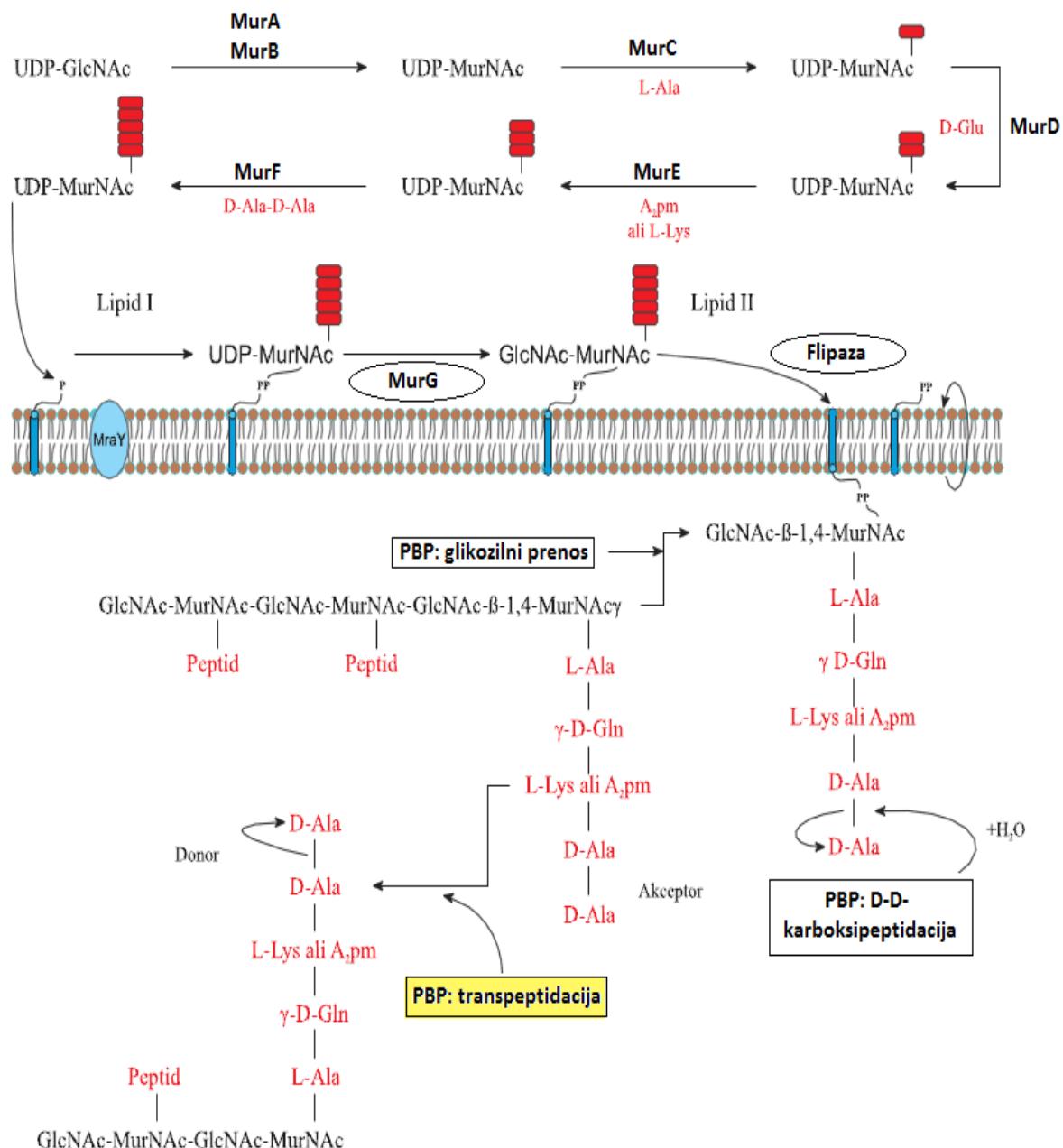
glikanskih vlaken (na sladkorjih lahko pride do *N*-deaciliranja, *O*-aciliranja in *N*-glikoziliranja), (ii) spremembe na peptidih (vezava raznih skupin, kot so npr. krajši proteini, omogoča nastanek bolj »razvejanega« peptidoglikana, ki ga povezujejo z večjo stopnjo odpornosti) ter (iii) modifikacije zaradi delovanja specifičnih encimov (npr. *N*-acetilglukozaminidaza lahko iz glikanske verige odcepi MurNAc ostanek, glikanska vlakna pa se tako zaključijo z GlcNAc) (15).

1.3.3 Biosinteza peptidoglikana

Biosinteza peptidoglikana, predstavljena na sliki 4, je kompleksen proces, ki vključuje približno 20 encimsko kataliziranih kemijskih pretvorb (število zavisi od mikroorganizma). Poteka na treh mestih v bakterijski celici, vsako mesto pa lahko predstavlja tudi svojo fazo. Začne se v citoplazmi, kjer se iz primarnega substrata, fruktoze-6-fosfata, tvorita gradnika peptidoglikana, t.j. UDP-*N*-acetilglukozamin ter UDP-*N*-acetilmuramil-pentapeptid. Notranja stran citoplazemske membrane je mesto, kjer se gradnika pritrdira na membranski akceptor baktoprenol (ali undekaprenil fosfat). Gre za lipidni nosilec, ki omogoči prenos prekurzorjev hidrofilne narave skozi hidrofobno membrano. Najprej se nanj veže MurNAc-pentapeptid, pri čemer nastane lipid I. Na lipid I pa se nato, preko β -1,4 vezi, veže še GlcNAc in nastane lipid II. Translokacijo lipida II na zunanj stran membrane katalizira specifična translokaza oziroma flipaza. Po prenosu sledi še zadnja faza sinteze peptidoglikana, ki poteka na zunanji strani citoplazemske membrane. V tej fazi pride do polimerizacije osnovnih molekul obeh gradnikov ter vgraditev v obstoječi peptidoglikan. Transglikozilacijo oziroma povezavo sladkornih enot med seboj omogočijo glikoziltransferaze. Pri tem se sprosti molekula undekaprenil-pirofosfata, ki se nato prenese nazaj na citosolno stran membrane, se defosforilira in vrne v prvotno obliko – baktoprenol. Transpeptidaze katalizirajo povezovanje pentapeptidnih delov oziroma transpeptidacijo. Obe reakciji največkrat potekata kar pod katalizo posebne skupine encimov imenovane penicilin-vezoči proteini (ang. penicillin binding proteins, PBP), saj imajo le-ti tako transglikozilazno kot tudi transpeptidazno katalitično aktivnost (17, 18, 19).

Reakcija transpeptidacije: Transpeptidaze prepoznaajo D-alanil-D-alaninski fragment pentapeptidne verige substrata ter se nanj vežejo. Pri tem se odcepi terminalni D-alanin.

Nastali encim-substrat intermediat pa nato reagira z amino skupino, ustrezne dibazne aminokisline, v sosednji peptidni verigi. Tvorí se prečna povezava (17). Struktorna podobnost β -laktamov z D-Ala-D-Ala ostankom omogoča antibiotikom, da se lahko vežejo v aktivno mesto transpeptidaz. Zaradi kovalentne vezave, encim ne more več opravljati svoje funkcije – transpeptidacije, posledica pa je šibko premrežen peptidoglikana in liza bakterijske celice (20).

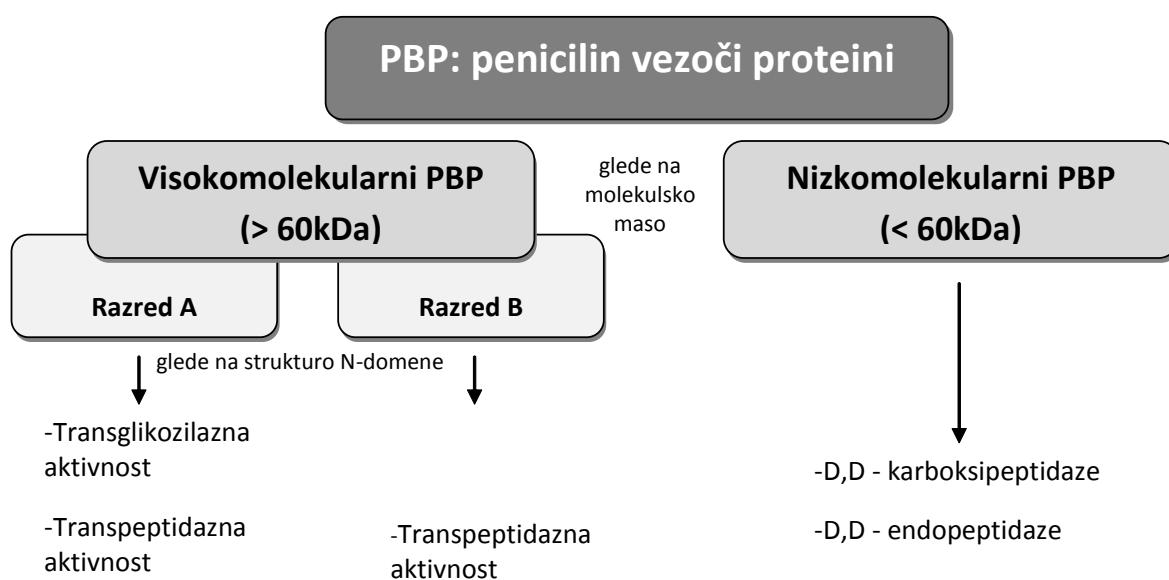


Slika 4: Biosinteza peptidoglikana (18).

1.4 BAKTERIJSKE TRANSPEPTIDAZE KOT POTENCIALNE TARČE PROTIBAKTERIJSKIH UČINKOVIN

1.4.1 Penicilin vezovi proteini

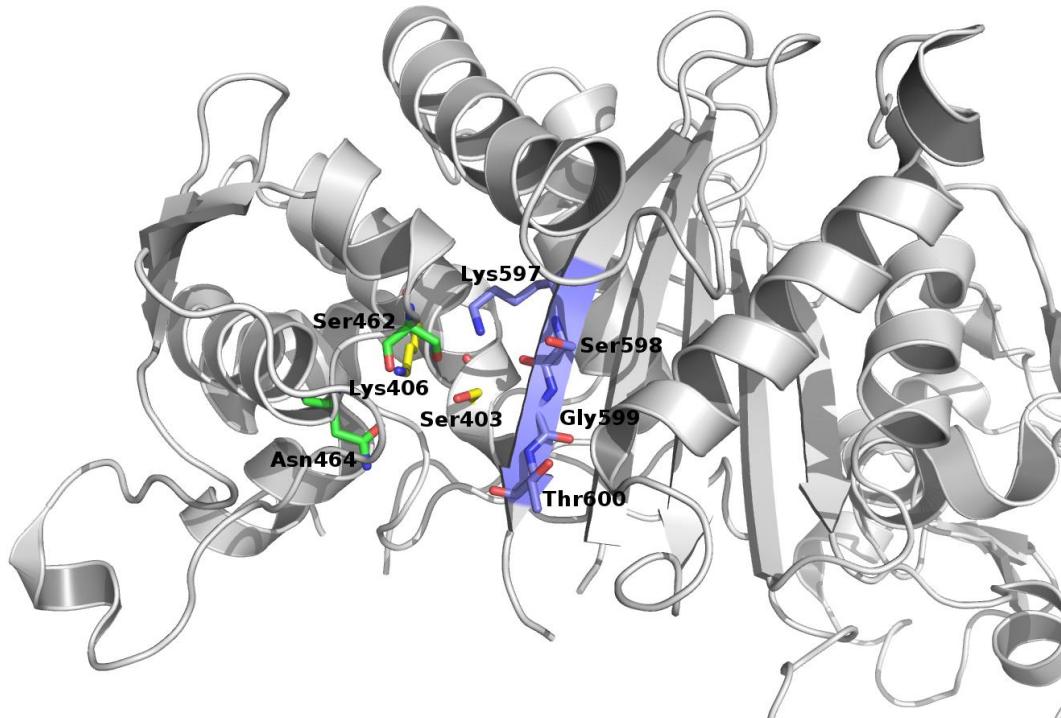
Penicilin vezovi proteini (PBP) so velika skupina encimov, specifičnih za bakterije, na katere delujejo β -laktamski antibiotiki. Nahajajo se na zunanji strani citoplazemske membrane, kjer sodelujejo pri sintezi peptidoglikana. Pomembni so za procese celičnega cikla, kot so celična delitev, rast ter sporulacija (18, 21). Glede na velikost (molekulsko maso) ter strukturo N-terminalne domene lahko PBP encime delimo na tri skupine (slika 5). Visokomolekularni PBP razreda A so bifunkcionalni encimi, ki katalizirajo transglikozilacijo ter transpeptidacijo, medtem ko ima razred B visokomolekularnih PBP le transpeptidazno funkcijo. Med nizkomolekularne PBP prištevamo karboksipeptidaze in endopeptidaze, ki preko cepljenja peptidnih vezi regulirajo mreženje peptidoglikana (20, 21).



Slika 5: Delitev penicilin vezovih proteinov

Visokomolekularni PBP obeh razredov so si topološko precej podobni. Sestavlja jih citoplazemski rep, transmembranski segment ter dve, med seboj povezani zunajcelični domeni. To sta N-terminalna domena, na podlagi katere se visokomolekularni PBP delijo na dodatna dva razreda, ter C-terminalna ozioroma transpeptidazna domena. Za slednjo so značilni trije konservativni ozioroma visoko ohranjeni motivi, ki skupaj določajo aktivno mesto (slika 6). In sicer se prvi motiv (Ser-X-X-Lys) nahaja na α_2 vijačnici na dnu

aktivnega mesta, drugi motiv (Ser(Tyr)-X-Asn) je na levi strani aktivnega mesta na zanki med vijačnicama α_4 in α_5 , tretji motiv (Lys(His)-Thr(Ser)-Gly) pa je na β_3 ploskvi na desni strani aktivnega mesta. S stališča katalize reakcije je najpomembnejša OH skupina serina iz prvega motiva (21, 22). β -laktami prav s to skupino tvorijo stabilen acilni kompleks.



Slika 6: Transpeptidazna domena encima PBP2a z katalitičnimi motivi, ki določajo aktivno mesto. Prvi motiv je obarvan rumeno, drugi motiv je zelen, tretji motiv pa moder.

1.4.2 Rezistentne oblike transpeptidaz

Enterococcus faecium, na penicilin odporen *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) ter na meticilin odporen *Staphylococcus aureus* (MRSA) so primeri visoko rezistentnih sevov bakterij. Glavni mehanizem, s katerim omenjeni patogeni dosežejo odpornost na peniciline in druge β -laktamske antibiotike, ne vključuje membranskih črpalk in pa β -laktamaz, temveč temelji na nekoliko spremenjeni strukturi penicilin vezovih proteinov, natančneje njihove transpeptidazne domene. O tem, kakšne so te modifikacije bomo natančneje govorili v nadaljevanju. Velja pa, da transpeptidaze z nizko afiniteto za vezavo β -laktamov, lahko prevzamejo funkcijo transpeptidacije takrat, ko so ostali »občutljivi« PBP encimi deaktivirani z antibiotikom. Bakterijam tako omogočajo preživetje. Načini, preko

katerih posamezne bakterije pridobijo rezistentne oblike transpeptidaz so si nekoliko različni (21).

S. pneumoniae doseže zmanjšano občutljivost na β -laktame z modifikacijo lastnih PBP encimov (PBP2x, PBP2b in PBP1a). Ti so kodirani z mozaičnimi geni, kar je poleg mutacij glavni vzrok za spremembe v njihovih strukturah. Rezistenca pri *S. aureus* se razvije po pridobitvi *mecA* gena, ki nosi zapis za alternativen, na β -laktame neobčutljiv PBP2a. *MecA* gen, ki se prenaša na mobilnem genetskem elementu SCCmec (ang. staphylococcal cassette chromosome *mec*), bakterija pridobi s horizontalnim prenosom (iz še neznane vrste). Enako funkcijo kot PBP2a ima tudi PBP5fm iz *E. faecium*, z edino razliko v tem, da je encim oziroma transpeptidaza v enterokoku že naravno prisotna. Z dodatnimi mutacijami in čezmernim izražanjem pa se rezistenca le še stopnjuje (21).

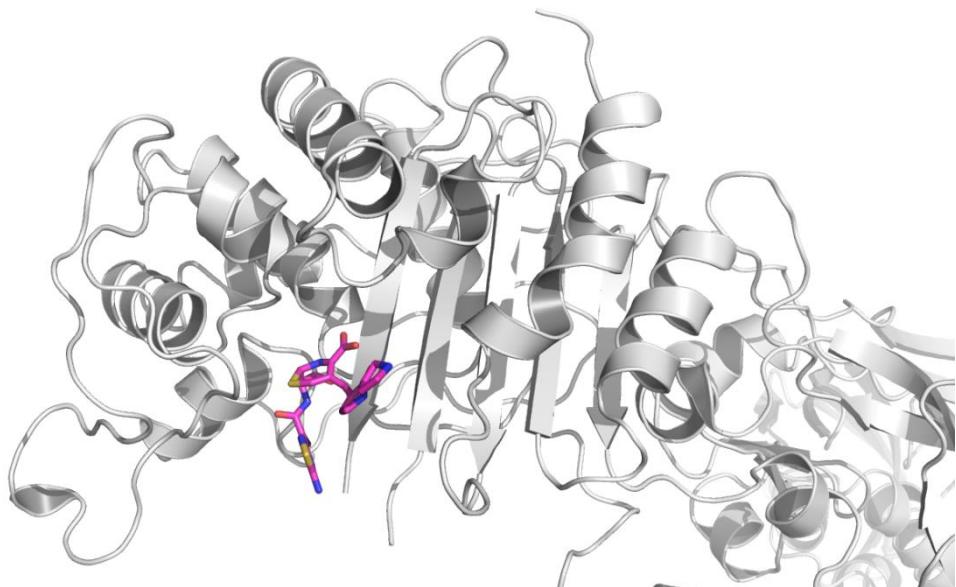
Rezistentne oblike transpeptidaz so odkrili še pri nekaterih drugih bakterijah, kot so: *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori* itd. (21)

1.4.2.1 Transpeptidaza PBP5fm iz bakterije *Enterococcus faecium*

Intrinzična oziroma naravna odpornost na β -laktamske antibiotike je značilnost enterokokov. Za primerjavo, minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) za benzilpenicilin pri neodpornem sevu *S. pneumoniae* znaša 0,02 $\mu\text{g}/\text{ml}$, pri *E. faecium* pa kar 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Rezistenco omogoča na β -laktame neobčutljiva transpeptidaza, imenovana PBP5fm, ki jo uvrščamo med visokomolekularne penicilin vezoge proteine razreda B (slika 7) (21, 23). Glavni vzrok, zakaj ima PBP5fm znižano afiniteto za vezavo β -laktamov, je sterično oviran dostop do aktivnega mesta encima. Aminokislinski ostanek Val465 je usmerjen ravno v žleb aktivnega mesta. Za uspešno vezavo penicilinskega antibiotika se mora nekoliko odmakniti, kar pa zahteva neugodne konformacijske spremembe (rigidnost aktivnega mesta). Vezavo antibiotikov ovira tudi ostanek glutaminske kisline 622, ki se nahaja blizu vhoda v aktivno mesto. Njen negativni naboj odbija negativno nabite antibiotike (23, 18).

