

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SNEŽANA PODRIČNIK

**CIANOTIOFENSKI ZAVIRALCI LIGAZE MURF KOT
POTENCIALNE PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE**

DIPLOMSKA NALOGA

UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2014

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SNEŽANA PODRIČNIK

**CIANOTIOFENSKI ZAVIRALCI LIGAZE MURF KOT
POTENCIALNE PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE**

**CYANOTHIOPHENE INHIBITORS OF MURF LIGASE AS
POTENTIAL ANTIMICROBIAL AGENTS**

Ljubljana, 2014

Diplomsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm. in somentorstvom asist. dr. Martine Hrast, mag. farm.

Spektroskopske meritve in elementne analize so opravili na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo ter na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani. Testiranja na bakterijskih sevih so bila opravljena na Univerzi v Leedsu.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm., in somentorice asist. dr. Martine Hrast, mag. farm.

Snežana Podričnik

Ljubljana, 2014

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem izr. prof. dr. Marku Anderluhu, mag. farm., in asist. dr. Martini Hrast, mag. farm., za strokovno pomoč in nasvete pri diplomskem delu.

Zahvaljujem se vsem kolegom na Katedri za farmacevtsko kemijo, ki so mi kakorkoli pomagali med izdelavo diplomske naloge in skrbeli za odlično vzdušje v laboratoriju.

Na koncu bi se rada zahvalila še svoji mami, ostali družini in prijateljem za vso podporo in pomoč v času študija.

Vsebina

1. Uvod	1
1.1. Kemoterapevtiki	1
1.2. Odpornost na kemoterapevtike	2
1.3. Bakterijske celične stene	4
1.3.1. Grampozitivne bakterije	4
1.3.2. Gramnegativne bakterije	5
1.4. Peptidoglikan	6
1.4.1. Zgradba peptidoglikana	6
1.4.2. Biosinteza peptidoglikana	6
1.5. Mur ligaze	9
1.6. MurF	10
1.6.1. Struktura encima	11
1.6.2. Zaviralci MurF	11
2. Namen dela	14
3. Materiali in metode	16
3.1. Materiali	16
3.2. Metode	16
4. Eksperimentalno delo	19
4.1. Sinteza osnovnih skeletov (spojini 4 in 6)	19
4.1.1. Sinteza <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-3-hidroksibenzamida (spojina 4)	19
4.1.2. Sinteza <i>N</i> -(6-benzil-3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3- <i>c</i>]piridin-2-il)-3-hidroksibenzamida (spojina 6)	23
4.2. Splošni predpis za sintezo spojin 7, 8 in 9	26
4.2.1. Sinteza <i>N</i> -benzil-3-(benziloksi)- <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)benzamida (spojina 7)	27
4.2.2. Sinteza 3-(4-klorobenziloksi)- <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)benzamida (spojina 8)	28

4.2.3. Poskus sinteze <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-3-(4-nitrobenziloksi)benzamida (spojina 9)	29
4.3. Splošni predpis za sintezo spojin 10, 11 in 12.....	29
4.3.1. Sinteza <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-3-(ciklopentilmetoksi)benzamida (spojina 10)	30
4.3.2. Poskus sinteze <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-3-((tetrahidrofuran-3-il)metoksi)benzamida (spojina 11).....	31
4.3.3. Poskus sinteze <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-3-(furan-2-ilmetoksi)benzamida (spojina 12).....	31
4.4. Sinteza alkilnih etrskih derivatov	32
4.4.1. Sinteza 2-(3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)ocetne kisline	32
4.4.2. Sinteza (2-(3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)etilamino)(iminio)metanaminijevega 2,2,2-trifluoroacetata	33
4.4.3. Sinteza <i>N</i> -(6-benzil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3- <i>c</i>]piridin-2-il)-3-(2-guanidinoetoksi)benzamid 2,2,2-trifluoroacetata.....	38
5. Rezultati in razprava	39
5.1. Komentar sinteznih postopkov	39
5.1.1. Gewaldova sinteza substituiranih tiofenov.....	39
5.1.2. Komentar sinteze etrskih derivatov z Williamsonovo sintezo etrov	40
5.1.3. Komentar sinteze etrskih derivatov z Mitsunobujevo sintezo	40
5.1.4. Komentar sinteze etilaminskih in etilguanidinskih derivatov	41
5.2. Rezultati testiranja	42
5.2.1. Komentar testiranja na izoliranem encimu MurF	43
5.2.2. Komentar testiranja protibakterijskega delovanja	44
6. Zaključek	45
7. Literatura	46

Kazalo slik

Slika 1: Celična stena grampozitivne bakterije.	4
Slika 2: Celična stena gramnegativne bakterije.	5
Slika 3: Struktura monomerne enote peptidoglikana večine gramnegativnih bakterij.	6
Slika 4: Shema biosinteze peptidoglikana. Z rdečo je označen tarčni encim.	8
Slika 5: Reakcijski mehanizem Mur ligaz.	9
Slika 6: 3D strukture MurF iz bakterije E. coli brez substrata v odprti konformaciji (levo, PDB oznaka 1GG4) in MurF iz bakterije S. pneumoniae v kompleksu s cianotiofenskim zaviralcem v zaprti konfiguraciji (desno, PDB oznaka 3ZM6).	11
Slika 7: Znani zaviralci encima MurF.	13
Slika 8: Shema spremembe etilnih fragmentov. Z rdečo je obarvan fragment osnovnega skeleta, ki smo ga ohranili glede na strukturo inhibitorja 6. ...	14
Slika 9: Shema podaljšanja osnovnega skeleta. Z rdečo smo obarvali fragment, s katerim smo podaljšali osnovni fragment.	15
Slika 10: Struktura barvila malahitno zeleno (MG).	17
Slika 11: Mehanizem Gewaldove sinteze substituiranih tiofenov.	40
Slika 12: Shema sinteze gvanidina.	41

Kazalo tabel

Tabela 1: Izbrani šestčlenski heterociklični substituenti.	26
Tabela 2: Izbrani petčlenski heterociklični substituenti.	29
Tabela 3: Rezultati biokemijskega testiranja sintetiziranih spojin.	42
Tabela 4: Rezultati testiranja protibakterijske aktivnosti.	43

Povzetek

Odkritje in razvoj protibakterijskih učinkovin v 20. stoletju je spremenilo podobo moderne medicine. Vendar predstavlja njihova pogosto prekomerna in napačna uporaba selekcijski pritisk v evoluciji mikroorganizmov. Posledično se geni, ki kodirajo rezistenco na kemoterapevtike, hitro razvijajo in širijo med patogenimi in nepatogenimi bakterijami. Zaradi tega zadnjih nekaj let poteka intenzivno iskanje novih protibakterijskih učinkovin. Ena od metod iskanja, ki ima velik potencial, je iskanje zaviralcev za encime v ključnih in specifičnih bakterijskih metabolnih procesih. Mednje spada sinteza peptidoglikana, ki se prične v citoplazmi celice s sintezo osnovnega monomera in konča s polimerizacijo v makromolekulo v periplazemskem prostoru. Zaviralci encimov iz družine Mur ligaz, ki katalizirajo sintezo osnovnega monomera, so zaradi velike strukturne in funkcionalne podobnosti med bakterijami potencialne širokospektralne in baktericidne protibakterijske učinkovine.