Najbolj odporni sevi *E. faecium* imajo MIK vrednosti visoke tudi do 512 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Visoko stopnjo rezistentnosti dosežejo s kombinacijo čezmernega izražanja encima in pa z

mutacijami v strukturi, ki afiniteto do β -laktamov še dodatno znižajo. Primera takih mutacij sta zamenjava metionina na položaju 485 z alaninskim ali treoninskim ostankom ter vstavitev dodatnega serina na položaj 466' (21, 23).



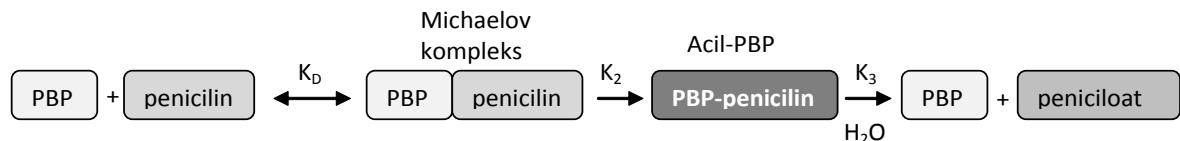
Slika 7: C-terminalna domena PBP5fm z vezanim benzilpenicilinom.

1.4.2.2 Transpeptidaza PBP2a iz bakterije *S. aureus*

PBP2a je 78 kDa velik protein in spada v razred B visokomolekularnih PBP encimov. Zaradi nizke občutljivosti na β -laktame ga terapevtski odmerki antibiotika (za razliko od ostalih PBP encimov) ne deaktivirajo. Izražanje PBP2a je inducibilno in je regulirano preko *mecI/mecR1* regulatornega sistema. To pomeni, da do izražanja pride le ob prisotnosti antibiotika. Takrat PBP2a prevzame transpeptidazno funkcijo in s tem učinkovito sodeluje pri sintezi celične stene (21, 18, 24).

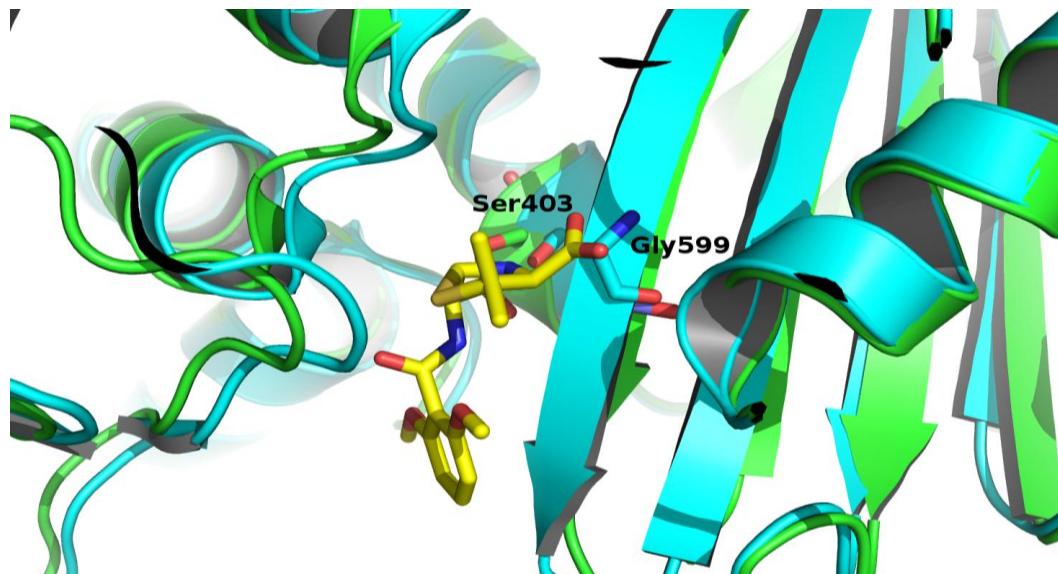
Vezava β -laktamov na PBP encime poteka v skladu z Michaelisovo kinetiko (slika 8). Med encimom ter antibiotikom se najprej tvori nekovalenten Michaelisov kompleks, kar opisuje disociacijska konstanta K_D . Sledi aciliranje in nastanek kovalentnega kompleksa. Od tvorbe le-tega je odvisna učinkovitost antibiotika. Zadnji korak pa je deaciliranje, ki je pri β -laktamih zelo počasno. Študije kinetike so pokazale, da je rezistenca PBP2a na β -laktame posledica nezadostnega aciliranja encima oziroma premajhne tvorbe acil-PBP kompleksa. Hkrati pa je potrebno poudariti, da reverzibilno prileganje antibiotika na

aktivno mesto encima (nastanek Michaelisovega kompleksa) pri PBP2a ni posebej ovirano in poteka v približno enaki meri kot pri drugih PBP encimih. Iz tega sledi, da je problem predvsem v tvorbi kovalentne povezave med antibiotikom in tarčo (24).



Slika 8: **Reakcijska shema, ki prikazuje vezavo penicilina na PBP encim.** K_D je disociacijska konstanta in opisuje nastanek reverzibilnega Michaelisovega kompleksa. k_2 je konstanta aciliranja, opisuje tvorbo acil-PBP kompleksa. k_3 označuje hidrolizo acil-PBP kompleksa (24).

To je potrdila tudi primerjava kristalnih struktur prostega encima in encima z vezanim inhibitorjem (slika 9). Aktivno mesto prostega PBP2a je bolj zaprto, serin v prvem konservativnem motivu (Ser403) pa ni v primernem položaju za nukleofilni napad. Za uspešno aciliranje je zato nujna preureditev aktivnega mesta, to pa je energijsko neugoden korak. Premik β_3 ploskve je potreben zaradi steričnih ovir med karboksilatno skupino antibiotika in pa aminokislinskim ostankom Gly599 v aktivnem mestu encima. S konformacijsko spremembo α_2 vijačnice pa pride katalitični serin v pravi položaj za nukleofilni napad (24, 21).



Slika 9: **Primerjava aktivnega mesta pri prostem PBP2a (turkizna barva) ter pri PBP2a z vezanim meticilinom (zelena barva).** Meticilin je rumene barve. Viden je premik α_2 vijačnice (Ser403) ter β_3 ravnine (Gly599).

Ker za začetno vezavo - tvorbo Michaelisovega kompleksa, preureditev ni potrebna, bi bilo smiselno razviti spojine, ki bi delovale kot nekovalentni inhibitorji.

1.4.3 Načrtovanje nekovalentnih inhibitorjev transpeptidaz

Najbolj uveljavljeni transpeptidazni inhibitorji so β -laktami (penicilini, cefalosporini, karbapenemi in monobaktami). S PBP encimi tvorijo irreverzibilen β -laktam-encim kompleks, ki prepreči normalno reakcijo transpeptidacije, to pa ima za posledico smrt bakterije. Spadajo torej v skupino kovalentnih inhibitorjev. Vse večja odpornost bakterij na β -laktamske antibiotike (predvsem so tu pomembne β -laktamaze in pa PBP encimi s spremenjenim aktivnim mestom) je usmerila raziskave v odkrivanje novih učinkovin. Spojine, ki bi z aktivnim mestom tvorile številne nekovalentne interakcije bi, tudi brez aciliranja encima, lahko delovale kot zelo učinkoviti inhibitorji. Prav tako tudi neugodne konformacijske spremembe v encimu ne bi bile več potrebne. Poleg tega pa bi struktura nekovalentnih inhibitorjev najverjetneje vsebovala le fragmente, ki jih ni moč hidrolizirati, zaradi česar bi bili taki inhibitorji odporni tudi na delovanje β -laktamaz (24, 25).

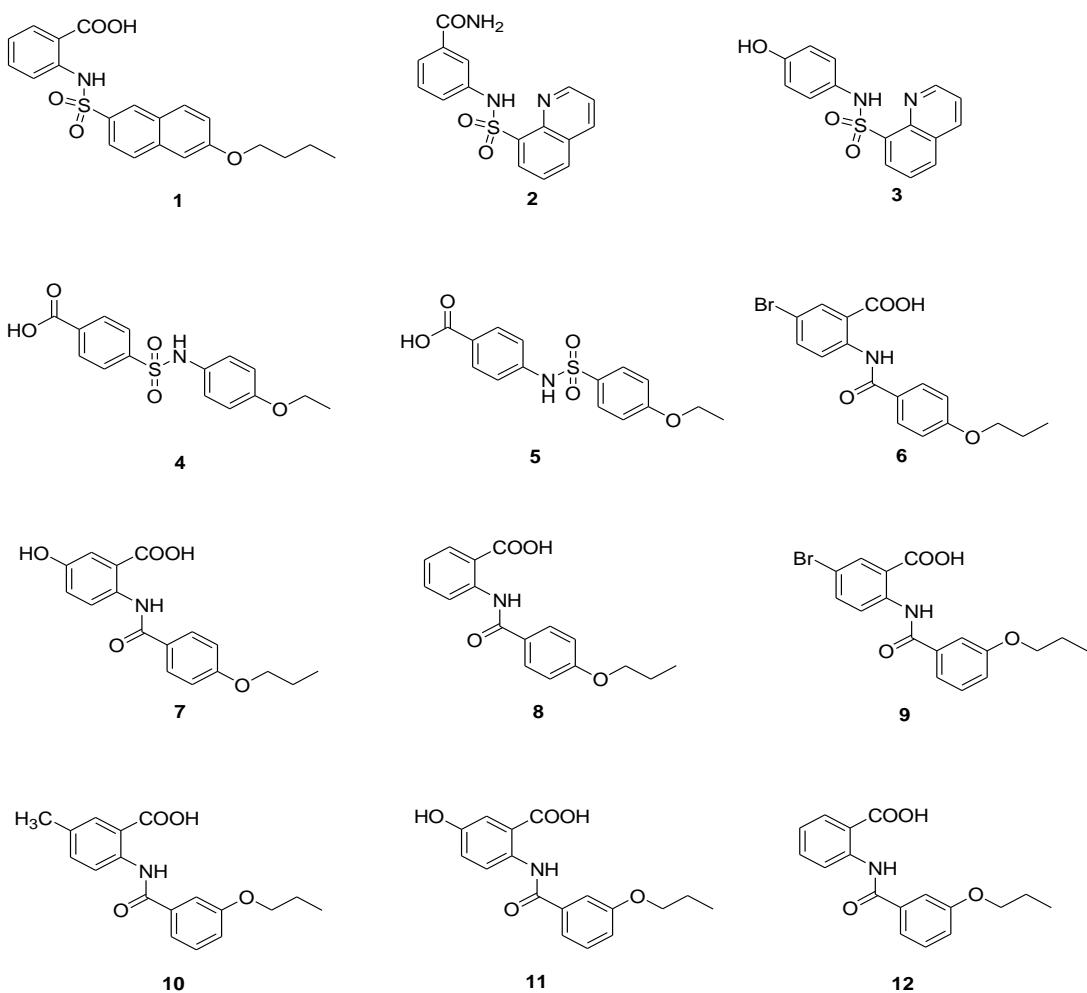
S projektom iskanja nekovalentnih inhibitorjev transpeptidaz so začeli tudi na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. S klasičnim rešetanjem interne knjižnice spojin (ta je vsebovala več kot 250 struktur) so uspešno odkrili inhibitor encima PBP2a, ki je imel vrednost IC₅₀ 97 μM . Začetni zadetek rešetanja so nato uporabili kot predlogo za računalniško-podprto iskanje strukturno sorodnih spojin in s tem prišli do serije novih, nekovalentnih inhibitorjev. Rezultati *in vitro* testiranja spojin na tri PBP encime iz rezistentnih sevov bakterij, so bili sledeči: pet spojin je delovalo na PBP2a iz sevov MRSA, dve sta bili aktivni na PBP2x 5204 iz *S. pneumoniae* ter ena na PBP5fm iz sevov *E. faecium* (preglednica I) (25, 26).

Preglednica I: **Rezultati testiranja spojin na PBP encime iz rezistentnih sevov.** RA vrednosti so bile določene pri koncentraciji inhibitorja 1mM; pri izjemah označenih z ** pa pri koncentraciji 500 μM (25).

Spojina	PBP2a RA [%] (IC ₅₀)	PBP2x5204 RA [%] (IC ₅₀)	PBP5fm RA [%] (IC ₅₀)
1	0 (97 μM)	38** (391 μM)	100
2	58	123	39 (930 μM)
3	67	80	65
4	83	101	100
5	86	81	73

6	0 (210 μ M)	41	68
7	74	65	72
8	60	103	74
9	0 (230 μ M)	8** (155 μ M)	72
10	17 (680 μ M)	121	69
11	70	118	61
12	47 (910 μ M)	97	34 (>1 mM)

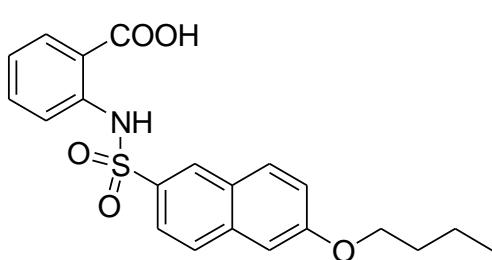
Spojini z najboljšo inhibitorno aktivnostjo na PBP2a ter PBP5fm (spojini 1 in 2) smo izbrali kot izhodišče za nadaljnje delo. Ideja je bila, da bi z manjšimi modifikacijami strukture prišli še do učinkovitejših, boljših inhibitorjev bakterijskih transpeptidaz. Te spojine bi delovale kot reverzibilni kompetitivni inhibitorji, torej bi s substratom encima tekmovale za vezavo na aktivno mesto. V primeru, da bi bila afiniteta teh nekovalentnih inhibitorjev zelo velika, tudi visoke koncentracije substrata ne bi zmanjšale njihovega učinka (27).



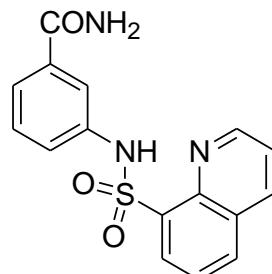
Slika 10: Strukture spojin iz preglednice I (25).

2. NAMEN DELA

Namen diplomskega dela je načrtovanje in sinteza novih sulfonamidnih spojin, ki bi delovale kot inhibitorji bakterijskih transpeptidaz. V literaturi sta spojini 1 in 2 opisani kot primera nekovalentnih inhibitorjev in delujeta na rezistentne oblike transpeptidaz, prva na PBP2a iz sevov na meticilin odpornega *S. aureus*, druga pa na PBP5fm iz sevov *E. faecium*. V okviru diplomskega dela bomo pripravili različne derivate obeh spojin, v upanju, da bomo s tem še okreplili nekovalentne interakcije z aktivnim mestom oziroma povečali moč vezave.



1. IC_{50} (PBP2a) = 97 μM



2. IC_{50} (PBP5fm) = 930 μM

Slika 11: Strukturi zadetkov 1 in 2.

Izhajali bomo iz štirih različnih sulfonil kloridov (8-kinolinsulfonil klorida, 2-naftalensulfonil klorida, 1-naftalensulfonil klorida ter denzil klorida) na katere bomo pripenjali derivate anilina. Ti bodo imeli karboksilno skupino zaščiteno v obliki estra. V naslednjem koraku bomo zaščito odstranili.

V sodelovanju s centrom za proteinski inženiring iz Liège-a (Centre for Protein Engineering, University of Liège, Belgija) bomo spojinam določili inhibitorno aktivnost na transpeptidaze PBP2a (MRSA), PBP5fm (*E. faecium*) ter PBP1b (*S. pneumoniae*). Rezultati bodo podani kot rezidualna aktivnost na izbranem encimu. V primeru aktivnih spojin bo določena tudi IC_{50} vrednost. Aktivne spojine bomo še z metodo sidranja umestili v aktivna mesta encimov in preko tega skušali ugotoviti način njihove vezave.

3. MATERIALI IN METODE

Reagenti in topila

Pri eksperimentalnem delu diplomskega dela smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Acros Organics, Sigma - Aldrich, Fluka, Merck, Kemika in Panreac.

Laboratorijska oprema

Preglednica II: Laboratorijska oprema

Tehnica	Sartorius LP620P
Rotavapor	BÜCHI® type R-114
UV svetilka	CAMAG UV-Cabinet II ($\lambda=254\text{nm}/366\text{nm}$)
Sušilnik	Sterimatic ST-II
Magnetno mešalo	IKA® RCT BASIC

Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC) : Uporabljali smo plošče Merck DC Kieselgel 60 F₂₅₄ z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščicah smo uporabljali UV svetilko (valovna dolžina $\lambda=254\text{nm}$ ali 366 nm) ter orositvena reagenta bromkrezol zeleno (za detekcijo kislin) ter FeCl₃ (detekcija fenolov). Uporabljene mobilne faze so navedene pri vsaki spojni posebej.

Kolonska kromatografija in kolonska kromatografija pod tlakom (flash): Uporabljali smo steklene kolone različnih velikosti (glede na količino spojine). Pri navadni kolonski kromatografiji smo za stacionarno fazo uporabili silikagel z velikostjo delcev med 0,063 – 0,200 mm, proizvajalca Merck. Kot stacionarna faza pri flash kromatografiji pa je služil silikagel z velikostjo delcev 0,040 – 0,063 mm (Merck). Mobilne faze so se razlikovale.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC): Analizo smo izvedli na instrumentu Agilent Technologies 1100 z UV-VIS detektorjem (254 nm). Uporabili smo kolono Agilent Eclipse C18 (4,6 x 50 mm, 5 μm) s hitrostjo pretoka 1,0 ml/min. Mobilna faza je bila zmes 0,1 % trifluorocetne kisline v vodi (A) in metanola (B). Uporabljen gradient (v

času 30 min, pri temperaturi 25°C): 0 – 3 min, 40 % B; 3 – 18 min, 40 % B → 80 % B; 18–23 min, 80 % B; 23 – 30 min, 80 % B → 40 % B.

Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR): ^{13}C -NMR spektri in nekateri ^1H NMR spektri so bili posneti na spektrometru Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo. Preostali ^1H NMR spektri so bili posneti na Bruker Avance DPX 300 spektrometru na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo. Kot interni standard so uporabili TMS, kot topila pa DMSO-d₆ in (CD₃)₂CO. Za reševanje NMR spektrov smo uporabljali računalniški program MestRe-C 4.8.6. proizvajalca Mestrelab Research S.L.

Masna spektroskopija (MS): Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru VG – Analytical Autospec Q z ESI in HRMS tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Določanje tališč

Intervale tališč smo določili s Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica in so nekorigirana.

Mikrovalovna sinteza

Mikrovalovno sintezo smo izvajali v mikrovalovnem reaktorju CEM Discover z vgrajenim merilcem tlaka, nastavljivo močjo segrevanja 0 – 300 W in IR ali optičnim načinom merjenja temperature, na Fakulteti za farmacijo.

Poimenovanje in risanje spojin / reakcijskih schem

Za poimenovanje in risanje spojin smo uporabljali računalniški program ChemBioDraw Ultra 12.0, podjetja CambridgeSoft. Pri iskanju spojin in sinteznih postopkov v podatkovnih bazah smo si pomagali s programom SciFinder-Scholar.

Sidranje

Sidranje smo izvedli s programom FlexX 3.0. Za sidranje v aktivno mesto encima PBP2a smo uporabili kristalno strukturo encima s pdb kodo 1VQQ.

Določanje inhibitorne aktivnosti spojin na transpeptidaze

Testiranje inhibitornega delovanja na transpeptidaze PBP2a (na meticilin odporen *S. aureus*), PBP5fm (*E. faecium*) ter PBP1b (*S. pneumoniae*) so izvedli na centru za proteinski inženiring v Liège-u (University of Liège, Belgija).

Določanje rezidualnih aktivnosti pri encimih PBP2a ter PBP5fm: RA vrednosti se določi prek ampicilina, ki je označen s fluoresceinom. Za vsak inhibitor se test izvede v treh ponovitvah. Potez določanja lahko razdelimo na več korakov (25):

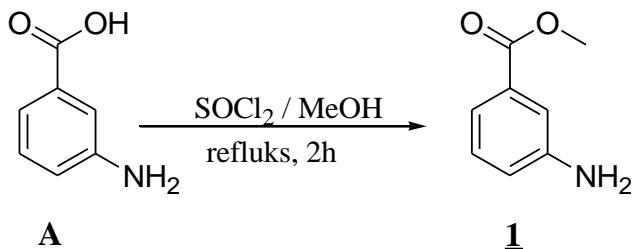
- (i) Priprava raztopin potencialnih inhibitorjev (v 100 mM fosfatnem pufru pH = 7 z dodanim solubilizatorjem Triton X-100, tako da je končna koncentracija inhibitorja 1mM),
- (ii) 4-urna inkubacija z ustreznim PBP encimom (2,5 µM) pri temperaturi 30°C,
- (iii) Dodatek ampicilina označenega s fluoresceinom (25 µM) ter inkubacija nadaljnjih 30 minut pri 37°C (celoten volumen je 20 µl),
- (iv) Dodatek denaturacijskega pufra [0,1 M Tris/HCl s pH = 6,8, ki vsebuje še glicerol (25%), SDS (2%), β-merkaptoetanol (20%) in bromfenol modro (0,02%)] ter segrevanje 1 minuto na 100°C,
- (v) SDS-akrilamidna elektroforeza (45 minut, 180 V),
- (vi) Detekcija in kvantifikacija: Molecular Image FX oprema in Quantity One software.

Določanje rezidualnih aktivnosti na encim PBP1b: RA vrednosti se določi iz začetnih hitrosti hidrolize tioestra 2-(2-benzamidopropanoiltio)ocetne kisline. Test poteka na mikrotitrskih ploščicah s 96 vdolbinicami. V vse testirane vzorce je bil dodan še solubilizator (0,01 % Triton X-100), ki prepreči tvorbo agregatov inhibitorja in s tem nespecifične interakcije inhibitorja z encimom. Koraki (28):

- (i) Priprava raztopin potencialnih inhibitorjev [v pufru natrijevega fosfata (10 mM, pH=7) z dodanima D-alaninom (100 mM) ter BSA (0,01 mg/ml)],
- (ii) 60-minutna inkubacija z encimom PBP1b (0,2 µM) pri temperaturi 25°C,
- (iii) Dodatek 2-(2-benzamidopropanoiltio)ocetne kisline (5 mM),
- (iv) Določitev vrednosti RA oziroma hitrosti hidrolize tioestra ob prisotnosti 1 mM DTNB z aparaturom Power Wave microtiter plate reader – meri se spremembo v absorbanci pri valovni dolžini 412 nm,
- (v) Določi se tudi stopnja spontane hidrolize tioestra ob prisotnosti potencialnih inhibitorjev in brez encima PBP1b.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 UVEDBA METILNE ZAŠČITE NA KARBOKSILNO KISLINO



Slika 12: **Tvorba metilnega estra** (A – izhodna spojina)

Postopek se nanaša na sliko 12. Raztopino 3-amino benzojske kisline **A** (2,0 g, 14,6 mmol) v metanolu (~ 50 ml) smo ohladili na ledeni kopeli. Tionil klorid (1,5 ekv.) smo med stalnim mešanjem dodajali počasi, po kapljicah s pomočjo kapalnika (~20 min). Bučko smo nato prestavili na oljno kopel, kjer se je reakcijska zmes ob refluksu mešala še 2 uri (ozioroma do kvantitativnega poteka reakcije, kar smo spremljali s TLC). Topilo in prebitni SOCl_2 smo odparili na rotavaporju, suhi preostanek pa suspendirali v 100 ml EtOAc. Spiranje z 0,2 M raztopino NaOH (2 x 40 ml) v liju ločniku je omogočilo, da se je produkt v organski fazi raztopil, le-to pa smo nato spirali z nasičeno vodno raztopino NaCl (1 x 30 ml). Sledilo je sušenje z brezvodnim Na_2SO_4 , filtriranje in koncentriranje produkta. Dobili smo rjavkasto-oranžen oljnat preostanek (29).

Po potrebi smo produkt, metil 3-aminobenzoat **1**, čistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/heksan/ NH_3 = 3/1/0,1).

Metil 3-aminobenzoat (**1**)

M_r: 151,06

Izgled : Rjavkasto-oranžno olje

Izkoristek reakcije: 82,7 %

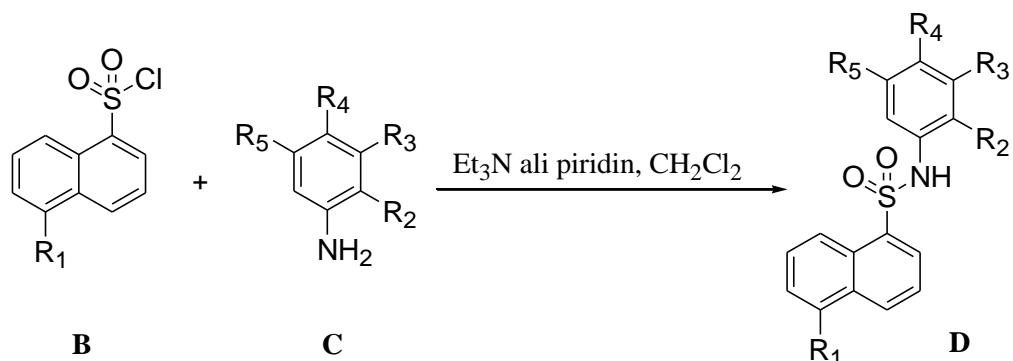
Retencijski faktor: 0,39 (MF: EtOAc/heksan = 1/1)

MS (ESI) : m/z = 152 [M+H]⁺;

ESI - HRMS: HRMS za C₈H₁₀NO₂ [M+H]⁺: izračunan 152,0712 in izmerjen 152,0706

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3,79 (s, 3H, CH₃); 5,38 (s, 2H, NH₂); 6,79 (ddd, 1H, J₁ = 7,6 Hz, J₂ = 2,4 Hz, J₃ = 1,4 Hz, Ar-H); 7,09 (dt, 1H, J₁ = 7,6 Hz, J₂ = 1,4 Hz, Ar-H); 7,13 (ddd, 1H, J₁ = J₂ = 7,6 Hz, J₃ = 0,4 Hz, Ar-H); 7,18—7,20 (m, 1H, Ar-H)

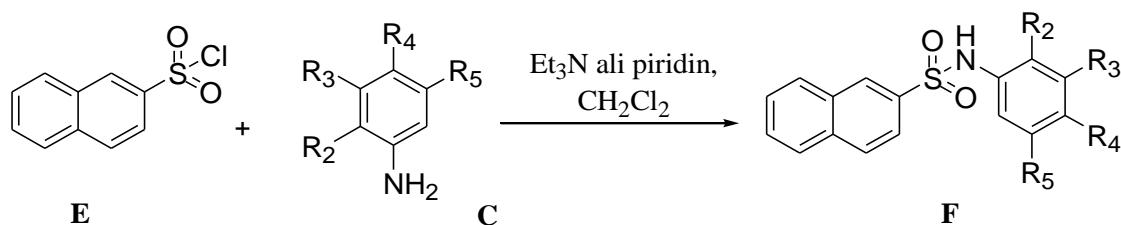
4.2 TVORBA SULFONAMIDNE VEZI



Slika 13: **Tvorba sulfonamidne vezi** (B in C - izhodni spojini, D – produkt opisane reakcije). Izhodna spojina B je derivat 1-naftalensulfonil klorida.

Preglednica III: **Določa fragmente in strukturo posameznega produkta D iz slike 13.**

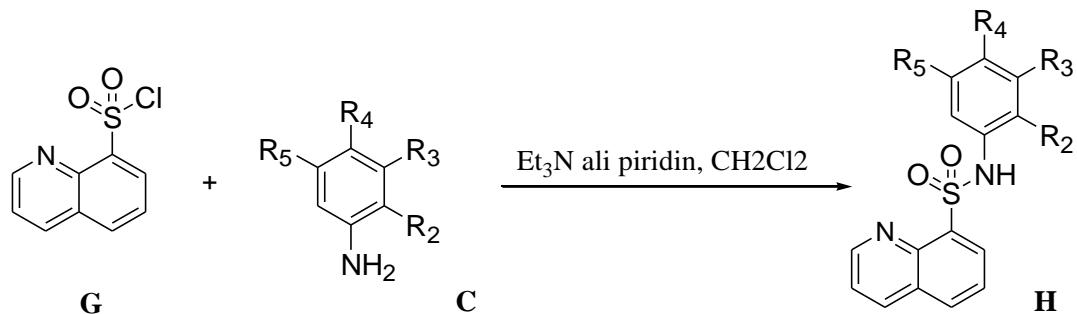
Oznaka produkta D	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
2	- H	- COOCH ₃	- H	- H	- H
3	- N(CH ₃) ₂	- COOCH ₃	- H	- H	- H
4	- H	- COOCH ₃	- H	- Br	- H
5	- N(CH ₃) ₂	- COOCH ₃	- H	- Br	- H
6	- H	- H	- COOCH ₃	- H	- H
7	- N(CH ₃) ₂	- H	- COOCH ₃	- H	- H
8	- H	- H	- COOCH ₃	- H	- COOCH ₃
9	- N(CH ₃) ₂	- H	- COOCH ₃	- H	- COOCH ₃
10	- H	- H	- OH	- H	- H
11	- N(CH ₃) ₂	- H	- OH	- H	- H



Slika 14: **Tvorba sulfonamidne vezi** (E in C - izhodni spojini, F – produkt opisane reakcije). Izhodna spojina E je 2-naftalensulfonil klorid.

Preglednica IV: Določa fragmente in strukturo posameznega produkta F iz slike 14.

Oznaka produkta F	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
<u>12</u>	- COOCH ₃	- H	- H	- H
<u>13</u>	- COOCH ₃	- H	- Br	- H
<u>14</u>	- H	- COOCH ₃	- H	- H
<u>15</u>	- H	- COOCH ₃	- H	- COOCH ₃
<u>16</u>	- H	- OH	- H	- H



Slika 15: **Tvorba sulfonamidne vezi** (G in C - izhodni spojini, H – produkt opisane reakcije). Izhodna spojina G je 8-kinolinsulfonil klorid.

Preglednica V: Določa fragmente in strukturo posameznega produkta H iz slike 15.

Oznaka produkta H	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
<u>17</u>	- COOCH ₃	- H	- H	- H
<u>18</u>	- COOCH ₃	- H	- Br	- H

Postopek A (30):

Postopek se nanaša na slike 13, 14 in 15. Ustrezen sulfonil klorid (13B, 14E oz. 15G) (3,0 mmol) smo raztopili v diklorometanu (~10 ml), neraztopljene delce odstranili s filtriranjem ter raztopino dodali k mešanici aromatskega amina (13C, 14C oz. 15C) (3,6 mmol) in baze (6,0 mmol) v istem topilu. Kot bazo smo uporabili Et₃N ali piridin. Reakcijsko zmes smo pustili mešati na mešalcu preko noči. Po končani reakciji smo zmesi dodali 2M HCl (10 ml) in ekstrahirali z diklorometanom (3 x 20 ml). Združene organske frakcije smo sprali s 30 ml nasičene vodne raztopine NaCl, sušili z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in pod znižanim tlakom odparili topilo. Produkt (13D, 14F oz. 15H) smo po potrebi očistili s kolonsko kromatografijo.

Postopek B (31):

V 10 ml epruveto za mikrovalovni reaktor smo natehtali ustrezen sulfonil klorid (slika 13B) (0,5 mmol) in ga raztopili v THF (4 ml). Nato smo dodali še 1,2 ekvivalenta aromatskega amina (slika 13C) (0,6 mmol) in 0,2 ekvivalenta trietilamina (0,1 mmol). Reakcijsko zmes smo segrevali v mikrovalovnem reaktorju 10 minut pri 50°C. Po končani reakciji smo odfiltrirali manjše oborine/soli, ki so nastale tekom postopka in filtrat razredčili s CH₂Cl₂ (~ 15 ml). Organsko fazo smo v liju ločniku spirali z vodo (1 x 10 ml), vodno raztopino Na₂CO₃ (1 x 25 ml), razredčeno HCl (1 x 20 ml) in nasičeno vodno raztopino NaCl (1 x 20 ml). Organsko topilo smo odparili pod znižanim tlakom. Produkt (slika 13D) smo po potrebi očistili s kolonsko kromatografijo.

Metil 2-(naftalen-1-sulfonamido)benzoat (2)

Mr: 341,07

Čiščenje: Navadna kolonska kromatografija v mobilni fazi EtOAc/heksan = 1/2 (postopek A, baza piridin); dvakrat kolonska flash kromatografija v mobilnih fazah eter/petroleter = 1/1 ter EtOAc/heksan = 1/3 (postopek A, baza Et₃N); prekristalizacija iz EtOAc in heksana (postopek B).

Izgled: Beli drobni kristali

Izkoristek reakcije: 41,8 % (postopek A, uporabljena baza: piridin); 11,1 % (postopek A, uporabljena baza: Et₃N); ~ 15,0 % (postopek B)

Retencijski faktor: 0,30 (MF: EtOAc/heksan = 1/2)

Temperatura tališča: 191,5 – 192,5 °C

MS (ESI): m/z = 342 [M+H]⁺; m/z = 359 [M+NH₄]⁺; m/z = 364 [M+Na]⁺; m/z = 380 [M+K]⁺

ESI – HRMS: HRMS za C₁₈H₁₆NO₄S [M+H]⁺: izračunan 342,0800 in izmerjen 342,0801

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3,74 (s, 3H, OCH₃); 7,08 (ddd, 1H, J₁ = 7,9 Hz, J₂ = 7,3 Hz, J₃ = 1,2 Hz, Ar-H); 7,39—7,42 (m, 1H, Ar-H); 7,46—7,52 (m, 1H, Ar-H); 7,62—7,69 (m, 2H, Ar-H); 7,73—7,78 (m, 2H, Ar-H); 8,07—8,10 (m, 1H, Ar-H); 8,24—8,27 (m, 1H, Ar-H); 8,28 (dd, 1H, J₁ = 7,4 Hz, J₂ = 1,2 Hz, Ar-H); 8,50—8,55 (m, 1H, Ar-H); 10,87 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 52,61 (OCH₃); 117,12 (Ar-C); 119,03 (Ar-C); 123,49 (Ar-C); 123,59 (Ar-C), 124,44 (Ar-C); 126,94 (Ar-C); 127,11 (Ar-C); 128,44 (Ar-C); 129,29 (Ar-C); 130,39 (Ar-C); 130,87 (Ar-C); 133,12 (Ar-C); 133,70 (Ar-C); 134,40 (Ar-C); 135,06 (Ar-C); 138,46 (Ar-C); 167,58 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 19,35 min; čistost: 99,13 %

Metil 2-(5-(dimetilamino)naftalen-1-sulfonamido)benzoat (3)

M_r: 384,11

Čiščenje: Kolonska flash kromatografija v mobilni fazi EtOAc/heksan = 1/3

Izgled : Bledo zeleno-rumeni kristali

Izkoristek reakcije: 26,5 % (postopek A, uporabljena baza: Et₃N)

Retencijski faktor: 0,24 (MF: EtOAc/heksan = 1/3)

Temperatura tališča: 146,0 – 148,0 °C

MS (ESI): m/z = 385 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₂₀H₂₁N₂O₄S [M+H]⁺: izračunan 385,1222 in izmerjen 385,1217

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 2,80 (s, 6H, N(CH₃)₂); 3,77 (s, 3H, OCH₃); 7,05—7,12 (m, 1H, Ar-H); 7,22—7,27 (m, 1H, Ar-H); 7,41 (dd, 1H, J₁ = 8,3 Hz, J₂ = 1,0 Hz, Ar-H); 7,50 (ddd, 1H, J₁ = 8,3 Hz, J₂ = 7,2 Hz, J₃ = 1,5 Hz, Ar-H); 7,59—7,67 (m, 2H, Ar-H); 7,78 (dd, 1H, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 1,5 Hz, Ar-H); 8,17 (dd, 1H, J₁ = 8,6 Hz, J₂ = 1,2 Hz, Ar-H); 8,28 (dd, 1H, J₁ = 7,3 Hz, J₂ = 1,2 Hz, Ar-H); 8,48 (dd, 1H, J₁ = 8,6 Hz, J₂ = 1,5 Hz, Ar-H); 10,85 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 44,93 (2C, N(CH₃)₂) 52,65 (OCH₃); 115,36 (Ar-C); 116,64 (Ar-C); 117,69 (Ar-C); 118,59 (Ar-C), 123,36 (Ar-C); 123,49 (Ar-C); 128,52 (Ar-C); 128,53 (Ar-C); 128,87 (Ar-C); 130,27 (Ar-C); 130,79 (Ar-C); 130,90 (Ar-C); 133,52 (Ar-C); 134,48 (Ar-C); 138,69 (Ar-C); 151,61 (Ar-C); 167,66 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 20,21 min; čistost: 99,62%

Metil 5-bromo-2-(naftalen-1-sulfonamido)benzoat (4)

M_r: 418,98

Čiščenje: Kolonska flash kromatografija v mobilni fazi EtOAc/heksan/HCl_{1M} = 1/5/0,05. Nato kolonska kromatografija v mobilni fazi EtOAc/heksan/HCl_{1M} = 1/7/0,05

Izgled : Prosojni kristali, rahlo rjavkaste barve

Izkoristek reakcije: 23,9 % (postopek A, uporabljena baza: Et₃N)

Retencijski faktor: 0,21 (MF: EtOAc/heksan/HCl_{1M} = 1/7/0,05)

Temperatura tališča: 151,0 – 153,0 °C

MS (ESI): m/z = 420 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₁₈H₁₅NO₄SBr [M+H]⁺: izračunan 419,9905 in izmerjen 419,9892

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3,71 (s, 3H, OCH₃); 7,34 (d, 1H, J = 8,8 Hz, Ar-H); 7,62—7,79 (m, 4H, Ar-H); 7,83 (d, 1H, J = 2,4 Hz, Ar-H); 8,08—8,13 (m, 1H, Ar-H); 8,22—8,31 (m, 2H, Ar-H); 8,52 (d, 1H, J = 8,5 Hz, Ar-H); 10,72 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 52,84 (CH₃); 115,58 (Ar-C); 120,08 (Ar-C); 121,90 (Ar-C); 123,54 (Ar-C), 124,47 (Ar-C); 126,92 (Ar-C); 127,16 (Ar-C); 128,48 (Ar-

C); 129,30 (Ar-C); 130,23 (Ar-C); 132,97 (Ar-C); 133,07 (Ar-C); 133,72 (Ar-C); 135,15 (Ar-C); 136,75 (Ar-C); 137,34 (Ar-C); 166,15 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 23,37 min; čistost: 70,86 %

Metil 5-bromo-2-(5-(dimetilamino)naftalen-1-sulfonamido)benzoat (5)

M_r: 462,02

Čiščenje: Navadna kolonska kromatografija v mobilni fazi eter/petroleter = 1/2

Izgled : Fluorescentno rumeni drobni kristali

Izkoristek reakcije: 30,6 % (postopek A, uporabljena baza: piridin)