V tem diplomskem delu smo sintetizirali nove predstavnike zaviralcev s cianotiofenskim skeletom zadnje vrste Mur ligaz. MurF je od ATP odvisna Mur ligaza, ki na monomer pripne dipeptid D-Ala-D-Ala in s tem konča njegovo sintezo. Namen našega dela je bil dodatno razjasniti povezavo med strukturo spojin in njihovim zaviralnim delovanjem. Naše spojine smo načrtovali na osnovi znanih MurF zaviralcev s cianotiofenskim skeletom. Pripravili smo skupino etrskih derivatov z arilnimi in alkilnimi fragmenti. Vpliv podaljšanja osnovnega skeleta na zaviralno delovanje smo preverili z uvedbo benzilnega fragmenta.

Sintetiziranim spojinam smo določili zaviralno delovanje na MurF iz *S. pneumoniae* in *E. coli*. Ugotovili smo, da imajo šibko zaviralno delovanje spojine **5**, **6**, **10** in **17**. Najmočnejšima spojinama **6** in **17** smo določili IC₅₀ vrednosti med 167 µM in 341 µM. Preverili smo tudi njuno protibakterijsko delovanje na sev *S. aureus* in več sevov *E. coli*. Ugotovili smo, da spojina **6** nima protibakterijskega delovanja, minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) spojine **17** pa je med 16 in 64 µg/ml.

Skupina etrskih derivatov predstavlja dobro izhodišče za nadaljnjo načrtovanje in optimizacijo potencialnih zaviralcev MurF ligaze s cianotiofenskim skeletom s potencialno širokospektralnim in protibakterijskim delovanjem.

Ključne besede: cianotiofenski zaviralci, MurF

Abstract

The discovery and development of antibacterial drugs in the 20th century has changed the face of modern medicine. However their overuse and misuse creates selection pressure in the evolution of microorganisms. As a result, genes encoding resistance to chemotherapeutic agents are rapidly developing and spreading between pathogenic and non-pathogenic bacteria. Thus, in the last few years an intensive search for new antibacterial agents was conducted. The research method with immense potential is the search for inhibitors of enzymes involved in the essential and specific bacterial metabolic processes. The synthesis of peptidoglycan is an essential metabolic process that starts with the synthesis of the basic monomer in cytoplasm of a cell and ends in periplasm with polymerization into a macromolecule. Inhibitors of Mur ligase family enzymes, which catalyze the synthesis of the basic monomer, represent potential broad-spectrum and bactericidal antibacterial drugs due to their structural and functional similarities in bacteria.

In this thesis, we have synthesized new inhibitors of MurF ligase with a cyanothiophene scaffold. MurF is an ATP dependent Mur ligase that attaches a D-Ala-D-Ala dipeptide to the basic monomer and ends its synthesis. Our goal was to clarify the relationship between the structure of the cyanothiophene compounds and their inhibitory activity. The design of our compounds was based on known MurF inhibitors with a cyanothiophene scaffold. A group of ether derivatives was prepared with aryl and alkyl fragments. The introduction of a benzyl fragment to the basic scaffold on inhibitory activity was also explored.

Inhibitory activities of the synthesized compounds were determined against MurF from *S. pneumoniae* and *E. coli*. Compounds **5**, **6**, **10** and **17** showed modest inhibitory activities. The IC₅₀ values of the most potent compounds **6** and **17** were between 167 μ M and 341 μ M. Their antibacterial activities were also determined on *S. aureus* and multiple strains of *E. coli*. Compound **6** possessed no antibacterial activity; however, the minimal inhibitory concentration (MIC) of compound **17** is between 16 and 64 μ g/ml for various bacterial strains.

The group of ether compounds represents a good basis for further design and optimization of potential MurF ligase inhibitors with a cyanothiophene scaffold as potential broad-spectrum and bactericidal antibacterial agents.

Keywords: cyanothiophene inhibitors, MurF

Seznam okrajšav

aceton-d ₆	devteriran aceton
ADP	adenozindifosfat
Ala	alanin
ATP	adenozintrifosfat
bs	širok singlet
C ₅₅ -P	undekaprenol fosfat (baktoprenol fosfat)
CDCl ₃	devteriran kloroform
Cs ₂ CO ₃	cezijev karbonat
dd	dublet dubleta
ddd	dublet dubleta dubleta
D-Ala-D-Ala	dipeptid D-alanil-D-alanin
D-Ala-D-Lac	dipeptid D-alanil-D-laktat
D-Ala-D-Ser	dipeptid D-alanil-D-serin
Ddl	D-Ala:D-Ala ligaze
DIAD	diizopropil azodikarboksilat
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DMSO-d ₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EtOAc	etilacetat
FeCl ₃	železov triklorid
GlcN-1-P	D-glukozamin-1-fosfat
GlcN-6-P	D-glukozamin-6-fosfat
GlmM	fosfoglukozamin mutaza
GlmS	glukozamin-6-fosfat aktiviran ribocim

GlmU	encim glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza in <i>N</i> -acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferaza
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
HCl	klorovodikova kislina
Hex	heksan
HgCl ₂	živosrebrov(II) klorid
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (high pressure liquid chromatography)
Hz	hertz
IC ₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
K _i	konstanta encimske aktivnosti
KBr	kalijev bromid
K ₂ CO ₃	kalijev karbonat
Lac	laktat
lit.	literaturni podatek
Lys	lizin
m	mulitplet
M	molarost (mol/L)
<i>m</i> -DAP	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
MDR	multipla rezistenca na kemoterapevtike (multi drug resistance)
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
Mpl	muropeptidna ligaza
MraY	fosfo-MurNAc-pentapeptid translokaza
MS	masna spektrometrija
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruviltransferaza
MurB	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat L-alanin ligaza

MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin D-glutamat ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat mezo-diaminopimelat/L-lizin ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanil-L-glutamil-mezo-diaminopimelat/L-lizin D-alanil-D-alanin ligaza
MurF _{Ec}	MurF ligaza izolirana iz <i>E. coli</i>
MurF _{Sp}	MurF ligaza izolirana iz <i>S. pneumoniae</i>
MurG	<i>N</i> -acetilglukozamin transferaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
NaCl	natrijev klorid
NaHCO ₃	natrijev hidrogenkarbonat
NaOH	natrijev hidroksid
Na ₂ SO ₄	natrijev sulfat
NMR	jedrska magnetna resonanca
PBP	penicilin vezoči proteini
PDB	Protein data bank
PE	petroleter
PEP	fosfoenolpiruvat
P _i	anorganski fosfat
PMBN	polimiksin B nonapeptid
POPh ₃	trifenilfosfin oksid
PPh ₃	trifenilfosfin
ppm	parts per million
q	kvartet
QSAR	kvantitativen odnos med strukturo in delovanjem
RA	rezidualna aktivnost
R _f	retencijski faktor
<i>r</i> gen	geni, ki kodirajo rezistenco
R plazmid	plazmidi, ki nosijo gene, ki kodirajo rezistenco

s	singlet
SAR	odnos med strukturo in delovanjem
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ser	serin
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
t	triplet
THF	tetrahidrofuran
TLC	tenkoplastna kromatografija (thin layer chromatography)
<i>T. maritima</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
TMS	tetrametilsilan
UDP	uridildifosfat
UTP	uridiltrifosfat
UV	ultravijolična svetloba
v/v	volumsko/volumski
VIS	vidna svetloba
δ	kemijski premik
λ	valovna dolžina

1. Uvod

Ljudje smo vedno bili podvrženi bakterijskim infekcijam. Naše iskanje ustrezne terapije za njihovo zdravljenje je posledično starejše od nam znane zgodovine. V starih medicinskih tekstih najdemo zapise o uporabi preparatov rastlinskega in živalskega izvora, priporočila o uživanju plesnivega kruha in sira ter počasen razvoj ukrepov za varovanje javnega zdravja, predvsem pomembnost ureditve ustreznih sanitarnih razmer in osebne higiene (1). Kljub temu so bile bakterijske infekcije pred slabim stoletjem eden najpogostejših razlogov za smrt. Njene žrtve so bili najpogostejše otroci in starejši (2).

Vse to se je spremenilo v začetku dvajsetega stoletja z odkritjem sinteznih sulfonamidov Paula Ehrlicha in penicilina Alexandra Fleminga, ki je metabolit plesni iz rodu *Penicillium*. Izbruh druge svetovne vojne je pospešil raziskave in njihovo množično proizvodnjo, ki je po koncu vojne postala dostopna tudi civilnemu prebivalstvu. Pričela se je moderna doba kemoterapije (1-5).

1.1. Kemoterapevtiki

Izraz kemoterapevtiki zajema vse zdravilne učinkovine, ki učinkujejo po principu »selektivne toksičnosti«. Torej so toksične mikroorganizmu, njihov vpliv na gostitelja pa je minimalen. Takšna definicija vključuje tudi zdravilne učinkovine za zdravljenje tumorjev, kar je danes zanj najpogostejša asociacija (3).

Izraz si je izmislil Paul Ehrlich za opis sinteznih učinkovin za protibakterijsko terapijo. Kasneje so definicijo razširili, da zajema antibiotike, ki so naravnega ali polysinteznega izvora. Zadnja razširitev je vključila protitumorne učinkovine, zaradi enakega principa delovanja (3).

Uspeh penicilinov je spodbudil raziskave delovanja metabolitov različnih mikroorganizmov, kar je povzročilo razmah učinkovin s protimikrobnim delovanjem. Napredki v mikrobiologiji in farmakologiji pa so pojasnili njihove mehanizme delovanja (2-4).

Protibakterijske učinkovine lahko na rast mikroorganizmov vplivajo tako, da povzročijo njihovo smrt z zaviranjem ali spremembo:

- sinteze celične stene (β – laktamski antibiotiki),
- sinteze ali metabolizma nukleinskih kislin (sulfonamidi, trimetoprim, kinoloni),
- sinteze proteinov (tetraciklini, aminoglikozidi, kloramfenikol, makrolidi),

→ prepustnosti celične membrane (nistatin, amfotericin) (2-4).

1.2. Odpornost na kemoterapevtike

Sposobnost prilagajanja spremembam v okolju je ena najpomembnejših lastnosti živih organizmov. Sem ne spadajo samo spremembe vremena, dostopa do hrane, vode in občasno tudi kisika, temveč tudi prisotnost škodljivih in včasih smrtno nevarnih snovi v okolju. Mikroorganizmi so prva in najbolj razširjena oblika življenja na našem planetu. Najdemo jih v prsti, vodi, globoko pod zemljo in v globinah oceanov. Njihovo življenjsko okolje nam je pogosto popolnoma tuje. Posledično nas ne bi smela presenetiti njihova neverjetna sposobnost prilagajanja spremembam v okolju in ogromen rezervoar genetske raznolikosti, a nas je. Hitro odkrivanje novih razredov kemoterapevtikov med 1940 in 1962 letom in izkoreninjenje določenih bolezni s cepljenjem, kot so črne koze, so pripeljale do arogantnih napovedi o skorajšnjem izkoreninjenju infekcijskih bolezni. Ne samo da se te napovedi niso uresničile, zmeraj več organizmov ni več občutljivih na delovanje poznanih kemoterapevtikov. Pojav imenujemo rezistenca (2-6).

Rezistenca na kemoterapevtike je pridobljena sposobnost mikroorganizma, da je odporen na delovanje protimikrobnih učinkovin. Genetski zapis za rezistenco lahko najdemo na kromosomski DNA in na R (rezistentnih) plazmidih. Plazmidi so izven kromosomske krožne molekule DNA z zmožnostjo neodvisnega podvajanja. Mehanizem rezistence, ki je zapisan na kromosomski DNA, je najpogostejše posledica točkastih mutacij, vstavitve ali izpusta dela genetskega zapisa. Pogostejši so mehanizmi rezistence, ki jih kodirajo tako imenovani *r* geni, ki jih nosijo R plazmidi. Ti običajno kodirajo encime, ki zavirajo delovanje učinkovin, preprečijo vstop učinkovine v celico, oziroma membranske črpalke, ki učinkovino aktivno črpajo iz celice. R plazmidi pogosto prenašajo genetski zapis za več različnih mehanizmov rezistence in so odgovorni za tako imenovane MDR seve, ki so odporni na več učinkovin (2-5).

Mehanizmi rezistence na protibakterijske učinkovine:

- Sinteza encima, ki inaktivira učinkovine (β – laktamski antibiotiki, kloramfenikol in aminoglikozidi),
- sprememba vezavnega mesta za učinkovino (aminoglikozidi, eritromicin, rifampicin),

- zmanjšanje privzema učinkovine v bakterijo s spremembo prepustnosti celične membrane (tetraciklini, ampicilin in druge hidrofilne protimikrobne učinkovine, ki uporabljajo porinske kanale), in
- sprememba metabolnih poti (sulfonamidi, trimetoprim) (2-5).