Retencijski faktor: 0,25 (MF: eter/petroleter = 1/2)

Temperatura tališča: 148,0 – 150,0 °C

MS (ESI) : m/z = 463 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₂₀H₂₀N₂O₄SBr [M+H]⁺: izračunan 463,0327 in izmerjen 463,0319

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 2,81 (s, 6H, N(CH₃)₂); 3,74 (s, 3H, OCH₃); 7,26 (d, 1H, J = 7,4 Hz, Ar-H); 7,35 (d, 1H, J = 8,9 Hz, Ar-H); 7,59—7,66 (m, 2H, Ar-H); 7,69 (dd, 1H, J₁ = 8,9 Hz, J₂ = 2,1 Hz, Ar-H); 7,85 (d, 1H, J = 2,1 Hz, Ar-H); 8,15 (d, 1H, J = 8,6 Hz, Ar-H); 8,24 (dd, 1H, J₁ = 7,4 Hz, J₂ = 1,0 Hz, Ar-H); 8,49 (d, 1H, J = 8,6 Hz, Ar-H); 10,72 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 44,95 (2C, N(CH₃)₂); 52,90 (OCH₃); 115,30 (Ar-C); 115,40 (Ar-C); 117,71 (Ar-C); 119,51 (Ar-C); 121,41 (Ar-C); 123,52 (Ar-C); 128,51 (Ar-C); 128,60 (Ar-C); 128,90 (Ar-C); 130,15 (Ar-C); 130,91 (Ar-C); 132,99 (Ar-C); 133,44 (Ar-C); 136,84 (Ar-C); 137,61 (Ar-C); 151,63 (Ar-C); 166,27 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 20,17 min; čistost: zaradi slabega odziva na detektorju, čistost ni bila določena

Metil 3-(naftalen-1-sulfonamido)benzoat (6)

M_r: 341,07

Čiščenje: Prekristalizacija iz EtOAc in heksana

Izgled : Beli drobni kristali

Izkoristek reakcije: 47,4 % (postopek A, uporabljeni baza: piridin)

Retencijski faktor: 0,49 (MF: EtOAc/heksan = 1/1)

Temperatura tališča: 173,0 – 174,5 °C

MS (ESI) : m/z = 342 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₁₈H₁₆NO₄S [M+H]⁺: izračunan 342,0800 in izmerjen 342,0807

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3,78 (s, 3H, OCH₃); 7,27—7,34 (m, 2H, Ar-H); 7,46—7,54 (m, 1H, Ar-H); 7,59—7,70 (m, 3H, Ar-H); 7,75 (ddd, 1H, J₁ = 8,6 Hz, J₂ = 6,9 Hz, J₃ = 1,4 Hz, Ar-H); 8,07 (dd, 1H, J₁ = 7,9 Hz, J₂ = 1,0 Hz, Ar-H); 8,19—8,25 (m, 2H, Ar-H); 8,71 (d, 1H, J = 8,6 Hz, Ar-H); 10,94 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 52,20 (OCH₃); 118,96 (Ar-C); 122,98 (Ar-C); 123,98 (Ar-C); 124,02 (Ar-C), 124,41 (Ar-C); 127,02 (Ar-C); 127,24 (Ar-C); 128,25 (Ar-C); 129,10 (Ar-C); 129,65 (Ar-C); 129,96 (Ar-C); 130,37 (Ar-C); 133,69 (Ar-C); 133,84 (Ar-C); 134,62 (Ar-C); 137,97 (Ar-C); 165,50 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 16,15 min; čistost: 100,0 %

Metil 3-(5-(dimetilamino)naftalen-1-sulfonamido)benzoat (7)

M_r: 384,11

Čiščenje: Navadna kolonska kromatografija v mobilni fazi EtOAc/heksan = 1/3

Izgled : Fluorescentno rumeni kristali

Izkoristek reakcije: 52,3 % (postopek A, uporabljeni baza: piridin)

Retencijski faktor: 0,15 (MF: EtOAc/heksan = 1/3)

Temperatura tališča: 140,0 – 141,5 °C

MS (ESI) : m/z = 385 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₂₀H₂₁N₂O₄S [M+H]⁺: izračunan 385,1222 in izmerjen 385,1225

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 2,80 (s, 6H, N(CH₃)₂); 3,78 (s, 3H, OCH₃); 7,25 (d, 1H, J = 7,3 Hz, Ar-H); 7,29—7,33 (m, 2H, Ar-H); 7,48—7,53 (m, 1H, Ar-H); 7,57—7,66 (m, 3H, Ar-H); 8,22 (dd, 1H, J₁ = 7,3 Hz, J₂ = 1,1 Hz, Ar-H); 8,35 (d, 1H, J = 8,7 Hz, Ar-H); 8,45 (d, 1H, J = 8,5 Hz, Ar-H); 10,91 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 45,82 (2C, N(CH₃)₂); 53,39 (OCH₃); 116,42 (Ar-C); 119,02 (Ar-C); 119,83 (Ar-C); 124,31 (Ar-C); 124,40 (Ar-C); 125,35 (Ar-C); 129,71 (Ar-C); 129,74 (Ar-C); 130,81 (Ar-C); 131,14 (Ar-C); 131,30 (Ar-C); 131,61 (Ar-C); 134,66 (Ar-C); 138,66 (Ar-C); 152,46 (Ar-C); 167,16 (Ar-C)

HPLC: retencijski čas: 15,23 min; čistost: 100,0 %

Dimetil 5-(naftalen-1-sulfonamido)izoftalat (8)

M_r: 399,08

Čiščenje: prekristalizacija iz EtOAc ter heksana (postopek A, baza Et₃N)

Izgled : Umazano bela amorfna snov

Izkoristek reakcije: 91,5 % (postopek A, uporabljena baza: piridin); 33,1 % (postopek A, uporabljena baza: Et₃N)

Retencijski faktor: 0,37 (MF: EtOAc/heksan = 1/1)

Temperatura tališča: 208,5 – 209,5 °C

MS (ESI): m/z = 400 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₂₀H₁₈NO₆S [M+H]⁺: izračunan 400,0855 in izmerjen 400,0859

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3,82 (s, 6H, 2 x OCH₃); 7,62—7,71 (m, 2H, Ar-H); 7,77 (ddd, 1H, J₁ = 7,7 Hz; J₂ = 6,8 Hz; J₃ = 1,3 Hz, Ar-H); 7,88 (d, 2H, J = 1,5 Hz, Ar-H); 8,01 (t, 1H, J = 1,5 Hz, Ar-H); 8,08 (dd, 1H, J₁ = 8,1, J₂ = 1,3 Hz, Ar-H); 8,22—8,27 (m, 2H, Ar-H); 8,70 (d, 1H, J₁ = 8,3 Hz, Ar-H); 11,25 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 52,11 (OCH₃); 52,55 (OCH₃); 116,54 (Ar-C); 118,01 (Ar-C); 122,52 (Ar-C); 124,02 (Ar-C), 124,43 (Ar-C); 127,13 (Ar-C); 127,15 (Ar-C); 128,43 (Ar-C); 129,19 (Ar-C); 130,00 (Ar-C); 130,57 (Ar-C); 131,03 (Ar-C);

133,48 (Ar-C); 133,73 (Ar-C); 134,91 (Ar-C); 138,64 (Ar-C); 164,69 (C=O); 165,92 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 17,72 min; čistost: 96,41 %

Dimetil 5-(dimetilamino)naftalen-1-sulfonamido)izoftalat (9)

M_r: 442,12

Izgled : Umazano bela amorfna snov

Izkoristek reakcije: 43,2 % (postopek A, uporabljeni baza: piridin)

Retencijski faktor: 0,44 (MF: EtOAc/heksan = 1/1)

Temperatura tališča: 207,5 – 209,5 °C

MS (ESI) : m/z = 443 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₂₂H₂₃N₂O₆S [M+H]⁺: izračunan 443,1277 in izmerjen 443,1263

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 2,80 (s, 6H, N(CH₃)₂); 3,83 (s, 6H, OCH₃); 7,27 (d, 1H, J = 7,5 Hz, Ar-H); 7,59—7,69 (m, 2H, Ar-H); 7,89 (d, 2H, J = 1,5 Hz, Ar-H); 8,02 (t, 1H, J = 1,5 Hz, Ar-H); 8,23 (dd, 1H, J₁ = 7,5 Hz, J₂ = 1,0 Hz, Ar-H); 8,34 (d, 1H, J = 8,5 Hz, Ar-H); 8,46 (d, 1H, J = 8,5 Hz, Ar-H); 11,21 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 44,99 (2C, N(CH₃)₂); 52,14 (OCH₃); 52,56 (OCH₃); 115,50 (Ar-C); 116,92 (Ar-C); 118,33 (Ar-C); 118,36 (Ar-C); 122,47 (Ar-C); 123,55 (Ar-C); 128,50 (Ar-C); 128,74 (Ar-C); 128,86 (Ar-C); 129,84 (Ar-C); 130,54 (Ar-C); 130,61 (Ar-C); 131,04 (Ar-C); 133,95 (Ar-C); 138,75 (Ar-C); 151,25 (Ar-C); 164,73 (C=O); 165,89 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 11,71 min; čistost: 95,04 %

N-(3-hidroksifenil)naftalen-1-sulfonamid (10)

M_r: 299,06

Čiščenje: Kolonska flash kromatografija v mobilni fazi EtOAc/heksan = 2/1.

Izgled : Prosojni kristali, rjavkasto-rumeno obarvani

Izkoristek reakcije: 71,1 % (postopek A, uporabljeni baza: Et₃N)

Retencijski faktor: 0,53 (MF: EtOAc/heksan = 2/1)

Temperatura tališča: 137,0 – 139,5 °C

MS (ESI): m/z = 300 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₁₆H₁₄NO₃S [M+H]⁺: izračunan 300,0694 in izmerjen 300,0684

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 5,34 (rs, 2H, OH in NH); 5,83 (ddd, 1H, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 2,1 Hz, J₃ = 0,9 Hz, Ar-H); 6,20 (t, 1H, J = 2,1 Hz, Ar-H); 6,38 (ddd, 1H, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 2,1 Hz, J₃ = 0,9 Hz, Ar-H); 6,82 (t, 1H, J = 8,1 Hz, Ar-H); 7,66 (dd, 1H, J₁ = 8,1, J₂ = 7,4 Hz, Ar-H); 7,74—7,81 (m, 1H, Ar-H); 7,89 (ddd, 1H, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 6,9 Hz, J₃ = 1,2 Hz, Ar-H); 8,12 (dd, 1H, J₁ = 7,4 Hz, J₂ = 1,1 Hz, Ar-H); 8,20 (d, 1H, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 1,1 Hz, Ar-H); 8,39 (d, 1H, J = 8,1 Hz, Ar-H); 8,60—8,65 (m, 1H, Ar-H)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 106,19 (Ar-C); 107,45 (Ar-C); 112,54 (Ar-C); 124,11 (Ar-C), 124,54 (Ar-C); 127,45 (Ar-C); 127,57 (Ar-C); 129,09 (Ar-C); 129,34 (Ar-C); 129,75 (Ar-C); 130,08 (Ar-C); 131,00 (Ar-C); 133,67 (Ar-C); 136,05 (Ar-C); 150,05 (Ar-C); 150,36 (Ar-C)

HPLC: retencijski čas: 12,79 min; čistost: 100,0 %

5-(dimetilamino)-N-(3-hidroksifenil)naftalen-1-sulfonamid (11)

M_r: 342,10

Izgled : Fluorescentno rumeni kristali z rjavimi lisami

Izkoristek reakcije: 97,0 % (postopek A, uporabljena baza: piridin)

Retencijski faktor: 0,30 (MF: EtOAc/heksan = 1/1)

Temperatura tališča: 82,0 – 86,0 °C

MS (ESI): m/z = 343 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₁₈H₁₉N₂O₃S [M+H]⁺: izračunan 343,1116 in izmerjen 343,1121

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 2,80 (s, 6H, N(CH₃)₂); 6,31 (dd, 1H, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 2,1 Hz, Ar-H); 6,44—6,53 (m, 2H, Ar-H); 6,91 (t, 1H, J = 8,1 Hz, Ar-H); 7,25 (d,

1H, $J = 7,5$ Hz, Ar-H); 7,57—7,64 (m, 2H, Ar-H); 8,19 (d, 1H, $J = 7,5$ Hz, Ar-H); 8,37 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, Ar-H); 8,44 (d, 1H, $J = 8,6$ Hz, Ar-H); 9,35 (s, 1H, OH); 10,50 (s, 1H, NH)

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 44,98 (2C, NCH₃); 105,57 (Ar-C); 109,13 (Ar-C); 110,37 (Ar-C); 115,20 (Ar-C), 118,61 (Ar-C); 123,45 (Ar-C); 128,07 (Ar-C); 128,90 (Ar-C); 128,94 (Ar-C); 129,64 (Ar-C); 129,70 (Ar-C); 129,96 (Ar-C); 134,83 (Ar-C); 138,65 (Ar-C); 151,37 (Ar-C); 157,72 (Ar-C)

HPLC: retencijski čas: 8,220 min; čistost: 98,61%

Metil 2-(naftalen-2-sulfonamido)benzoat (12)

M_r: 341,07

Čiščenje: Kolonska flash kromatografija v mobilni fazi EtOAc/heksan = 1/5

Izgled : Beli igličasti kristali

Izkoristek reakcije: 34,2 % (postopek A, uporabljena baza: Et₃N)

Retencijski faktor: 0,29 (MF: EtOAc/heksan = 1/3)

Temperatura tališča: 126,5 – 128,0 °C

MS (ESI) : m/z = 342 [M+H]⁺; m/z = 364 [M+Na]⁺; m/z = 380 [M+K]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₁₈H₁₆NO₄S [MH⁺]: izračunan 342,0800 in izmerjen 342,0785

^1H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3,78 (s, 3H, OCH₃); 7,11—7,17 (m, 1H, Ar-C); 7,49—7,55 (m, 2H, Ar-C); 7,62—7,83 (m, 4H, Ar-H); 8,01 (dd, 1H, $J_1 = 7,4$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz, Ar-H); 8,08 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz, Ar-H); 8,13—8,18 (m, 1H, Ar-H); 8,53 (d, 1H, $J = 1,7$ Hz, Ar-H); 10,52 (s, 1H, NH)

^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 52,55 (OCH₃); 118,03 (Ar-C); 119,99 (Ar-C); 121,84 (Ar-C); 123,94 (Ar-C), 127,77 (Ar-C); 127,78 (Ar-C); 128,46 (Ar-C); 129,24 (Ar-C); 129,29 (Ar-C); 129,59 (Ar-C); 130,92 (Ar-C); 131,45 (Ar-C); 134,34 (Ar-C); 134,36 (Ar-C); 135,55 (Ar-C); 138,38 (Ar-C); 167,45 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 19,95 min; čistost: 100,0 %

Metil 5-bromo-2-(naftalen-2-sulfonamido)benzoat (13)

M_r: 418,98

Čiščenje: Navadna kolonska kromatografija v mobilni fazi eter/petroleter = 1/3

Izgled : Beli drobni kristali

Izkoristek reakcije: 41,8 % (postopek A, uporabljeni baza: piridin)

Retencijski faktor: 0,19 (MF: eter/petroleter = 1/3)

Temperatura tališča: 128,0 – 130,5 °C

MS (ESI) : m/z = 420 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₁₈H₁₅NO₄SBr [MH⁺]: izračunan 419,9905 in izmerjen 419,9913

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3,76 (s, 3H, OCH₃); 7,43 (dd, 1H, J₁ = 8,8 Hz, J₂ = 0,3 Hz, Ar-H); 7,65—7,75 (m, 3H, Ar-H); 7,76 (dd, 1H, J₁ = 8,8 Hz, J₂ = 2,2 Hz, Ar-H); 7,88 (dd, 1H, J₁ = 2,2 Hz, J₂ = 0,3 Hz, Ar-H); 8,00—8,04 (m, 1H, Ar-H); 8,10 (dd, 1H, J₁ = 8,7 Hz, J₂ = 0,4 Hz, Ar-H); 8,15—8,18 (m, 1H, Ar-H); 8,52—8,54 (m, 1H, Ar-H); 10,45 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 52,79 (1C, OCH₃); 115,93 (1C, Ar-C); 120,98 (1C, Ar-C); 121,84 (1C, Ar-C); 122,71 (1C, Ar-C); 127,81 (2C, 2 x Ar-C); 128,42 (1C, Ar-C); 129,30 (1C, Ar-C); 129,33 (1C, Ar-C); 129,66 (1C, Ar-C); 131,47 (1C, Ar-C); 133,04 (1C, Ar-C); 134,42 (1C, Ar-C); 135,48 (1C, Ar-C); 136,69 (1C, Ar-C); 137,26 (1C, Ar-C); 166,02 (1C, C=O)

HPLC: retencijski čas: 23,92 min; čistost: 99,75

Metil 3-(naftalen-2-sulfonamido)benzoat (14)

M_r: 341,07

Izgled : Beli drobni kristali

Izkoristek reakcije: 26,3 % (postopek A, uporabljeni baza: piridin)

Retencijski faktor: 0,15 (Mf: EtOAc/heksan = 1/3)

Temperatura tališča: 192,5 – 193,5 °C

MS (ESI): m/z = 342 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₁₈H₁₆NO₄S [M+H]⁺: izračunan 342,0800 in izmerjen 342,0797

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3,78 (s, 3H, OCH₃); 7,36 (ddd, 1H, J₁ = 8,0 Hz, J₂ = 7,5 Hz, J₃ = 0,4 Hz, Ar-H); 7,39—7,43 (m, 1H, Ar-H); 7,57 (dt, 1H, J₁ = 7,5 Hz, J₂ = 1,5 Hz, Ar-H); 7,62—7,72 (m, 2H, Ar-H); 7,73 (m, 1H, Ar-H); 7,76 (dd, 1H, J₁ = 8,7 Hz, J₂ = 1,8 Hz, Ar-H); 7,99 (d, 1H, J = 8,0 Hz, Ar-H); 8,09 (d, 1H, J = 8,7 Hz, Ar-H); 8,11—8,15 (m, 1H, Ar-H); 8,45 (d, 1H, J = 1,8 Hz, Ar-H); 10,68 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 52,21 (OCH₃); 120,18 (Ar-C); 121,76 (Ar-C); 124,25 (Ar-C); 124,59 (Ar-C); 127,72 (Ar-C); 127,78 (Ar-C); 128,00 (Ar-C); 129,04 (Ar-C); 129,19 (Ar-C); 129,56 (Ar-C); 129,70 (Ar-C); 130,45 (Ar-C); 131,43 (Ar-C); 134,22 (Ar-C); 136,05 (Ar-C); 138,06 (Ar-C); 165,53 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 16,94 %; čistost: 100,0%

Dimetil 5-(naftalen-2-sulfonamido)izoftalat (15)

M_r: 399,08

Izgled : Bela amorfna spojina

Izkoristek reakcije: 72,4 % (postopek A, uporabljena baza: piridin)

Retencijski faktor: 0,46 (MF: EtOAc/heksan = 1/1)

Temperatura tališča: 211,5 – 213,0 °C

MS (ESI): m/z = 400 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₂₀H₁₈NO₆S [M+H]⁺: izračunan 400,0855 in izmerjen 400,0858