Najpogosteje se *r* geni med bakterijami širijo s konjugacijo, kjer se plazmidi iz ene bakterije v drugo prenesejo skozi pilus. Na ta način se prenašajo predvsem konjugacijski plazmidi, ki nosijo gene za tvorbo pilusov in pogosto tudi *r* gene. Včasih se na teh plazmidih prenesejo tudi *r* geni zapisani na transpozonih. Transpozoni so kratki odseki DNA z zmožnostjo vstavitve v plazmidno in genomsko DNA. Zmožnost transpozonov, da se iz enega plazmida prestavijo v drug plazmid ali genomsko DNA, omogoča prenos *r* genov med bakterijami, ki niso sorodne. Redkejša in za širjenje rezistence manj pomembna načina sta transdukcija in transformacija. Transdukcija pomeni vključitev *r* genov v DNA bakterijskega virusa in prenos teh genov v naslednjo bakterijo, ki jo okuži ta virus. Transformacija pa predstavlja vključitev iz okolja privzete DNA v genom bakterije (3,5).

Načini širjenja rezistence med bakterijami:

- Prenos bakterij med ljudmi,
- prenos rezistenčnih genov med bakterijami, običajno s plazmidi in
- prenos genov za rezistenco med genetskimi elementi znotraj bakterij, na transpozonih (3).

Hiter razvoj rezistence na kemoterapevtike in njeno širjenje med bakterijskimi populacijami predstavlja velik problem v moderni medicini, saj je uspeh velikega števila postopkov zdravljenja, kot so operativni posegi in kemoterapija, odvisen od dobre protibakterijske zaščite pacienta. Raziskave genetskega materiala nepatogenih organizmov v prsti, vodi, zemeljskih in oceanskih globinah so pokazale, da je izvor rezistenčnih elementov v patogenih organizmih velika zbirka nepatogenih mikroorganizmov. Odkritje nabora *r* genov v bakterijah, ki so bile 30,000 let zamrznjene v permafrostu, potrjuje, da je pojav rezistence v okolju naraven. Redek pojav rezistence v naboru mikroorganizmov iz obdobja pred dobo kemoterapevtikov in v populacijah, ki ne uporabljajo kemoterapevtikov, dokazuje, da je naša, pogosto prekomerna in napačna uporaba kemoterapevtikov, zagotovila evolucijski selekcijski pritisk za zajem v naravi že obstoječih rezistenčnih elementov in hitro širjenje novih. Posledično postajajo sevi bakterij, ki so odporni na širok spekter kemoterapevtikov, nekaj vsakdanjega (2, 7).

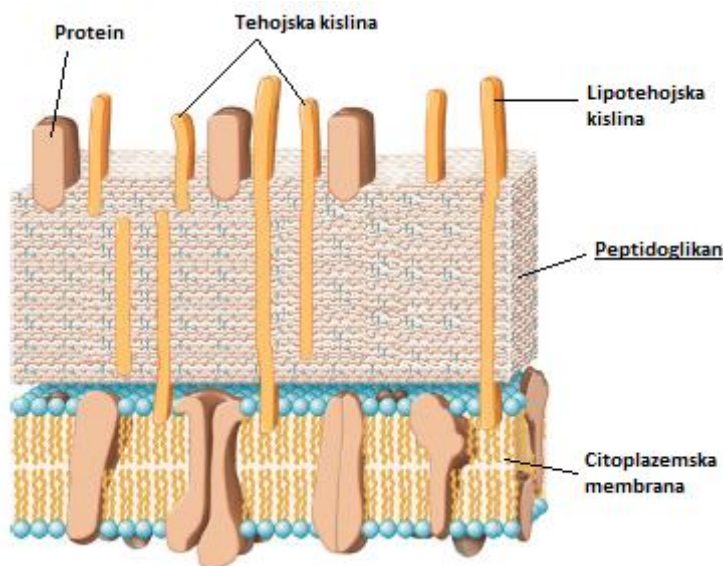
1.3. Bakterijske celične stene

Celična stena bakterij je kompleksna, na pol toga struktura odgovorna za karakteristično obliko bakterij. Celična stena obdaja krhkejšo citoplazemsko membrano in varuje notranjost pred neugodnimi spremembami v okolju. Njena glavna naloga je vzdrževanje osmotskega pritiska znotraj celice, kadar je ta višji od zunanjega in bi celica zaradi vdora vode za izenačenje pritiska počila. Togost celične stene je posledica prisotnosti plasti peptidoglikana. Peptidoglikan je polimer sestavljen iz dveh izmenjujočih se sladkorjev in kratkega peptidnega fragmenta. Celična stena je odličen vir tarč za razvoj novih kemoterapevtikov, saj evkariontske celice nimajo ekvivalentne strukture (4, 8, 9).

Leta 1884 je Christian Gram razvil diferencialno metodo barvanja bakterij, ki jih je razdelila v dve veliki skupini – grampozitivne in gramnegativne. Razlika, na kateri temelji reakcija barvanja po Gramu, je v sestavi celične stene (8, 9).