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3,83 (s, 6H, 2 x CH₃); 7,62 – 7,74 (m, 2H, Ar-H); 7,77 (dd, 1H, J₁ = 8,7 Hz, J₂ = 1,9 Hz, Ar-H); 7,96 – 8,03 (m, 3H, Ar-H); 8,08 (t, 1H, J = 1,5 Hz, Ar-H); 8,09 – 8,17 (m, 2H, Ar-H); 8,47 (d, 1H, J = 1,5 Hz, Ar-H); 10,94 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 52,11 (OCH₃); 52,57 (OCH₃); 116,55 (Ar-C); 118,01 (Ar-C); 121,61 (Ar-C); 124,67 (Ar-C), 127,80 (Ar-C); 127,82 (Ar-C); 128,08

(Ar-C); 129,18 (Ar-C); 129,24 (Ar-C); 129,77 (Ar-C); 130,57 (Ar-C); 131,11 (2C, 2 x Ar-C); 131,44 (Ar-C); 134,30 (Ar-C); 138,77 (Ar-C); 164,72 (C=O); 165,92 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 18,39 min; čistost: 96,08%

N-(3-hidroksifenil)naftalen-2-sulfonamid (16)

M_r: 299,06

Izgled : Roza kristali v rjavem olju

Izkoristek reakcije: 96,1 % (postopek A, uporabljena baza: piridin)

Retencijski faktor: 0,13 (Mf: EtOAc/heksan = 1/2)

Temperatura tališča: 121,0 – 125,0 °C

MS (ESI) : m/z = 300 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₁₆H₁₄NO₃S [M+H]⁺: izračunan 300,0694 in izmerjen 300,0696

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 6,36 (d, 1H, J = 7,9 Hz, Ar-H); 6,52—6,62 (m, 2H, Ar-H); 6,95 (t, 1H, J = 8,1 Hz; Ar-H); 7,60—7,73 (m, 2H, Ar-H); 7,77 (d, 1H, J = 8,8 Hz, Ar-H); 8,00 (d, 1H, J = 7,5 Hz; Ar-H); 8,05—8,17 (m, 2H, Ar-H); 8,40—8,44 (m, 1H, Ar-H); 9,39 (s, 1H, OH); 10,25 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 107,99 (Ar-C); 112,14 (Ar-C); 112,50 (Ar-C); 122,92 (Ar-C); 128,86 (Ar-C); 129,06 (Ar-C); 129,09 (Ar-C); 130,03 (Ar-C); 130,36 (Ar-C); 130,58 (Ar-C); 131,28 (Ar-C); 132,39 (Ar-C); 135,31 (Ar-C); 136,79 (Ar-C); 139,31 (Ar-C); 158,28 (Ar-C)

HPLC: retencijski čas: 12,48 min; čistost: 97,50 %

Metil 2-(kinolin-8-sulfonamido)benzoat (17)

M_r: 342,07

Čiščenje: 2x kolonska flash kromatografija v mobilni fazi eter/petroleter = 3/1

Izgled : rjavkasti igličasti, drobni kristali

Izkoristek reakcije: 1,4 % (postopek A, uporabljena baza: Et₃N)

Retencijski faktor: 0,20 (Mf: eter/petroleter = 3/1)

Temperatura tališča: 217 – 219 °C

MS (ESI) : m/z = 343 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₁₇H₁₅N₂O₄S [M+H]⁺: izračunan 343,0753 in izmerjen 343,0756

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3,90 (s, 3H, OCH₃); 6,94—7,01 (m, 1H, Ar-H); 7,38—7,47 (m, 1H, Ar-H); 7,66—7,80 (m, 4H, Ar-H); 8,29 (dd, 1H, J₁ = 8,4 Hz, J₂ = 0,9 Hz, Ar-H); 8,46—8,52 (m, 2H, Ar-H); 8,98 (dd, 1H, J₁ = 4,1 Hz, J₂ = 1,5 Hz, Ar-H); 11,05 (s, 1H, NH)

Metil 5-bromo-2-(kinolin-8-sulfonamido)benzoat (**18**)

M_r: 419,98

Čiščenje: Kolonska flash kromatografija v mobilni fazi eter/petroleter = 3/1

Izgled : rjavkasti, prosojni kristali

Izkoristek reakcije: 10,4 % (postopek A, uporabljena baza: Et₃N)

Retencijski faktor: 0,22 (Mf: eter/petroleter = 3/1)

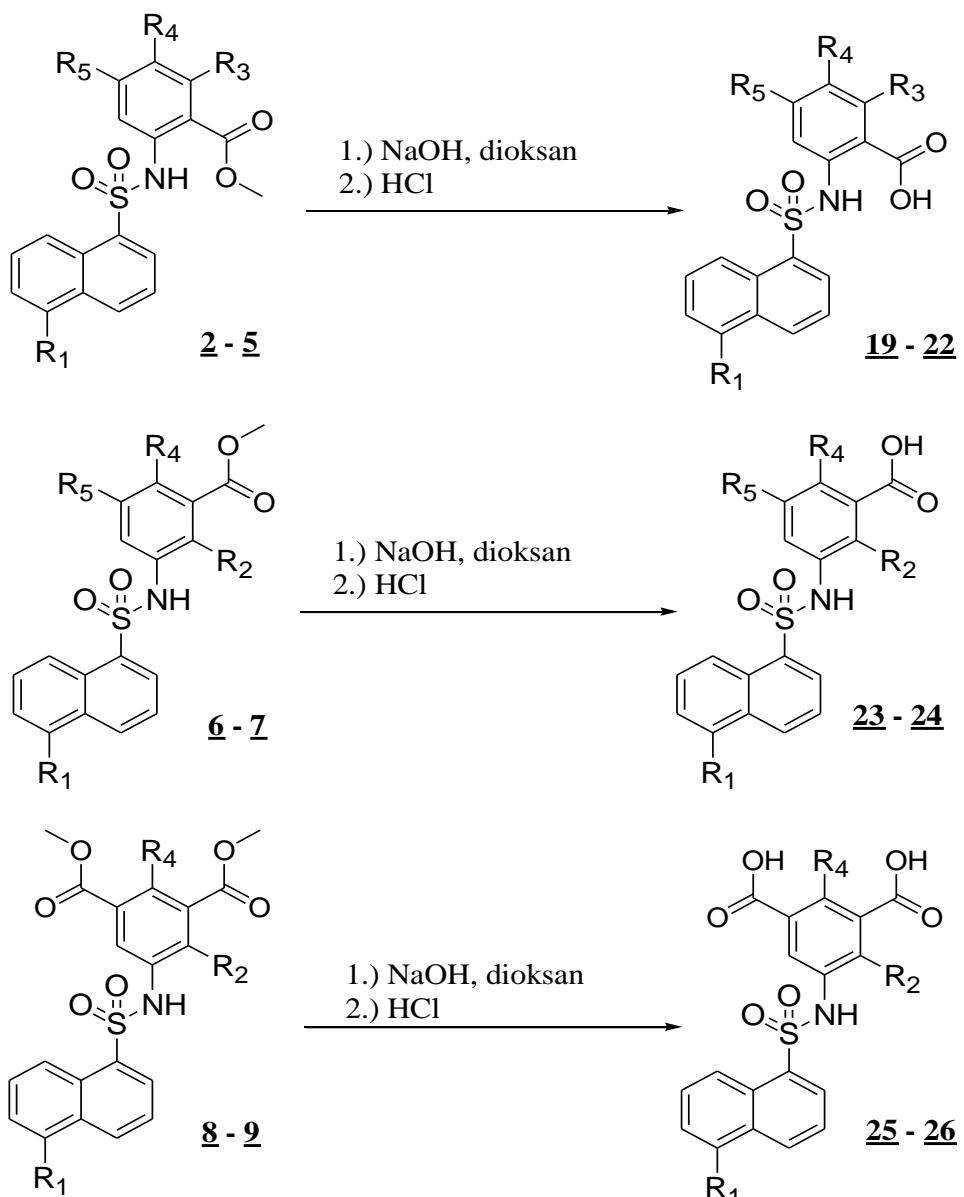
Temperatura tališča: 164 – 167 °C

MS (ESI) : m/z = 420 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₁₇H₁₄BrN₂O₄S [M+H]⁺: izračunan 420,9858 in izmerjen 420,9868

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 3,90 (s, 3H, OCH₃); 7,56—7,84 (m, 5H, Ar-H); 8,33 (dd, 1H, J₁ = 8,3 Hz, J₂ = 1,3 Hz, Ar-H); 8,47—8,54 (m, 2H, Ar-H); 8,98 (dd, 1H, J₁ = 4,3 Hz, J₂ = 1,7 Hz, Ar-H); 11,00 (s, 1H, NH)

4.3 ALKALNA HIDROLIZA

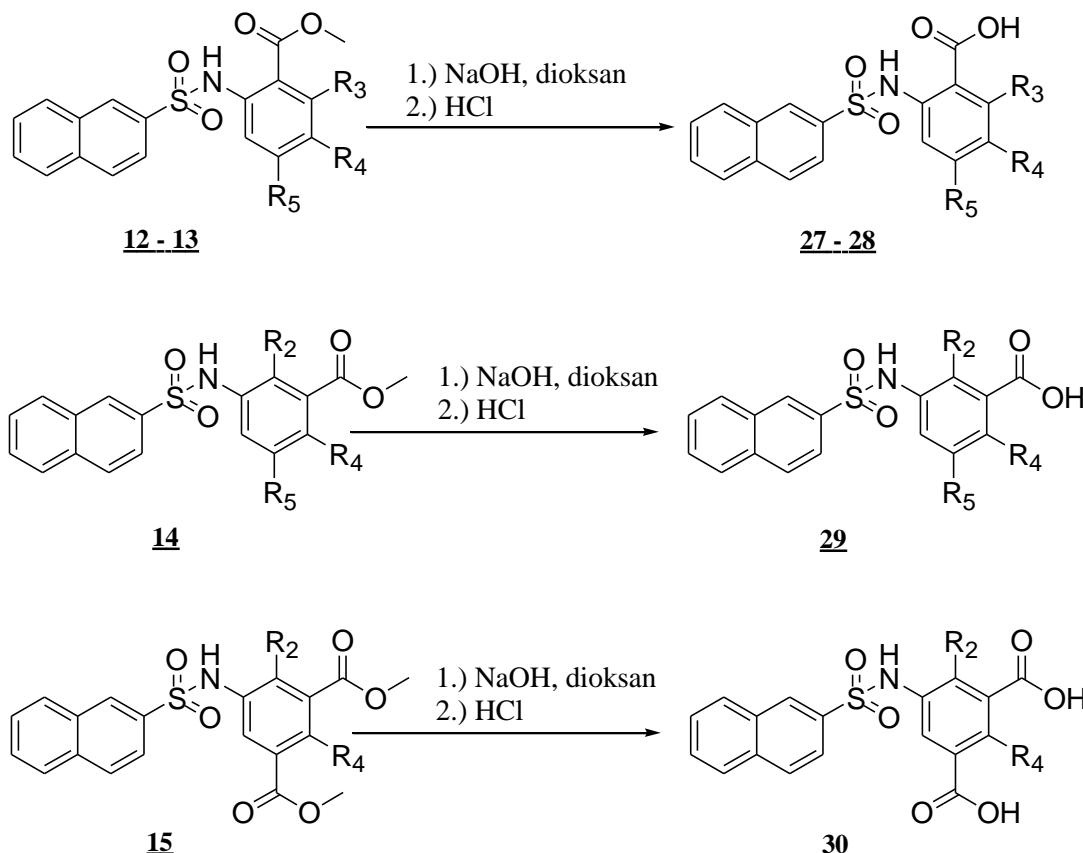


Slika 16: **Alkalna hidroliza estra pri 1-naftalensulfonamidnih derivatih D.** Ti so tu označenimi s številkami (levo). Produkti hidrolize so na desni strani slike.

Preglednica VI: **Določa fragmente in strukturo posameznega produkta alkalne hidrolize iz slike 16.**

Oznaka produkta:	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
19	- H	- COOH	- H	- H	- H
20	- N(CH ₃) ₂	- COOH	- H	- H	- H
21	- H	- COOH	- H	- Br	- H
22	- N(CH ₃) ₂	- COOH	- H	- Br	- H
23	- H	- H	- COOH	- H	- H

<u>24</u>	- N(CH ₃) ₂	- H	- COOH	- H	- H
<u>25</u>	- H	- H	- COOH	- H	- COOH
<u>26</u>	- N(CH ₃) ₂	- H	- COOH	- H	- COOH



Slika 17: Alkalna hidroliza estra pri 2-naftalensulfonamidnih derivatih F. Ti so tu označeni s številkami (levo). Proizvodi hidrolize so na desni strani slike.

Preglednica VII: Določa fragmente in strukturo posameznega produkta alkalne hidrolize iz slike 17.

Oznaka produkta:	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
<u>27</u>	- COOH	- H	- H	- H
<u>28</u>	- COOH	- H	- Br	- H
<u>29</u>	- H	- COOH	- H	- H
<u>30</u>	- H	- COOH	- H	- COOH

Postopek se nanaša na slike 16 in 17. Sulfonamidnemu derivatu (spojine od **2** do **15**) (1 ekv.) raztopljenem v dioksanu (~ 2 ml) smo dodali 1M vodno raztopino NaOH (v volumnu, ki ustreza 4 ekvivalentom sulfonamida) ter mešali pri sobni temperaturi, dokler ni zreagiral ves ester, kar smo spremljali s tankoplastno kromatografijo. Reakcijski zmesi smo nato dodali vodo (~ 40 mL) ter ekstrahirali z EtOAc (2×40 mL). Vodno fazo smo nakisali z 2 M raztopino HCl do pH = 1–2 in ponovno ekstrahirali z EtOAc (3×30 mL). Združene organske frakcije smo sprali z 30 ml nasičene vodne raztopine NaCl, sušili z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in pod znižanim tlakom odparili topilo (30). Produkt (**19** - **30**) smo po potrebi očistili s kolonsko kromatografijo.

2-(naftalen-1-sulfonamido)benzojska kislina (19**)**

M_r: 327,06

Čiščenje: spiranje s heksanom in filtriranje z odsesavanjem

Izgled : Bledo rumeni drobni kristali

Izkoristek reakcije: 51,6 %

Retencijski faktor: 0,40 (MF: CH₂Cl₂/MeOH/AcOH = 5/1/0,1)

Temperatura tališča: 232,0 – 235,0 °C

MS (ESI): m/z = 326 [M-H]⁻

ESI - HRMS: HRMS za C₁₇H₁₂NO₄S [M-H]⁻: izračunan 326,0487 in izmerjen 326,0497

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 6,98–7,05 (m, 1H, Ar-H); 7,43–7,49 (m, 2H, Ar-H); 7,64–7,69 (m, 2H, Ar-H); 7,73 (ddd, 1H, J₁ = 8,6 Hz, J₂ = 6,9 Hz, J₃ = 1,5 Hz, Ar-H); 7,79–7,83 (m, 1H, Ar-H); 8,07–8,10 (m, 1H, Ar-H); 8,24–8,28 (m, 1H, Ar-H); 8,35 (dd, 1H, J₁ = 7,4 Hz, J₂ = 1,2 Hz, Ar-H); 8,53 (dd, 1H, J₁ = 8,6 Hz, J₂ = 0,8 Hz, Ar-H); 11,68 (s, 1H, NH); H od COOH skupine je izmenjan

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 115,59 (Ar-C); 117,01 (Ar-C); 122,78 (Ar-C); 123,30 (Ar-C), 124,45 (Ar-C); 126,89 (Ar-C); 127,13 (Ar-C); 128,49 (Ar-C); 129,35 (Ar-C); 130,60 (Ar-C); 131,44 (Ar-C); 132,93 (Ar-C); 133,73 (Ar-C); 134,51 (Ar-C); 135,12 (Ar-C); 139,73 (Ar-C); 169,89 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 17,07 min; čistost: 100,0 %

2-(5-(dimetilamino)naftalen-1-sulfonamido)benzojska kislina (20)

M_r: 370,10

Izgled : Zelena amorfna spojina

Izkoristek reakcije: 87,0 %

Retencijski faktor: 0,51 (MF: CH₂Cl₂/MeOH/AcOH = 5/1/0,1)

Temperatura tališča: 190,5 – 192,0 °C

MS (ESI): m/z = 369 [M-H]⁻

ESI - HRMS: HRMS za C₁₉H₁₇N₂O₄S [M-H]⁻: izračunan 369,0909 in izmerjen 369,0904

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 2,78 (s, 6H, N(CH₃)₂); 6,77—6,87 (m, 1H, Ar-H); 7,16 – 7,36 (m, 3H, Ar-H); 7,49—7,64 (m, 2H, Ar-H); 7,76—7,80 (d, 1H, Ar-H); 8,24—8,35 (m, 2H, Ar-H); 8,37—8,43 (m, 1H, Ar-H); H od COOH skupine je izmenjan

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 44,96 (2C, N(CH₃)₂); 115,09 (Ar-C); 116,52 (Ar-C); 117,80 (Ar-C); 118,73 (Ar-C), 120,50 (Ar-C); 123,45 (Ar-C); 127,82 (Ar-C); 128,93 (Ar-C); 128,95 (Ar-C); 129,21 (Ar-C); 129,50 (Ar-C); 131,06 (Ar-C); 133,06 (Ar-C); 135,90 (Ar-C); 142,84 (Ar-C); 151,31 (Ar-C); 169,59 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 17,01 min; čistost: 99,26%

5-bromo-2-(naftalen-1-sulfonamido)benzojska kislina (21)

M_r: 404,97

Izgled : Rjavo-bela amorfna snov

Izkoristek reakcije: 85,7 %

Retencijski faktor: 0,35 (MF: CH₂Cl₂/MeOH/AcOH = 5/1/0,1)

Temperatura tališča: 187,0 – 189,5 °C

MS (ESI): m/z = 406 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₁₇H₁₃NO₄SBr [M+H]⁺: izračunan 405,9749 in izmerjen 405,9744

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 7,40 (dd, 1H, J₁ = 8,9 Hz, J₂ = 0,3 Hz, Ar-H); 7,63 – 7,70 (m, 3H, Ar-H); 7,74 (ddd, 1H, J₁ = 8,6 Hz, J₂ = 6,9 Hz, J₃ = 1,6 Hz, Ar-H); 7,88 (dd, 1H, J₁ = 2,5 Hz, J₂ = 0,3 Hz, Ar-H); 8,08 – 8,12 (m, 1H, Ar-H); 8,26 – 8,29 (m, 1H, Ar-H); 8,32 (dd, 1H, J₁ = 7,4 Hz, J₂ = 1,2 Hz, Ar-H); 8,51 (dd, 1H, J₁ = 8,6 Hz, J₂ = 1,0 Hz, Ar-H); 11,72 (s, 1H, NH ali COOH); H iz NH ali COOH skupine je izmenjan

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 114,42 (Ar-C); 118,08 (Ar-C); 119,46 (Ar-C); 123,30 (Ar-C); 124,51 (Ar-C); 126,86 (Ar-C); 127,23 (Ar-C); 128,61 (Ar-C); 129,43 (Ar-C); 130,56 (Ar-C); 132,79 (Ar-C); 133,47 (Ar-C); 133,78 (Ar-C); 135,28 (Ar-C); 136,94 (Ar-C); 139,00 (Ar-C); 168,54 (Ar-C)

HPLC: retencijski čas: 21,33 min; čistost: 98,01 %

5-bromo-2-(5-dimetilamino)naftalen-1-sulfonamido)benzojska kislina (22)

M_r: 448,01

Izgled : Svetlo rumeni drobni kristali

Izkoristek reakcije: 96,6 %

Retencijski faktor: 0,43 (MF: CH₂Cl₂/MeOH/AcOH = 5/1/0,1)

Temperatura tališča: 186,5 – 189,0 °C

MS (ESI): m/z = 449 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₁₉H₁₈N₂O₄SBr [M+H]⁺: izračunan 449,0171 in izmerjen 449,0160

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 2,78 (s, 6H, N(CH₃)₂); 7,15—7,21 (m, 2H, Ar-H); 7,26 (dd, 1H, J₁ = 8,8 Hz, J₂ = 2,6 Hz, Ar-H); 7,47—7,59 (m, 2H, Ar-H); 7,82 (d, 1H, J = 2,6 Hz, Ar-H); 8,18 (dd, 1H, J₁ = 7,3 Hz, J₂ = 1,1 Hz, Ar-H); 8,33—8,42 (m, 2H, Ar-H); 2H od COOH in NH skupine sta izmenjana

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 45,06 (2C, N(CH₃)₂); 110,52 (Ar-C); 115,00 (Ar-C); 118,42 (Ar-C); 119,55 (Ar-C); 122,65 (Ar-C); 123,47 (Ar-C); 127,47 (Ar-C); 128,37 (Ar-C); 128,78 (Ar-C); 129,05 (Ar-C); 129,23 (Ar-C); 132,89 (Ar-C); 134,02 (Ar-C); 137,37 (Ar-C); 144,20 (Ar-C); 151,18 (Ar-C); 167,89 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 22,20 min; čistost: 99,68 %

3-(naftalen-1-sulfonamido)benzojska kislina (23)

M_r: 327,06

Izgled : Bela amorfna snov

Izkoristek reakcije: 96,7 %

Retencijski faktor: 0,41 (MF: CH₂Cl₂/MeOH/AcOH = 5/1/0,1)

Temperatura tališča: 195,0 – 196,5 °C

MS (ESI): m/z = 326 [M-H]⁻

ESI - HRMS: HRMS za C₁₇H₁₂NO₄S [M-H]⁻: izračunan 326,0487 in izmerjen 326,0502

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 7,25—7,32 (m, 2H, Ar-H); 7,47—7,52 (m, 1H, Ar-H); 7,59—7,71 (m, 3H, Ar-H); 7,75 (ddd, 1H, *J*₁ = 8,5 Hz, *J*₂ = 6,9 Hz, *J*₃ = 1,4 Hz, Ar-H); 8,05—8,10 (m, 1H, Ar-H); 8,20—8,25 (m, 2H, Ar-H); 8,72 (d, 1H, *J* = 8,5 Hz, Ar-H); 10,90 (s, 1H, NH); 12,91 (s, 1H, NH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 119,30 (Ar-C); 122,70 (Ar-C); 124,07 (Ar-C); 124,25 (Ar-C), 124,42 (Ar-C); 127,03 (Ar-C); 127,29 (Ar-C); 128,24 (Ar-C); 129,11 (Ar-C); 129,43 (Ar-C); 129,93 (Ar-C); 131,61 (Ar-C); 133,71 (Ar-C); 133,94 (Ar-C); 134,59 (Ar-C); 137,82 (Ar-C); 166,60 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 13,28 min; čistost: 100,0 %

3-(5-(dimetilamino)naftalen-1-sulfonamido)benzojska kislina (24)

M_r: 370,10

Izgled : Svetlo rumeni igličasti kristali

Izkoristek reakcije: 87,4 %

Retencijski faktor: 0,40 (MF: CH₂Cl₂/MeOH/AcOH = 5/1/0,1)

Temperatura tališča: 226,5 – 228,5 °C

MS (ESI): m/z = 369 [M-H]⁻

ESI - HRMS: HRMS za C₁₉H₁₇N₂O₄S [M-H]⁺: izračunan 369,0909 in izmerjen 369,0900

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 2,80 (s, 6H, N(CH₃)₂); 7,23—7,33 (m, 3H, Ar-H); 7,45—7,52 (m, 1H, Ar-H); 7,56—7,66 (m, 3H, Ar-H); 8,21 (dd, 1H, J₁ = 7,4 Hz, J₂ = 1,1 Hz, Ar-H); 8,34—8,38 (m, 1H, Ar-H); 8,42—8,47 (m, 1H, Ar-H); 10,86 (s, 1H, NH); 12,93 (s, 1H, COOH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 44,97 (2C, N(CH₃)₂); 115,29 (Ar-C); 118,40 (Ar-C); 119,13 (Ar-C); 122,50 (Ar-C); 123,46 (Ar-C); 124,09 (Ar-C); 128,27 (Ar-C); 128,84 (Ar-C); 128,90 (Ar-C); 129,41 (Ar-C); 129,74 (Ar-C); 130,26 (Ar-C); 131,60 (Ar-C); 134,38 (Ar-C); 137,91 (Ar-C); 151,44 (Ar-C); 166,61 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 11,11 min; čistost: 100,0 %

5-(naftalen-1-sulfonamid)izoftalna kislina (25)

M_r: 371,05

Izgled : Umazano bela amorfna snov

Izkoristek reakcije: 71,5 %

Retencijski faktor: 0,16 (MF: CH₂Cl₂/MeOH/AcOH = 5/1/0,1)

Temperatura tališča: 298,0 – 300,0 °C

MS (ESI): m/z = 372 [M+H]⁺

ESI - HRMS: HRMS za C₁₈H₁₄NO₆S [M+H]⁺: izračunan 372,0542 in izmerjen 372,0541

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 7,60—7,88 (m, 5H, Ar-H); 7,99—8,03 (m, 1H, Ar-H); 8,05—8,12 (m, 1H, Ar-H); 8,20—8,27 (m, 2H, Ar-H); 8,67—8,74 (m, 1H, Ar-H); 11,16 (s, 1H, NH); 13,25 (s, 2H, COOH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 122,66 (2C, 2 x Ar-C); 123,93 (Ar-C); 124,43 (Ar-C); 124,62 (Ar-C), 127,12 (Ar-C); 127,19 (Ar-C); 128,38 (Ar-C); 129,18 (Ar-C); 129,89 (Ar-C); 132,09 (2C, 2 x Ar-C); 133,64 (Ar-C); 133,73 (Ar-C); 134,81 (Ar-C); 138,33 (Ar-C); 165,87 (2C; 2 x C=O)

HPLC: retencijski čas: 11,89 min; čistost: 99,64 %

5-(5-(dimetilamino)naftalen-1-sulfonamido)izoftalna kislina (26)

M_r: 414,09

Izgled : Rumeni kristali

Izkoristek reakcije: 89,2 %

Retencijski faktor: 0,18 (MF: CH₂Cl₂/MeOH/AcOH = 5/1/0,1)

Temperatura tališča: 283,5 – 286,0 °C

MS (ESI) : m/z = 413 [M-H]⁻

ESI - HRMS: HRMS za C₂₀H₁₇N₂O₆S [M-H]⁻: izračunan 413,0807 in izmerjen 413,0800

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 2,80 (s, 6H, N(CH₃)₂); 7,26 (dd, 1H, J₁ = 7,6 Hz, J₂ = 0,4 Hz, Ar-H); 7,58—7,67 (m, 2H, Ar-H); 7,85 (d, 2H, J = 1,4 Hz, Ar-H); 8,01 (t, 1H, J = 1,4 Hz, Ar-H); 8,21 (dd, 1H, J₁ = 7,3 Hz, J₂ = 1,1 Hz, Ar-H); 8,32—8,37 (m, 1H, Ar-H); 8,43 – 8,48 (m, 1H, Ar-H); 11,11 (s, 1H, NH); 13,25 (s, 1H, COOH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 44,96 (2C, N(CH₃)₂); 115,37 (Ar-C); 118,25 (Ar-C); 122,57 (2C, 2 x Ar-C); 123,46 (Ar-C); 124,52 (Ar-C); 128,43 (Ar-C); 128,77 (Ar-C); 128,92 (Ar-C); 129,70 (Ar-C); 130,48 (Ar-C); 132,13 (2C, 2 x Ar-C); 134,07 (Ar-C); 138,41 (Ar-C); 151,50 (Ar-C); 165,91 (2C, 2 x C=O)

HPLC: retencijski čas: 9,57 min; čistost: 98,75 %

2-(naftalen-2-sulfonamido)benzojska kislina (27)

M_r: 327,06

Izgled : Umazano beli kristali

Izkoristek reakcije: 22,6 %

Retencijski faktor: 0,40 (MF: CH₂Cl₂/MeOH/AcOH = 5/1/0,1)

Temperatura tališča: 223,0 – 225,0 °C

MS (ESI): m/z = 326 [M-H]⁻

ESI - HRMS: HRMS za C₁₇H₁₂NO₄S [MH]⁺: izračunan 326,0487 in izmerjen 326,0479

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 7,04—7,12 (m, 1H, Ar-H); 7,49—7,60 (m, 2H, Ar-H); 7,63—7,74 (m, 2H, Ar-H); 7,76 (dd, 1H, J₁ = 8,7 Hz, J₂ = 2,1 Hz, Ar-H); 7,86 (dd, 1H, J₁ = 8,0 Hz, J₂ = 1,3 Hz; Ar-H); 7,97—8,03 (m, 1H, Ar-H); 8,08 (d, 1H, J = 8,7 Hz, Ar-H); 8,13 - 8,19 (m, 1H, Ar-H); 8,59 (d, 1H, J = 1,2 Hz, Ar-H); 11,26 (s, 1H, NH); H od COOH skupine je izmenjan

¹³C NMR (100 MHz, aceton-d₆): δ (ppm) = 117,62 (Ar-C); 120,32 (Ar-C); 123,92 (Ar-C); 124,89 (Ar-C), 129,63 (Ar-C); 129,79 (Ar-C); 130,75 (Ar-C); 131,03 (Ar-C); 131,18 (Ar-C); 131,51 (Ar-C); 133,54 (Ar-C); 133,91 (Ar-C); 136,55 (Ar-C); 136,85 (Ar-C); 138,16 (Ar-C); 142,67 (Ar-C); 171,43 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 18,02 min; čistost: 97,65 %

5-bromo-2-(naftalen-2-sulfonamido)benzojska kislina (28)

M_r: 404,97

Čiščenje: spiranje s heksanom in filtriranje z odsesavanjem

Izgled : Rjavo-beli kristali

Izkoristek reakcije: 55,5 %

Retencijski faktor: 0,36 (MF: CH₂Cl₂/MeOH/AcOH = 5/1/0,1)

Temperatura tališča: 200,0 – 202,5 °C

MS (ESI) : m/z = 404 [M-H]⁻

ESI - HRMS: HRMS za C₁₇H₁₁NO₄SBr [MH⁺]: izračunan 403,9592 in izmerjen 403,9609

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 7,51 (dd, 1H, J₁ = 8,8 Hz, J₂ = 0,3 Hz, Ar-H); 7,65—7,74 (m, 3H, Ar-H); 7,76 (dd, 1H, J₁ = 8,9 Hz, J₂ = 2,0 Hz, Ar-H); 7,93 (dd, 1H, J₁ = 2,3 Hz, J₂ = 0,3 Hz, Ar-H); 8,00—8,04 (m, 1H, Ar-H); 8,10 (d, 1H, J = 8,9 Hz, Ar-H); 8,15—8,19 (m, 1H, Ar-H); 8,60 (d, 1H, J = 2,0 Hz, Ar-H); 11,24 (s, 1H, COOH); H iz NH skupine je izmenjan

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 114,92 (Ar-C); 118,99 (Ar-C); 120,56 (Ar-C); 121,62 (Ar-C); 127,82 (Ar-C); 127,84 (Ar-C); 128,59 (Ar-C); 129,35 (2C,2 x Ar-C);

129,81 (Ar-C); 131,46 (Ar-C); 133,47 (Ar-C); 134,44 (Ar-C); 135,27 (Ar-C); 136,87 (Ar-C); 138,82 (Ar-C); 168,28 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 22,10 min; čistost: 99,74 %

3-(naftalen-2-sulfonamido)benzojska kislina (29)

M_r: 327,06

Čiščenje: spiranje s heksanom in filtriranje z odsesavanjem

Izgled : Svetlo rjava amorfna spojina

Izkoristek reakcije: 45,5 %

Retencijski faktor: 0,43 (MF: CH₂Cl₂/MeOH/AcOH=5/1/0,1)

Temperatura tališča: 226,0 – 228,0 °C

MS (ESI): m/z = 326 [M-H]⁻

ESI - HRMS: HRMS za C₁₇H₁₂NO₄S [M-H]⁻: izračunan 326,0487 in izmerjen 326,0499

¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 7,33 (ddd, 1H, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 7,5 Hz, J₃ = 0,4 Hz, Ar-H); 7,38 (ddd, 1H, J₁ = 8,1 Hz, J₂ = 2,2 Hz, J₃ = 1,4 Hz, Ar-H); 7,55 (dt, 1H, J₁ = 7,5 Hz, J₂ = J₃ = 1,4 Hz, Ar-H); 7,62—7,72 (m, 3H, Ar-H); 7,77 (dd, 1H, J₁ = 8,7 Hz, J₂ = 1,8 Hz, Ar-H); 7,98—8,01 (m, 1H, Ar-H); 8,09 (d, 1H, J = 8,7 Hz, Ar-H); 8,11—8,14 (m, 1H, Ar-H); 8,44 (d, 1H, J = 1,8 Hz, Ar-H); 10,64 (s, 1H, NH); 13,00 (s, 1H, COOH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 120,51 (Ar-C); 121,80 (Ar-C); 123,93 (Ar-C); 124,80 (Ar-C); 127,71 (Ar-C); 127,79 (Ar-C); 127,96 (Ar-C); 129,02 (Ar-C); 129,17 (Ar-C); 129,47 (Ar-C); 129,54 (Ar-C); 131,44 (Ar-C); 131,65 (Ar-C); 134,21 (Ar-C); 136,14 (Ar-C); 137,92 (Ar-C); 166,60 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 14,12 min; čistost: 100,0 %

5-(naftalen -2-sulfonamido)izoftalna kislina (30)

M_r: 371,05

Izgled : Umazano bela amorfna spojina

Izkoristek reakcije: 80,7 %

Retencijski faktor: 0,18 (MF: CH₂Cl₂/MeOH/AcOH = 5/1/0,1)

Temperatura tališča: 273,0 – 277,0 °C

MS (ESI): m/z = 370 [M-H]⁻

ESI - HRMS: HRMS za C₁₈H₁₂NO₆S [M-H]⁻: izračunan 370,0385 in izmerjen 370,0374

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 7,61—7,73 (m, 2H, Ar-H); 7,74—7,80 (m, 1H, Ar-H); 7,92 – 7,96 (m, 2H, Ar-H); 8,00 (d, 1H, J = 8,1 Hz, Ar-H); 8,05 – 8,16 (m, 3H, Ar-H); 8,45 (m, 1H, Ar-H); 10,85 (s, 1H, NH); 13,27 (s, 2H, COOH)

¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆): δ (ppm) = 117,32 (Ar-C); 118,07 (Ar-C); 121,66 (Ar-C); 123,98 (Ar-C), 125,23 (Ar-C); 127,82 (2C, 2 x Ar-C); 127,99 (Ar-C); 129,14 (Ar-C); 129,21 (Ar-C); 129,71 (Ar-C); 131,45 (Ar-C); 132,17 (Ar-C); 134,27 (Ar-C); 135,92 (Ar-C); 138,45 (Ar-C); 165,90 (C=O); 167,14 (C=O)

HPLC: retencijski čas: 12,45 min; čistost: 99,30 %

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

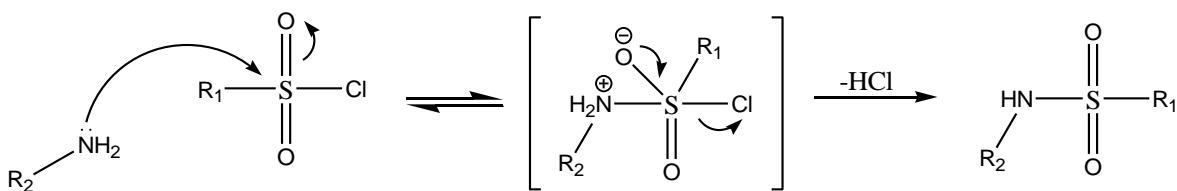
5.1 KOMENTAR K SINTEZNIM POSTOPKOM

5.1.1 Uvedba metilne zaščite na karboksilno skupino

V primeru 3-aminobenzojske kisline A smo najprej zaščitili karboksilno skupino, saj bi drugače na tem mestu lahko potekale neželene reakcije. Odločili smo se za estrsko zaščito, saj so zanjo značilni selektivni in mili pogoji odstranjevanja. Reakcija tvorbe metilnega estra je potekla v dveh korakih. V prvem koraku reakcije se s tionil kloridom (SOCl_2) tvori reaktivnejši derivat karboksilne kisline, t.j. kislinski klorid, ki predstavlja aktivirano karboksilno kislino. Pri tem nastaneta tudi HCl in SO_2 , ki kot plina zapustita reakcijsko zmes, s tem pa naredita korak ireverzibilen (32). Ker je ta stopnja eksotermnega značaja, je bilo potrebno hlajenje na ledu. V drugem koraku nastali kislinski klorid z metanolom reagira v ester. Reakcija poteka pri povišani temperaturi. Metanol v reakciji sodeluje kot reagent in topilo.

5.1.2 Tvorba sulfonamidne vezi

Poznamo več pristopov za sintezo sulfonamidov. Najbolj poznan način je z nukleofilno substitucijo med sulfonil kloridom in amonijakom oziroma aminom (primarnim ali sekundarnim). Reakcija poteka ob prisotnosti šibke baze (Et_3N ali piridin), ki je potrebna za nevtralizacijo kisline. Tekom reakcije namreč nastaja HCl , ki bi lahko protonirala NH_2 skupino anilina (konkretno za naš primer) in ga s tem pretvorila v slabši nukleofil (slika 18). Pri postopku A smo kot topilo uporabili diklorometan, pri postopku B pa tetrahidrofuran.



Slika 18: Mehanizem tvorbe sulfonamidne vezi med aminom ter sulfonil kloridom.

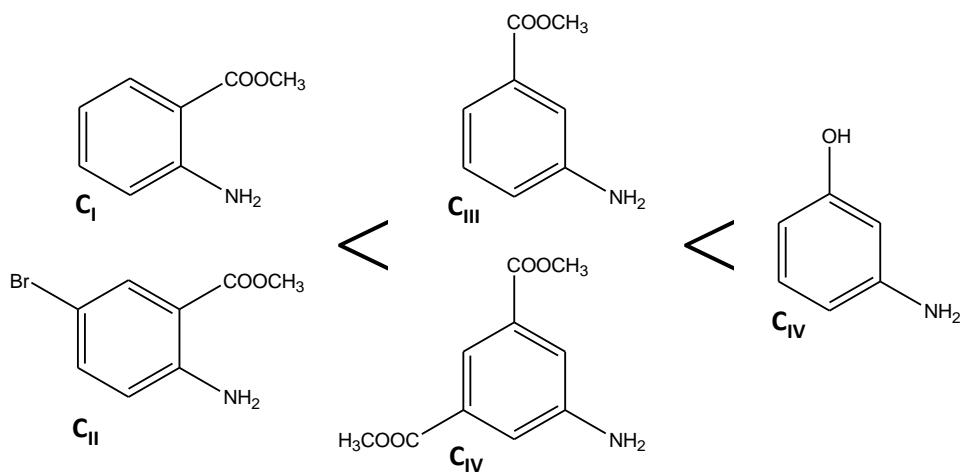
Postopek A:

Reakcijski pogoji so bili enaki za sintezo vseh sulfonamidnih spojin. Kljub temu, pa smo za reakcijo dobili zelo različne izkoristke – od 1,4% pa do 97%. Najnižja izkoristka sta imeli spojini **17** (1,4 %) ter **18** (10 %), ki sta slabo reagirali predvsem zaradi slabe topnosti izhodnega kinolin-8-sulfonil klorida. Topnost smo želeli povečati na več načinov: preizkusili smo različna topila (aceton, metanol, etanol, voda, dioksan, DMSO, dimetilformamid, kombinacije teh topil), uporabili prebitke izhodne spojine, močno podaljšali reakcijski čas in pa segrevali reakcijsko zmes. Kljub modifikacijam sinteznega postopka, izkoristka reakcije nismo uspeli izboljšati. Zato smo se raje osredotočili na sintezo naftalenskih derivatov, katerih izkoristki so bili veliko boljši in primerljivi s podatki iz literature (21 % - 62 %). Pri spojinah **17** in **18** hidrolize estra nismo naredili, saj sta bili dobljeni masi prenizki.