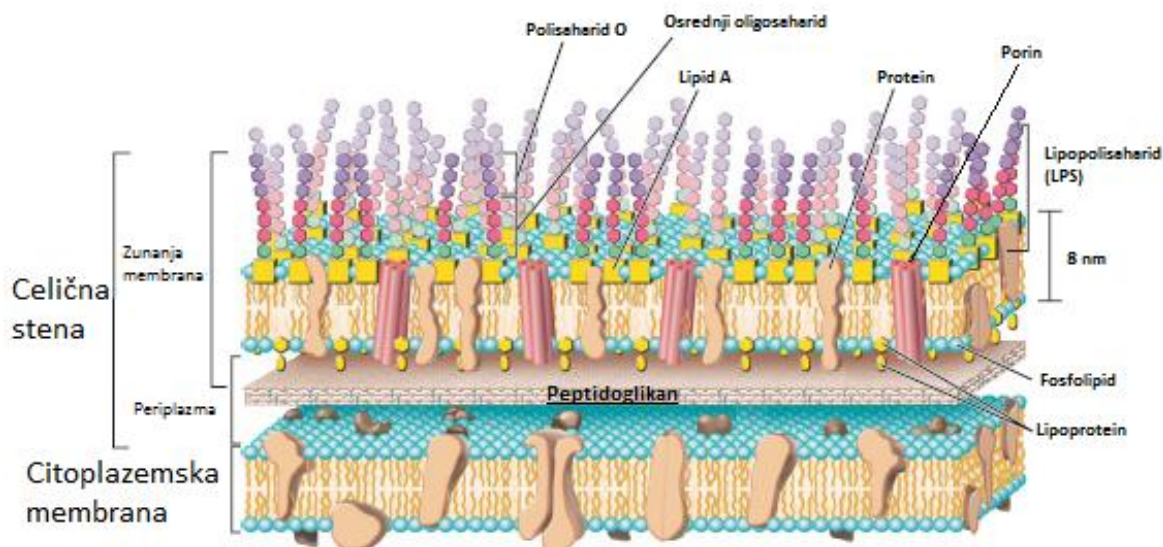
1.3.1. Grampozitivne bakterije

Celična stena grampozitivnih bakterij je sestavljena iz do 40 plasti debele makromolekule peptidoglikana, tehojske kisline in proteinov ter polisaharidov, katerih vrsta in prisotnost je odvisna od vrste bakterije. Tehojska kislina je polimer sestavljen iz glicerol ali ribitol fosfatnih ostankov, vezanih s fosfodiesterскими vezmi. Večina molekul tehojske kisline je kovalentno vezana na peptidoglikan. Manjši delež pa je vezan na glikolipide na citoplazemski membrani in se imenuje lipotehojska kislina. Negativno nabite tehojske kisline ustvarijo mrežo struktur z negativnim nabojem v celični steni in so delno odgovorne za negativni naboj celične površine. O fiziološki vlogi tehojskih kislin vemo zelo malo. Najverjetneje so odgovorne za vezavo in regulacijo gibanja kationov v in iz celice, ter igrajo vlogo pri celični rasti, preprečevanju razpada celične stene in lizi celic (2, 4, 9).



Slika 1: Celična stena grampozitivne bakterije (prirejeno po (2)).

1.3.2. Gramnegativne bakterije



Slika 2: Celična stena gramnegativne bakterije (prirejeno po (2)).

Celična stena gramnegativnih bakterij je zelo kompleksna. Sestavlja jo ena do dve plasti debela makromolekula peptidoglikana in zunanja membrana, ki je sestavljena iz lipoproteinov, lipopolisaharidov in fosfolipidov. Notranji sloj lipidnega dvosloja zunanje membrane sestavljajo fosfolipidi, zunanji sloj pa lipopolisaharidi. Prisotnost endotoksina - lipida A (lipidni del lipopolisaharidov) v krvi ali gastrointestinalnem traktu lahko povzroči vročino, šok, drisko in bruhanje. Simptome izzove tudi prisotnost nepatogenega organizma, ki ima v svoji celični steni endotoksin. Močan negativni naboj zunanosti celice je pomemben dejavnik pri izmikanju fagocitozi in delovanju komplimenta, dveh pomembnejših obrambnih mehanizmov gostitelja. Zunanja membrana je v primerjavi s citoplazemsko membrano dobro prepustna za male molekule, kar je posledica prisotnosti proteinov imenovanih porini, ki delujejo kot kanalčki za vstop in izstop molekul z nizko molekulsko maso. Poznamo veliko različnih porinov, najbolj osnovna delitev je na specifične in nespecifične. Specifični porini imajo v svoji strukturi vezavno mesto, ki prepozna le določeno spojino ali skupino sorodnih si spojin. Nespecifični porini pa so hidrofilni kanalčki skozi katerega lahko prehaja katera koli spojina z nizko molekulsko maso. Obenem pa predstavlja oviro za nekatere antibiotike (peniciline), prebavne encime (lizocim), soli žolčnih kislin, težke kovine, detergente in tako naprej. Zunanja membrana je trdno vezana na peptidoglikan z lipoproteini. Prostor med membranama imenujemo periplazemski prostor. V njem najdemo poleg peptidoglikana različne proteine (na primer

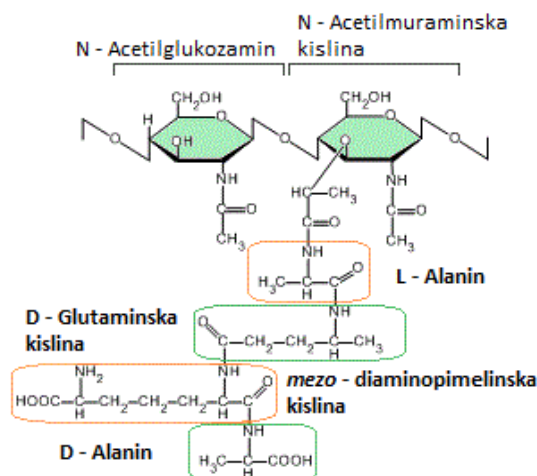
prebavne encime). Za proteine neprepustna zunanja membrana, preprečuje izgubo periplazemskih proteinov in vdor proteinov iz okolja v celico (2, 4, 9).

1.4. Peptidoglikan

Peptidoglikan, oziroma murein, je esencialna in specifična komponenta bakterijske celične stene. Ker evkariontske celice nimajo ekvivalentne strukture, predstavlja njegova biosinteza nabor obetavnih tarč za razvoj novih protimikrobnih učinkovin (2, 10).

1.4.1. Zgradba peptidoglikana

Peptidoglikan je polimer sestavljen iz dolgih polisaharidnih verig, ki so prečno povezane s kratkimi peptidi. Monomerna enota peptidoglikana je sestavljena iz sladkorjev *N*-acetilglukoamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc), ki sta med seboj povezani z 1,4- β glikozidno vezjo. *N*-acetilmuraminska kislina je GlcNAc, ki ima na mestu 3 z etrsko vezjo pripeto mlečno kislino. Na prosto karboksilno skupino laktatnega ostanka v MurNAc je s peptidno vezjo pripet tetrapeptid, ki ga sestavljajo L-alanin (L-Ala), D-glutaminska kislina (D-Glu), *mezo*-diaminopimelinska kislina (*m*-DAP) in D-alanin (D-Ala). Prečno povezavo tvorita *m*-DAP ene verige in končni D-Ala druge verige. V monomerni enoti peptidoglikana grampozitivnih bakterij pogosto najdemo L-lizin (L-Lys) na tretjem mestu tetrapeptida namesto *m*-DAP. Prečno povezavo pa tvorita L-Lys ene verige in končni D-Ala druge verige preko peptidnega mostu. Število enot in aminokislinska sestava peptidnega mostu se razlikuje od organizma do organizma (2, 9-13).



Slika 3: Struktura monomerne enote peptidoglikana večine gramnegativnih bakterij (prirejeno po (2, 10)).