Čeprav naj bi bila uporaba ene ali druge baze med seboj enakovredna (Et_3N ter piridin sta primerljivi Lewisovi bazi), pa smo s primerjavo rezultatov med spojinami ugotovili, da je bil v primerih, ko je kot baza nastopal piridin, potek reakcij bolj kvantitativen. V reakcijski zmesi je zastalo manj izhodnih spojin, to pa je pomenilo tudi manj čiščenja s kolonsko kromatografijo in s tem manj izgub (zaradi adsorpcije produkta na silikagel). To najbolje vidimo z direktno primerjavo izkoristkov za obe bazi pri sintezah spojin **2** ter **8**. Zakaj so izkoristki reakcije večji ob uporabi piridina, ne vemo. Lahko le ugibamo. Et_3N je v primerjavi s piridinom močnejša baza in bi tako lahko hitreje nevtraliziral nastalo kislino (preprečeval nastanek $-\text{NH}_3^+$), vendar je to ravno v nasprotju z opaženim fenomenom. Uporabljena baza bi lahko povzročila spremembo dielektrične konstante topila – dielektrična konstanta piridina je večja v primerjavi z Et_3N – ter tako vplivala na polarnost topila. Vemo namreč, da reakcija poteka preko bolj polarnega prehodnega stanja, zato bi povečanje polarnosti topila reakcijo pospešilo. Vendar je volumen baze najverjetneje prenizek, da bi imel resen vpliv. Iz literature pa je znano, da lahko piridin tvori komplekse s sulfonil kloridi, ki imajo katalitičen efekt (33). Mogoče je to razlog za bolj kvantitativen potek reakcij.

Na potek reakcije in pa njen izkoristek gotovo vpliva tudi narava substituentov in pa njihov položaj na anilinu. Amino skupina anilina, zaradi delokalizacije neveznega elektronskega para z dušika v benzenov obroč, ni najboljši nukleofil. Elektronprivlačne skupine (npr. COOCH_3) lahko še dodatno znižajo nukleofilnost dušika. Vpliv je večji, če je skupina

vezana na orto ali para položaju in manjši, če je skupina vezana na meta položaju glede na amino skupino (34). Iz dobljenih izkoristkov reakcije pri posameznih derivatih anilina, bi nekaj podobnega lahko sklepali tudi sami. Najslabše so potekle reakcije z metil antranilatom (C_I) in metil 2-amino-5-bromobenzoatom (C_{II}). Boljše izkoristke sta imela metil 3-aminobenzoat (C_{III}) ter dimetil 5-aminoizoftalat (C_{IV}), najbolje pa je reakcija potekla takrat, ko je imela vlogo nukleofila amino skupina 3-hidroksi anilina (C_V). Tudi hidrosilna skupina deluje kot elektronprivlačna, a manj v primerjavi z estrsko skupino (34) (slika 19).



Slika 19: **Derivati anilina kot nukleofili.** Pri derivatih, ki so imeli COOCH_3 skupino vezana na orto položaju glede na amino skupino, so bili izkoristki reakcije najnižji. 3-hidroksi anilin (C_V), na desni strani, je najboljši nukleofil.

Postopek B:

Isto reakcijo smo poskusili narediti tudi v mikrovalovnem reaktorju. V primerjavi s konvencionalnimi metodami naj bi mikrovalovna tehnologija, zaradi selektivnega in učinkovitega načina segrevanja, omogočala: hitrejši potek reakcij in s tem skrajšanje potrebnega časa za reakcijo, visoke izkoristke, večjo ponovljivost reakcij ter manjšo porabo topil (35, 36). V nasprotju s podatki iz literature, naši izkoristki niso bili dobri. Tudi s podaljšanjem časa na 120 minut in povisnjem temperature na $70\text{ }^\circ\text{C}$ nismo uspeli dvigniti izkoristka nad 15%. Zato smo se pri sintezi spojin raje posluževali postopka A.

5.1.3 Alkalna hidroliza

Metilno zaščito smo odstranili v bazičnih pogojih z uporabo 1 M raztopine NaOH v dioksanu. Sulfonamidna vez, ki je tudi del strukture v spojinah, se cepi le v kislem (koncentrirani HCl oziroma v 30 % HBr ob refluksu), zato ni bilo nevarnosti za stranske reakcije. Potek hidrolize je bil v vseh primerih popoln (na TLC ploščici vidna le ena lisa), z izkoristki večinoma nad 80 %. Občutno nižji izkoristek je bil le pri spojini **27**, vzrok temu pa je bila najverjetneje slabša izolacija. Po hidrolizi je produkt, ki je običajno v obliki soli in pri prvem spiranju z etilacetatom ostane v vodni fazi, očitno prešel v organsko etilacetatno fazo. Slednjo smo zavrgli, produkt pa tako izgubili. Izkoristek je bil nekoliko nižji (okrog 50 %) tudi v primeru spojin **19**, **28** ter **29**. Z nečistim etilacetatom, ki smo ga uporabljali pri ekstrakciji, smo v spojine vnesli določene nečistote. Za njihovo odstranitev je bilo potrebno spiranje s heksanom in filtriranje z odsesavanjem, pri tem pa je gotovo prišlo do manjših izgub v produktu.

5.2 REZULTATI BIOLOŠKEGA TESTIRANJA SPOJIN

Rezidualna aktivnost predstavlja razmerje katalitičnih aktivnosti encima v prisotnosti inhibitorja ter brez njega. Izražamo jo v odstotkih (RA %), pri tem pa moramo navajati tudi koncentracijo inhibitorja (npr. 1 mM). Manjše vrednosti RA pomenijo boljšo inhibicijo, torej spojina pri dani koncentraciji upočasni encimsko reakcijo v večji meri. Določanje rezidualnih aktivnosti je neke vrste presejalni test, s katerim med testiranimi spojinami ugotavljamo potencialne inhibitorje. Spojinam, ki izkazujejo učinkovitost (v našem primeru vrednosti RA \leq 30 %) se določi še IC₅₀ vrednost. Gre za koncentracijo inhibitorja, pri kateri se aktivnost encima zmanjša za 50 % oziroma, kjer je RA 50 %. Določimo jo s pomočjo krivulje na grafu, predpostavljene z nelinearno regresijo. Ta opisuje spremenjanje vrednosti RA v širšem koncentracijskem območju inhibitorja. Za njeno določitev je potrebno izmeriti RA pri vsaj sedmih različnih koncentracijah inhibitorja. IC₅₀ je bolj merodajna, saj je možnost eksperimentalne napake nižja.

Preglednica VIII: Rezultati bioloških testiranj sintetiziranih spojin na transpeptidaze PBP2a, PBP5fm ter PBP1b. Vse RA vrednosti so bile določene pri koncentraciji spojin 1 mM, razen dveh izjem, ki nista bili topni v tej koncentraciji. Označeni sta s * (pri 200 µM) oziroma s ** (pri 100 µM). RA vrednosti nad 100 % so posledica eksperimentalne napake. Oznaka / pomeni, da spojine na dani encim niso bile testirane.

Oznaka spojine	Struktura	RA [%] (IC ₅₀)		
		PBP2a (MRSA)	PBP5fm (<i>E. faecium</i>)	PBP1b (<i>S. pneumoniae</i>)
10		92	100	131±4
11		96	/	99±6 *
16		98	89	98 ± 5 **
19		30 IC ₅₀ = 740 µM	92	89 ± 1
20		5 IC ₅₀ = 536 µM	92	77± 1

<u>21</u>		14 $IC_{50} = 297 \mu M$	100	5 ± 7 $IC_{50} = 540 \mu M$
<u>22</u>		4 $IC_{50} = 245 \mu M$	86	1 ± 4 $IC_{50} = 416 \mu M$
<u>23</u>		92	100	111 ± 13
<u>24</u>		84	89	61 ± 13
<u>25</u>		100	100	98 ± 4

<u>26</u>		99	99	104± 9
<u>27</u>		11 $IC_{50} = 425 \mu M$	100	97 ± 1
<u>28</u>		7 $IC_{50} = 80 \mu M$	100	40±2
<u>29</u>		100	97	100 ± 2
<u>30</u>		90	100	112± 25

Sintetizirane spojine delujejo kot nekovalentni inhibitorji. Gre za predpostavko, ki smo jo postavili na podlagi strukturne podobnosti naših spojin s spojinama 1 in 2. Ti dve spojini, ki sta predstavljali izhodišče za naše delo sta v literaturi namreč opisani kot nekovalentna inhibitorja. Dokaz nekovalentnega tipa vezave temelji na ugotovitvi, da se s podaljševanjem časa inkubacije med encimom in inhibitorjem, delež inhibicije ni spremenjal. Pri kovalentnih inhibitorjih pa bi delež inhibicije s časom naraščal (25).

PBP2a

Rezultati biološkega testiranja spojin so podani v preglednici VIII. Na encimu je bilo testiranih petnajst spojin, od katerih jih je kar šest izkazovalo inhibitorno aktivnost. Za najboljšega inhibitorja PBP2a se je izkazala spojina 28 z IC_{50} 80 μM . Z medsebojno

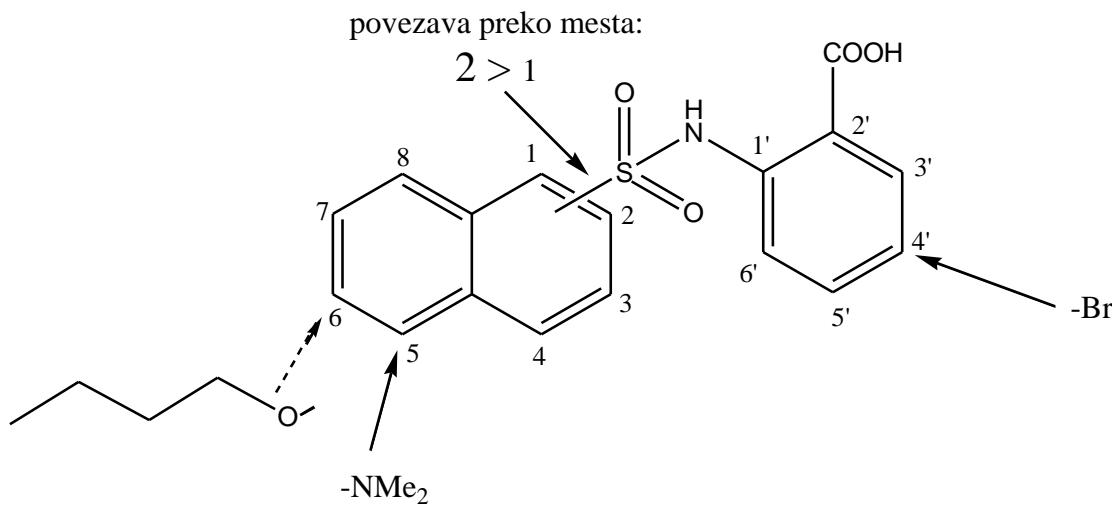
primerjavo spojin lahko razložimo odnos med njihovo strukturo in delovanjem. Vse, na PBP2a učinkovite spojine (**19**, **20**, **21**, **22**, **27** ter **28**) imajo na orto položaju benzenovega obroča glede na sulfonamidno vez vezano karboksilno skupino. Pomen te skupine za inhibitorno aktivnost je potrdila tudi analiza sidranja najbolj aktivne spojine **28** v aktivno mesto PBP2a (slika 21). Program FlexX je predvidel, da karboksilna skupina (je v obliki karboksilata) tvori kar dve vodikovi vezi in sicer z aminokislinskima ostankoma Asn464 ter Ser462. Pri tem je potrebno še enkrat poudariti, da je ključnega pomena položaj karboksilne skupine na benzenovem obroču, saj derivati z drugačno substitucijo niso izkazovali aktivnosti.

Najboljši trije inhibitorji encima PBP2a (**28**, **22**, **21**) so imeli na para poziciji benzenovega obroča glede na sulfonamidno vez vezan brom. Njegov vpliv na inhibitorno aktivnost spojin je najbolj očiten, če primerjamo IC₅₀ vrednosti spojin, ki se med seboj razlikujeta le po prisotnosti broma. IC₅₀ vrednost spojine **28** je bila 80 µM, spojine **27**, ki nima bromata (a drugače enako strukturo), pa 425 µM. Torej je spojina **27** kar 5x slabši inhibitor. Podobno kot brom, ima pomemben doprinos za inhibitorni učinek tudi dimetilamino skupina, vezana na petem mestu naftalena. To nam pokaže primerjava spojin **19** ter **20** ali pa **21** ter **22**. Zanimivo pa je, da pri sidranju spojin nismo uspeli pokazati, da bi katerakoli izmed obeh skupin (brom ali dimetilamino skupina) tvorila pomembnejše interakcije z aktivnim mestom ter na ta način pripomogla k boljši vezavi. Brom bi lahko preko svojih elektronskih vplivov deloval na daljavo ter tako povečal moč H-vezi z aminokislinskimi ostanki v aktivnem mestu. Dimetilamino skupina, pa je najverjetneje pomembna za stik spojine s topilom. Je tako kot topilo polarnega značaja in to je ugodno.

Sintetizirane spojine so se med seboj razlikovale tudi po tem, ali je šla sulfonamidna povezava preko prvega ali drugega mesta na naftalenskem obroču. Spojine, ki so bile derivati 2-naftalensulfonamida (povezava torej preko drugega mesta na naftalenu) so izkazovale dva do trikrat večjo inhibitorno aktivnost (primerjava spojin **28** ter **21** ozziroma **27** ter **19**).

Če na kratko povzemamo: inhibitorji PBP2a so spojine, ki so derivati antranilne kisline. Meta položaj benzenovega obroča glede na sulfonamidno vez mora ostati prost. Derivati, pri katerih gre sulfonamidna povezava preko drugega mesta na naftalenu, so boljši inhibitorji kot spojine, pri katerih gre povezava preko mesta ena. Učinek se poveča, če je

para položaj benzenovega obroča glede na sulfonamidno vez substituiran z bromom oziroma je na petem mestu naftalena vezana dimetilamino skupina (slika 19).



Slika 20 : **Odnos med strukturo in delovanjem pri encimu PBP2a.** Skupine, prikazane s polno puščico, pripomorejo k učinku. Pri alkil-okso skupini, ki je označena s črtkano puščico, pa to le predvidevamo.

Spojino **28**, ki je naš najboljši inhibitor, bi z modifikacijo naftalenskega dela molekule, morda lahko naredili še učinkovitejšo. Z vezavo dimetilamino skupine na peto mesto naftalena bi najverjetneje lahko povečali njen inhibitorni učinek. Podobno bi pričakovali tudi po vezavi alkil-oksi skupine na mesto šest naftalena (po zgledu spojine 1 iz literature).

PBP5fm

RA vrednosti vseh sintetiziranih spojin na transpeptidazo PBP5fm so visoke, kar pomeni, da nobena izmed spojin ne kaže inhibitorne aktivnosti na ta encim. Še najboljša je bila spojina **22** z RA 86%. Popolna izguba aktivnosti ni presenetljiva, saj je bila že spojina 2 (strukturo te smo modificirali) precej skromen inhibitor. Žal nam ni uspelo pripraviti spojin, ki bi imele za osnovo kinolin. Podobno kot naftalen, ima tudi kinolin ravninsko lego. Razlika pa je v dušiku, ki lahko tvori vodikove vezi (nevezni elektronski par dušika v kinolinu ni delokaliziran). Te bi lahko pripomogle k vezavi v aktivno mesto PBP5fm. Možen bi bil lahko še en razlog. Iz rešene kristalne strukture encima vemo, da se blizu aktivnega mesta nahaja ostanek glutaminske kisline, Glu622, ki bi lahko oviral dostop antibiotikom do aktivnega mesta, zlasti, če so ti negativno nabiti (prosta COOH skupina).

Zato bi bilo zanimivo pripraviti tudi derivate spojin, pri katerih bi prosto karboksilno skupino zamenjali z amidom (po zgledu spojine 2 iz literature).

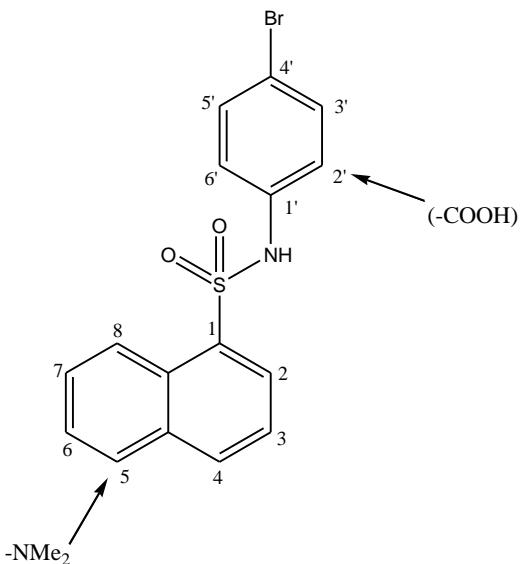
Čeprav ni bila nobena izmed testiranih spojin aktivna na PBP5fm, pa nam tudi negativen rezultat nekaj pove. Sintetizirane sulfonamidne spojine imajo do aktivnih mest PBP5fm ter PBP2a različno afiniteto.

PBP1b

Encim PBP1b iz *S. pneumoniae* je visokomolekularen bifunkcionalen PBP (razred A), ki ima tako glikoziltransferazno kot tudi transpeptidazno domeno. Spremenjene oblike penicilin vezičih proteinov (natančneje transpeptidaznih domen), ki imajo zmanjšano afiniteto za vezavo β -laktamov, so poznane tudi iz sevov *S. pneumoniae*, vendar PBP1b ne spada mednje. Je primer encima, ki je dovzeten za inhibicijo z β -laktamskimi antibiotiki (18, 21). V tem se razlikuje tudi od encimov PBP2a ter PBP5fm, ki spadata med rezistentne oblike transpeptidaz. Sintetizirane spojine smo testirali na PBP1b, da bi preverili njihovo inhibitorno aktivnost na encim, ki je neodporen na β -laktame.