1.4.2. Biosinteza peptidoglikana

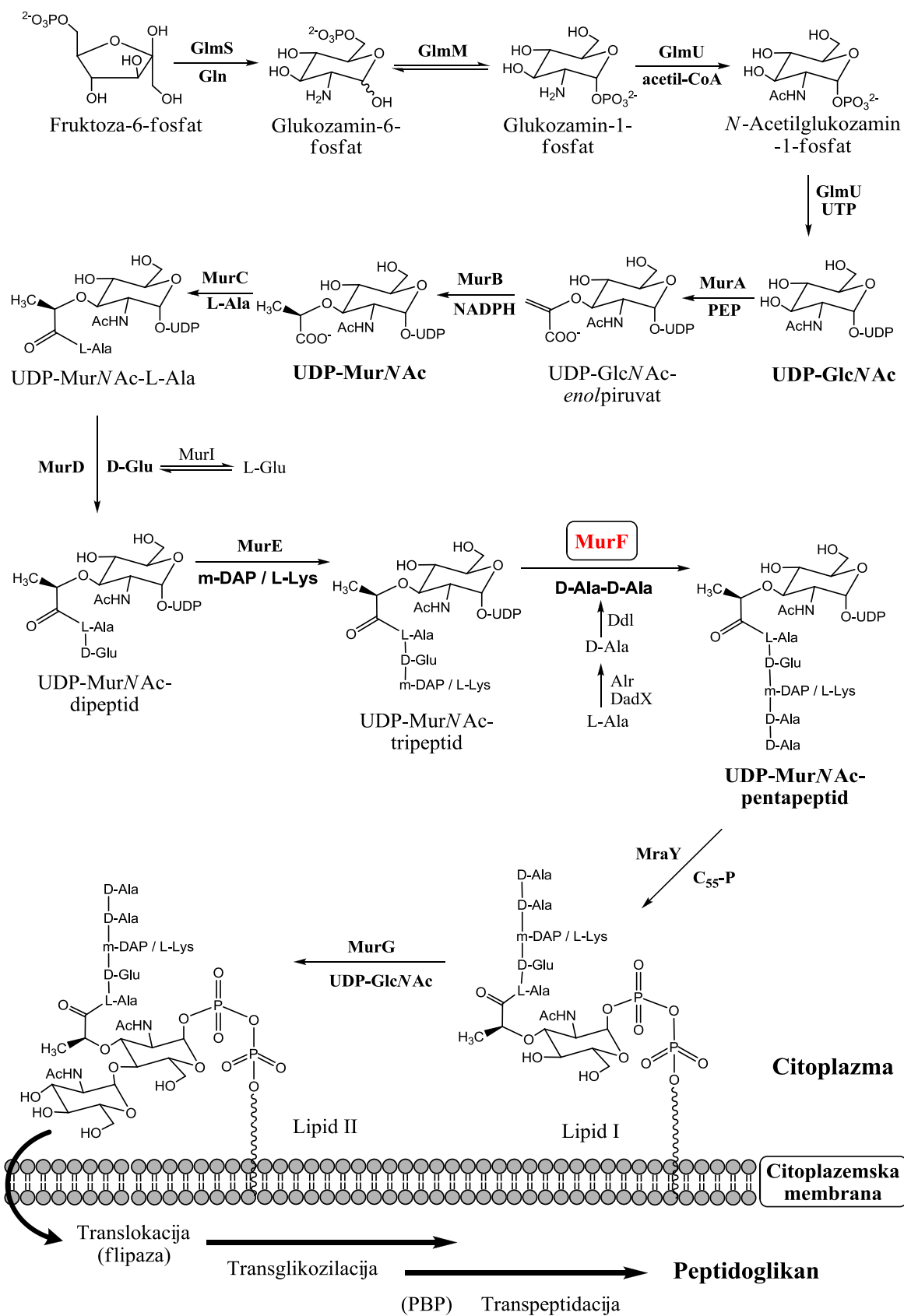
Biosinteza peptidoglikana je kompleksen proces, ki zajema okoli 20 reakcij, ki potekajo v citoplazmi (sinteza monomerne enote peptidoglikana), na notranji stani (sinteza z lipidom vezanih intermediatov) in na zunanji strani citoplazemske membrane (reakcije polimerizacije) (12-16).

Citoplazemske stopnje sinteze lahko razdelimo v štiri skupine. Na reakcije biosinteze uridildifosfat-*N*-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) iz D-fruktoze-6-fosfata; uridildifosfat-*N*-acetilmuraminske kisline (UDP-MurNAc) iz UDP-GlcNAc, pentapeptidnega fragmenta na UDP-MurNAc in stranske reakcije za sintezo D-Glu in D-Ala-D-Ala dipeptida (12).

Pretvorbo D-fruktoze-6-fosfata v D-glukozamin-6-fosfat (GlcN-6-P) katalizira amidotransferaza GlmS, ki kot vir dušika uporablja L-glutamin. Izomerizacijo GlcN-6-P do D-glukozamin-1-fosfata (GlcN-1-P) katalizira encim GlmM. Naslednji dve reakciji, prenos acetilne skupine iz acetil koencima A in UDP iz UTP na GlcNAc-1-P, katalizira bifunkcionalni encim GlmU, v prisotnosti Mg^{2+} ionov, pri čemer nastaneta anorganski fosfat in UDP-GlcNAc (12). Nato se iz UDP-GlcNAc sintetizira UDP-MurNAc. Ta korak katalizirata encima MurA in MurB. Najprej MurA katalizira prenos enolpiruvata iz fosfoenolpiruvata (PEP) na 3'-hidroksilno skupino UDP-GlcNAc, pri čemer se sprosti anorganski fosfat (P_i). MurB nato reducira enolno skupino nastalega UDP-GlcNAc-*enol*piruvata do laktoilnega etra. Zadnja citoplazemska stopnja sinteze peptidoglikana je sestava pentapeptida. Na laktoilno skupino UDP-MurNAc se postopoma vežejo L-Ala, D-Glu, *m*-DAP in dipeptid D-Ala-D-Ala. Nastanek peptidnih vezi katalizirajo od ATP-odvisne Mur ligaze (MurC, MurD, MurE in MurF) (12-14).

V naslednji stopnji se v citoplazmi sintetiziran UDP-MurNAc-pentapeptid veže na lipidni nosilec undekaprenol fosfat (baktoprenol fosfat, C₅₅-P), ki je vezan na notranjo stran citoplazemske membrane. Nastanek undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-pentapeptida (lipid I) katalizira transferaza MraY. Nato glikoziltransferaza MurG katalizira tvorbo 1,4-β vezi med GlcNAc iz UDP-GlcNAc in C4 hidroksi skupino lipida I. Nastane undekaprenil-pirofosforil-MurNAc-pentapeptid-GlcNAc (lipid II), ki se po do sedaj še neznanem mehanizmu, v prisotnosti flipaze (membranskih proteinov z notranje strani citoplazemske membrane iz družine SEDS (shape, elongation, division in sporulation, na primer FtsW), prenese na zunanjo stran membrane (15-17).

Sinteza peptidoglikana se konča z reakcijami polimerizacije na periplazemski strani citoplazemske membrane. Preko membrane translociran lipid II služi kot substrat penicilin vezočim proteinom (PBP), ki katalizirajo transglikozilacijo sladkornih verig in transpeptidacijo peptidnih fragmentov (18).



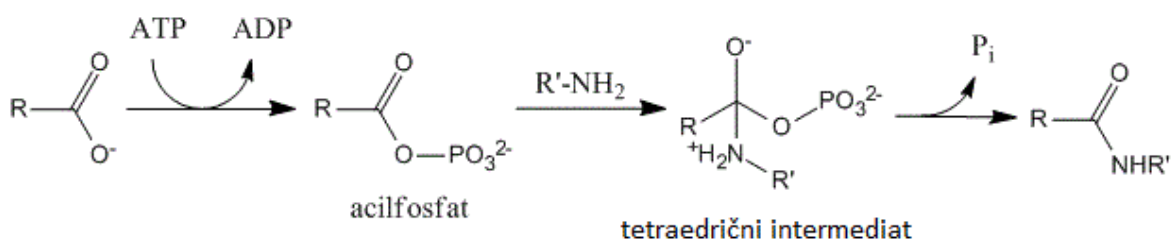
Slika 4: Shema biosinteze peptidoglikana. Z rdečo je označen tarčni encim (prirejeno po (12-14, 16)).

1.5. Mur ligaze

Postopno sintezo peptidnega mostu peptidoglikana katalizirajo štirje od ATP - odvisni encimi imenovani Mur ligaze ali sintetaze (MurC, MurD, MurE in MurF), ki katalizirajo tvorbo amidne oziroma peptidne vezi. Odgovorne so za dodajanje L-Ala (MurC), D-Glu (MurD), diaminokislina *m*-DAP ali L-Lys (MurE) in dipeptida D-Ala-D-Ala (MurF) na D-laktoilno skupino UDP- MurNAc (12-14).

Mur ligaze imajo skupne tri karakteristike:

→ Enak reakcijski mehanizem, najprej z ATP aktivirajo karboksilno skupino UDP-prekursorja, nastane acilfosfatni intermediat in ADP. Sledi nukleofilni napad amino skupine naslednjega elementa v peptidnem mostu, pri čemer nastane nestabilen visoko energetski tetraedričen intermediat, ki razpade na peptid in anorganski fosfat. Za potek reakcije je nujno potrebna prisotnost dvovalentnega kationa (Mg^{2+} ali Mn^{2+}) (12-14).



Slika 5: Reakcijski mehanizem Mur ligaz (prirejeno po (12-14)).

→ Zelo podobno tridimenzionalno strukturo, ki jo sestavljajo tri domene. N-terminalna domena sodeluje pri vezavi UDP-prekursorja, centralna domena pri vezavi ATP in C-terminalna domena pri vezavi aminokislina ali dipeptida. Topološko in glede na tri-dimenzionalno strukturo so si centralne in C-terminalne domene vseh štirih encimov zelo podobne. Najmanj razlik je med centralnimi domenami, kamor se veže vsem encimom skupen substrat ATP. Največje razlike pa najdemo med N-terminalnimi domenami, predvsem MurC in MurD na eni strani ter MurE in MurF na drugi. Razlog za razlike v topološki strukturi teh domen je različna dolžina peptidne verige UDP-substrata. Encimi obstajajo v različnih konformacijah. Zaprtje konformacije povezujemo z vezavo ligandov (12-14).

→ Ohranjenih šest aminokislinskih ostankov in značilno ATP vezavno sekvenco, kar je definiralo novo družino encimov. Poleg Mur ligaz so del te družine še trije

encimi (folilpoli- γ -L-glutamat sintetaza FolC, sintetaza C-terminalnega dela cianoficina CphA in poli- γ -glutamat sintetaza CapB), ki ne sodelujejo v biosintezi peptidoglikana (12).

Mur ligaze so pomembne tarče za razvoj novih protimikrobnih učinkovin. Ker so ključni encimi citoplazemske stopnje biosinteze peptidoglikana, ki nima ekvivalentne strukture v evkariontskih celicah ljudi in živali, ter imajo v vseh bakterijah podobno strukturo, bi bili njihovi inhibitorji selektivno toksični, baktericidni in širokospektralni (2, 10, 12-14, 19-21).

1.6. MurF

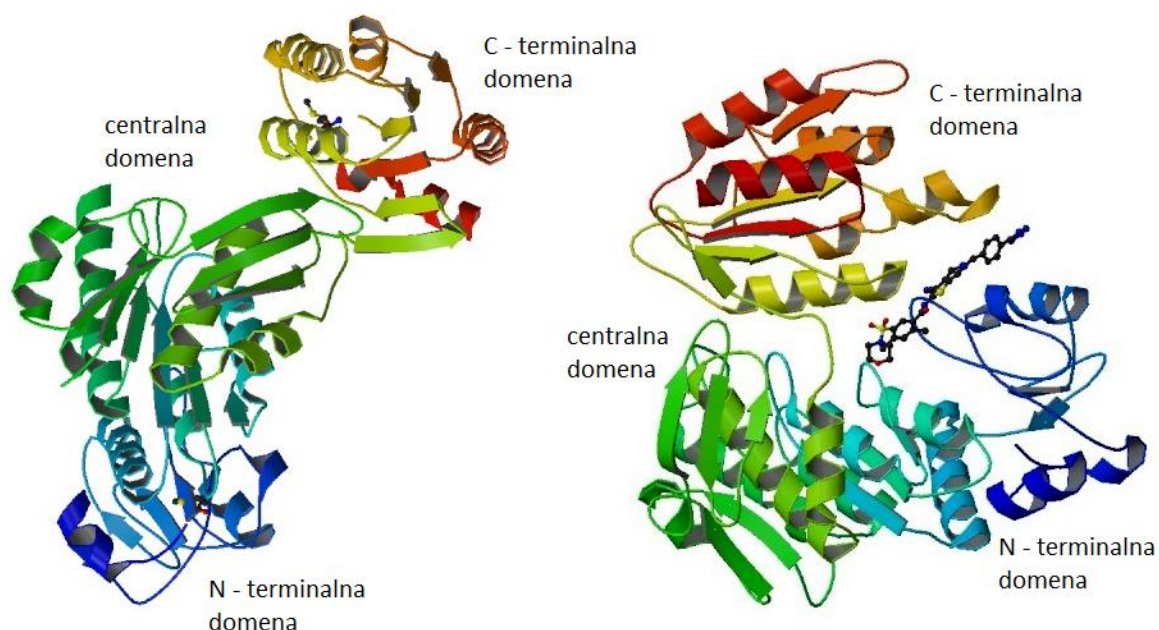
UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanil-L-glutamil-*mezo*-diaminopimelat/L-lizin D-alanil-D-alanin ligaza, na kratko MurF, je zadnji encim v vrsti Mur ligaz in katalizira vezavo končnega dipeptida na UDP-MurNAc-tripeptid (12-14, 19-21). Medtem ko nekatere gramnegativne bakterije lahko UDP-MurNAc-tripeptid sintetizirajo po alternativni poti z encimom murein peptidno ligazo (Mpl), ki tripeptid L-Ala-D-Glu-*m*-DAP/L-Lys pripne na UDP-MurNAc in sodeluje pri recikliranju peptidoglikana, je MurF edini do sedaj poznani encim, ki na peptidni most pripne zadnji dipeptid (12).