Ugotovili smo, da od testiranih sulfonamidov, encim PBP1b najbolj inhibirata spojini 22 ter 21. Nekoliko manjšo inhibitorno aktivnost pa ima tudi spojina 28 (RA = 40 %). Spojini 22 in 21 sta hkrati tudi inhibitorja encima PBP2a, kar nam pove, da sta si ti dve aktivni mesti med seboj bolj podobni. Obstajajo pa seveda razlike. Na PBP1b so gotovo bolj aktivne tiste spojine, pri katerih je fenilni obroč preko sulfonamidne vezi vezan na mesto ena naftalena. Spojina 28, ki je derivat 2-naftalensulfonamida, ima že precej nižjo inhibitorno aktivnost. Poleg tega smo ugotovili, da je za aktivnost na PBP1b pomembna prisotnost broma na para položaju benzena glede na sulfonamidno vez. To lepo pokaže medsebojna primerjava spojin 19, 20, 21 ter 22. Spojini 21, 22 sta inhibitorja encima PBP1b, medtem ko spojini 19 in 20 nista. Oba para spojin se medsebojno razlikujeta le v vezavi broma. Ali k inhibitorni aktivnosti spojin 21 ter 22 pripomore tudi karboksilna skupina na orto položaju benzena, pa ne moremo vedeti. Nimamo namreč spojine, ki bi na benzenovem obroču vsebovala zgolj brom, brez COOH. Možno bi bilo, da sta za delovanje na PBP1b hkrati potrebna brom in karboksilna skupina.

Podobno kot pri encimu PBP2a, dimetilamino skupina na petem mestu naftalena, poveča inhibitorni učinek spojin. Tako je IC_{50} vrednost inhibitorja **21** $540 \mu M$, inhibitorja **22**, ki ima omenjeno skupino, pa $416 \mu M$.



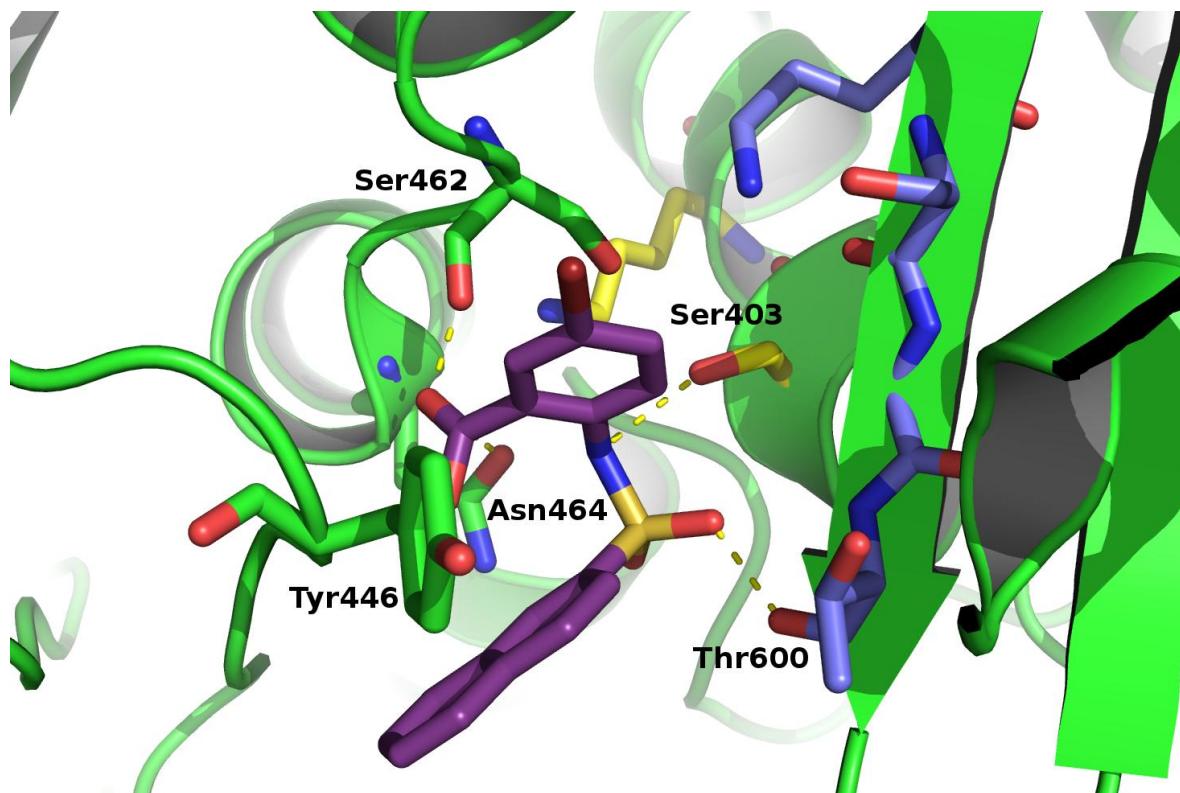
Slika 21: **Odnos med strukturo in delovanjem pri encimu PBP1b.** Ker nimamo spojine, ki bi na benzenovem obroču vsebovala brom, ne pa tudi karboksilne skupine, ne moremo vedeti, ali je ta pomembna za aktivnost na PBP1b.

Najboljši inhibitor (spojino **22**) smo s programom FlexX skušali umestiti tudi v aktivno mesto encima PBP1b, vendar sidranje ni bilo uspešno. Program je spojino povsem narobe postavil v aktivno mesto, ocena vezavne energije pa je bila slaba.

Sintetizirane spojine izkazujejo zmerno inhibitorno aktivnost. Medtem ko so IC_{50} vrednosti pri naših spojinah okrog $100 \mu M$ oziroma višje, imajo β -laktami, ki delujejo na isto tarčo tudi do $100x$ nižje vrednosti IC_{50} . Kljub temu pa sintetizirane spojine, kot nekovalentni inhibitorji predstavljam pomembno odkritje. Delujejo na rezistentne oblike transpeptidaz, z nadaljnjam načrtovanjem in spremnjanjem njihove strukture pa bi lahko dobili zelo učinkovita protibakterijska sredstva.

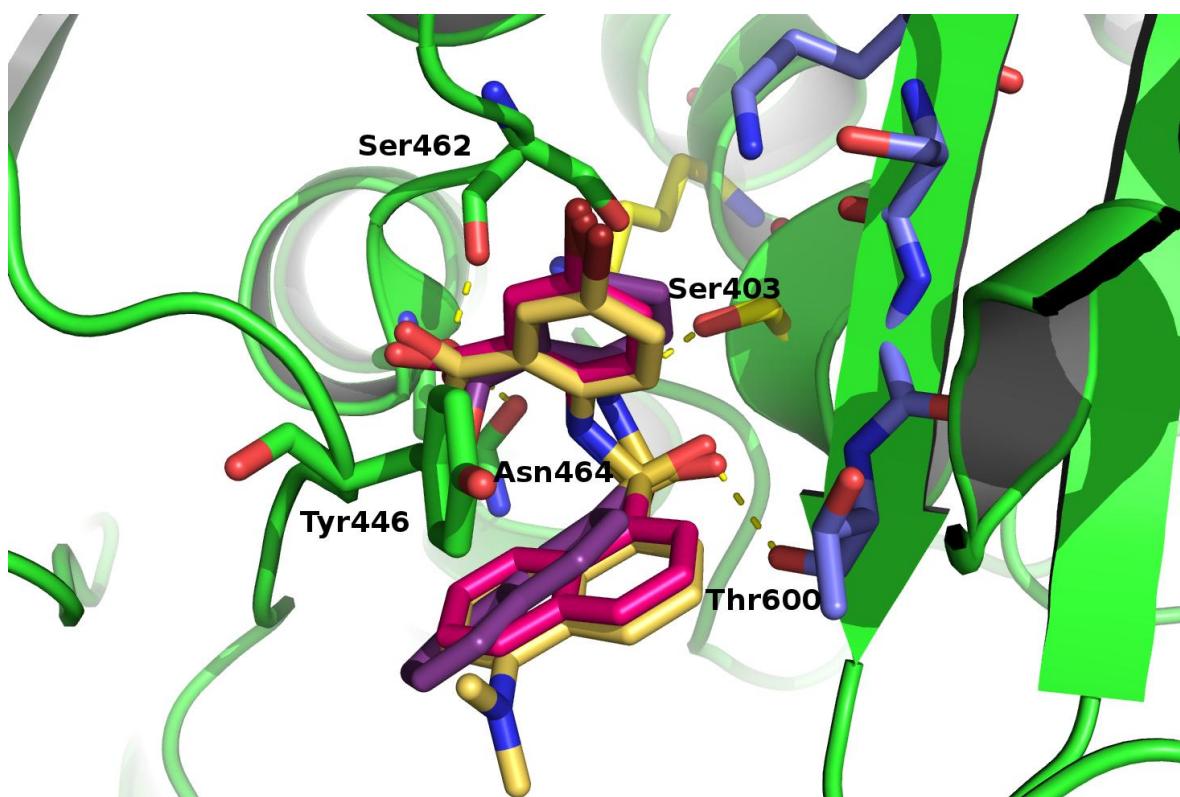
5.3 REZULTATI SIDRANJA NA ENCIM PBP2A

Na sliki 22 je prikazana računalniška simulacija vezave spojine **28** v aktivno mesto transpeptidaze PBP2a. Kot je vezavo predvidel program FlexX, so med funkcionalnimi skupinami inhibitorja in aminokislinskimi ostanki znotraj aktivnega mesta možne štiri vodikove vezi. Sulfonamidna vez omogoča tvorbo dveh: med kisikom sulfonamida ter Thr600 se tvori prva vodikova vez, druga vodikova vez pa poteka med dušikom v sulfonamidni vezi ter katalitičnim Ser403. Glede na položaj, ki ga sulfonamidna vez zavzame znotraj aktivnega mesta, bi lahko rekli, da deluje kot mimetik peptidne vezi v naravnem substratu D-Ala-D-Ala. Preostali dve vodikovi vezi pa tvori karboksilatna skupina na benzenovem obroču z aminokislinskima ostankoma Ser462 ter Asn464. Vsi omenjeni aminokislinski ostanki so del konservativnih motivov, ki so značilnost transpeptidazne domene in ki določajo aktivno mesto encima. Dodatne interakcije (π -interakcije) so možne še med naftalenskim obročem spojine ter Tyr446.



Slika 22: Predpostavljen način vezave spojine **28** v aktivno mesto transpeptidaze PBP2a (pdb koda: **1VQQ**). Spojina je vijolične barve; modro označeni so aminokislinski ostanki tretjega konservativnega motiva; aminokislinski ostanki prvega konservativnega motiva so rumeni; Ser 462 ter Asn 446 kot del drugega konservativnega motiva pa sta zelena.

S programom za sidranje smo ocenili vezavo v aktivno mesto tudi pri spojinah 22 ter 21, ki sta bila med testiranimi spojinami drugi oziroma tretji najboljši inhibitor encima PBP2a. Slika 23 nam omogoča primerjavo vezave v aktivno mesto transpeptidaze PBP2a vseh treh najboljših inhibitorjev. Čeprav vse tri spojine tvorijo enake interakcije (4 vodikove vezi ter π -interakcija), lahko že iz slike vidimo da je spojina 28 najboljše umeščena v aktivnem mestu encima. Razdalja H-vezi je bolj optimalna kot pri drugih dveh spojinah, kar se kaže s tem, da je tudi FlexX to spojino ocenil z večjo vezavno energijo. Razliko med inhibitorjema 22 ter 21, ki se razlikujeta le po dimetilamino skupini na petem mestu naftalena, pa s pomočjo sidranja ne moremo razložiti, saj med to skupino in aktivnim mestom program ni predvidel nobenih interakcij. Dimetilamino skupina je najverjetneje pomembna za stik spojine s topilom.



Slika 23: **Sidranje spojin 28, 22 ter 21 v aktivno mesto transpeptidaze PBP2a ter primerjava načina njihove vezave.** Spojina 28 je vijolične barve; spojina 22 je rumena, spojina 21 pa roza barve. Modro označeni so aminokislinski ostanki tretjega konservativnega motiva; aminokislinski ostanki prvega konservativnega motiva so rumeni; Ser 462 ter Asn 446 kot del drugega konservativnega motiva sta zelena.

6. SKLEP

V okviru diplomske naloge smo načrtovali in sintetizirali 15 novih sulfonamidnih spojin kot potencialnih inhibitorjev bakterijskih transpeptidaz. Sulfonamidno vez smo tvorili med sulfonil kloridi ter derivati anilina. Potek reakcije je bil odvisen od izbrane baze ter od narave in položaja substituentov na anilinu. Piridin kot baza je omogočal bolj kvantitativen potek reakcij. Elektronprivlačne skupine na benzenu, pa so zmanjšale nukleofilnost amino skupini in s tem povzročile slabši potek reakcij (nižji izkoristki).

Rezultati so pokazali, da sintetizirane spojine najbolj inhibirajo aktivnost transpeptidaze PBP2a, v manjši meri delujejo na PBP1b, na encim PBP5fm pa niso aktivne. Testiranje istega nabora spojin na tri encime nam je omogočilo primerjavo afinitet spojin do treh aktivnih mest. Čeprav sevi MRSA ter sevi *E. faecium* dosegajo rezistenco na β -laktame po istem mehanizmu, t.j. preko spremenjene transpeptidazne domene encimov PBP, si encima PBP2a ter PBP5fm oziroma njuni aktivni mesti med seboj nista podobni. Večja podobnost obstaja med PBP2a ter PBP1b. Z medsebojno primerjavo inhibitorjev teh dveh encimov smo lahko določili strukturne lastnosti, potrebne za aktivnost na en ali drugi encim. Karboksilna kislina, vezana na orto mestu benzena, glede na sulfonamidno vez, je pomembna za delovanje na transpeptidazo PBP2a. Istega pa ne moremo trditi za encim PBP1b. Na encim PBP2a so delovali tako derivati 2-naftalensulfonamida kot tudi 1-naftalensulfonamida. Na PBP1b aktivne spojine pa so derivati 1-naftalensulfonamida. Pri obeh encimih pa velja, da učinkovitost spojine kot inhibitorja, poveča brom (vezan na para mestu benzena glede na sulfonamidno vez) ter dimetilamino skupina (na petem mestu naftalena).

Najboljši inhibitor na PBP2a je bila spojina **28** z $IC_{50} = 80 \mu\text{M}$. Gre za zmerno inhibicijo, saj imajo β -laktamskimi antibiotiki, ki prav tako delujejo na transpeptidaze tudi 100x nižje IC_{50} vrednosti. Vendar spojine kot nekovalentni inhibitorji predstavljajo zelo pomembno izhodišče za nadaljnje raziskave in razvoj.

7. LITERATURA

1. Saga T, Yamaguchi K: History of Antimicrobial Agents and Resistant Bacteria. JMAJ 2009; 52: 103–108.
2. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: Rang and Dale's Pharmacology, Sixth Edition, Churchill Livingstone, 2007: 645-691.
3. David AW, Thomas LL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, Fifth Edition, Lippincott Williams&Wilkins, 2002, 819-866.
4. Overbye KM, Barret JF: Antibiotics: where did we go wrong? DDT 2005; 10: 45–52.
5. Spellberg B, Powers JH, Brass EP, Miller LG, Edwards JE Jr: Trends in Antimicrobial Drug Development: Implications for the Future. Clin Infect Dis 2004; 38: 1279–1286.
6. Wenzel RP: The Antibiotic Pipeline – Challenges, Costs, and Values. N Engl J Med 2004; 351: 523-526.
7. Moellering RC Jr: Discovering new antimicrobial agents. Int J Antimicrob Agents 2011; 37: 2-9.
8. Projan SJ: Why is big Pharma getting out of antibacterial drug discovery? Curr Opin Microbiol 2003; 6: 427-430.
9. Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, 2002: 427 – 438.
10. Alekshun MN, Levy SB: Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. Cell 2007; 128: 1037-1050.
11. Normark BH, Normark S: Evolution and spread of antibiotic resistance. J Intern Med 2002; 252: 91-106.
12. Walsh C: Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature 2000; 406: 775-781.
13. Nikaido H: Multidrug Resistance in Bacteria. Annu Rev Biochem 2009; 78: 119-146.
14. Moellering RC Jr: NDM-1 – A Cause for Worldwide Concern. N Engl J Med 2010; 363: 2377-2379.
15. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA: Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiol Rev 2008; 32: 149-167.
16. Cabeen MT, Jacobs-Wagner C: Bacterial cell shape. Nat Rev Microbiol 2005; 3: 601-610.

17. Scheffers DJ, Pinho MG: Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; 69: 585-607.
18. Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A: Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30: 673-691.
19. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 168-207.
20. Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC: β -lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8: 525-533.
21. Zapun A, Macheboeuf P, Vernet T: Penicillin-Binding Proteins and β -Lactam Resistance. V: Mayers DL (ured.), *Antimicrobial Drug Resistance*, Humana Press, 2009: 145 – 171.
22. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P: The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 234-258.
23. Sauvage E, Kerff F, Fonzé E, Herman R, Schoot B, Marquette JP, Taburet Y, Prevost D, Dumas J, Leonard G, Stefanic P, Coyette J, Charlier P: The 2.4- \AA crystal structure of the penicillin-resistant penicillin-binding protein PBP5fm from *Enterococcus faecium* in complex with benzylpenicillin. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 1223-1232.
24. Lim D, Strynadka NC: Structural basis for the β -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Struct Biol* 2002; 9: 870-876.
25. Turk S, Verlaine O, Gerards T, Živec M, Humljan J, Sosič I, Amoroso A, Zervosen A, Luxen A, Joris B, Gobec S: New Noncovalent Inhibitors of Penicillin-Binding Proteins from Penicillin-Resistant Bacteria. *PLoS One* 2011; 6: e19418.
26. Turk S: Doktorska disertacija: Odkrivanje novih inhibitorjev biosinteze bakterijskega peptidoglikana z računalniškimi metodami, Univerza v Ljubljani, Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2011: 86, 159.
27. Boyer R: Temelji biokemije, Študentska založba, Ljubljana, 2005: 130-145.
28. Contreras-Martel C, Amoroso A, Woon EC, Zervosen A, Inglis S, Martins A, Verlaine O, Rydzik AM, Job V, Luxen A, Joris B, Schofield CJ, Dessen A: Structure-Guided Design of Cell Wall Biosynthesis Inhibitors That Overcome β -Lactam Resistance in *Staphylococcus aureus* (MRSA). *ACS Chem Biol* 2011; [Epub ahead of print].

29. Inglis SR, Zervosen A, Woon EC, Gerards T, Teller N, Fischer DS, Luxen A, Schofield CJ: Synthesis and evaluation of 3-(dihydroxyboryl)benzoic acids as D,D-carboxypeptidase R39 inhibitors. *J Med Chem* 2009; 52: 6097-6106.
30. Humljan J, Kotnik M, Contreras-Martel C, Blanot D, Urleb U, Dessen A, Solmajer T, Gobec S: Novel naphthalene-N-sulfonyl-D-glutamic acid derivatives as inhibitors of MurD, a key peptidoglycan biosynthesis enzyme. *J Med Chem* 2008; 51: 7486-7494.
31. De Luca L, Giacomelli G: An easy microwave-assisted synthesis of sulfonamides directly from sulfonic acids. *J Org Chem* 2008; 73: 3967-3969.
32. Clayden J, Greevers N, Warren S, Wothers P: Organic chemistry, Oxford university press, 2001, 294-297.
33. Ball DH, Parrish FW: Sulfonic esters of carbohydrates: part I. V: Wolfrom ML, Tipson RS (ured.), Advances in carbohydrate chemistry, Academic Press Inc., London, 1968: 236 – 237.
34. Tišler M: Organska kemija, tretja izdaja, DZS, Ljubljana, 2002: 100-110, 136-137.
35. <http://www.mrl.ucsb.edu/mrl/centralfacilities/polymer/mreact.html>
36. Mourad AF, Aly AA, Farag HH, Beshr EA: Microwave assisted synthesis of triazoloquinazolinones and benzimidazoquinazolinones. *Beilstein J Org Chem* 2007: 3 – 11.