Vezava ATP sproži spremembo konformacije, ki olajša vezavo UDP-MurNAc-tripeptida ter dipeptida. *E. coli* MurF lahko kot UDP-MurNAc-tripeptidni substrat veže obe obliki UDP-MurNAc-tripeptida (gramnegativno z *m*-DAP in grampozitivno z L-Lys). V večini bakterij je dipeptidni substrat MurF D-Ala-D-Ala. Pri na vankomicin odpornih enterokokih (VRE) pa MurF vgrajuje depsipeptid D-alanil-D-laktat (D-Ala-D-Lac) in dipeptid D-alanil-D-serin (D-Ala-D-Ser). Za sintezo alternativnih substratov so odgovorni encimi iz družine D-Ala:D-X ligaz, ki imajo različno afiniteto do vstopajočih molekul (X = D-Ala, D-Lac ali D-Ser). Posledično ima vankomicin, ki onemogoči reakcijo transpeptidacije z vezavo na D-Ala-D-Ala fragment peptidnega mostu, trikrat manjšo afiniteto za vezavo na D-Ala-D-Lac fragmente in šestkrat manjšo afiniteto do D-Ala-D-Ser fragmentov, kar osemkrat poveča njegovo minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK). MurF je specifičen le pri vezavi C-terminalne aminokisline, kar dopušča zgoraj opisano variabilnost (12, 22).

1.6.1. Struktura encima

Znane so kristalne strukture apo oblike *E.coli* MurF, MurF iz *S. pneumoniae*, ki so jih kristalizirali v kompleksu z nizkomolekularnimi sulfonamidnimi cianotiofenskimi zaviralci, ter MurF iz bakterije *Thermotoga maritima*, kristalizirana v kompleksu s substratom ADP.

Encimi MurF različnih bakterij so si strukturno precej podobni, čeprav je njihovo aminokislinsko zaporedje identično v manj kot 30% (14, 19-21).



Slika 6: 3D strukture MurF iz bakterije *E. coli* brez substrata v odprti konformaciji (levo, PDB oznaka 1GG4) in MurF iz bakterije *S. pneumoniae* v kompleksu s cianotiofenskim zaviralcem v zaprti konformaciji (desno, PDB oznaka 3ZM6) (proteinske verige so barvane od N – terminalnega do C – terminalnega dela z uporabo mavričnega (spektralnega) barvnega gradienta, prirejeno po (20, 23, 24 23)).

1.6.2. Zaviralci MurF

Prvi zaviralci encima MurF so bili psevdo-tripeptidi in psevdo-tetrapeptidi aminoalkilfosfinske kisline, ki so bili sintetizirani kot analogi prehodnega stanja. Delovali so kot reverzibilni kompetitivni zaviralci *E. coli* MurF s K_i vrednostmi med 200 in 700 μM . Vendar niso imeli antibakterijskega delovanja. Na hidrolizo odporen ATP analog AMP-PCP se je pri testih na z MurF kataliziranih reakcijah izkazal kot močan zaviralec encima z ATP kompetitivnim delovanjem (12, 14).

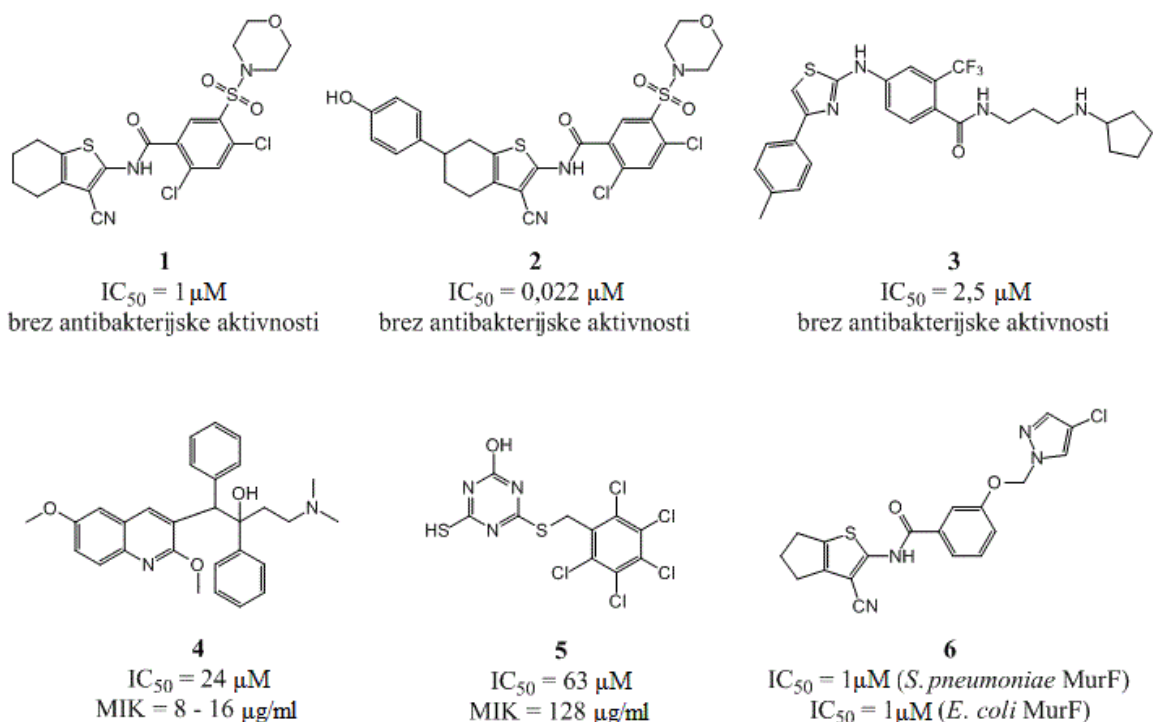
V družbi Abbott so z eno od metod rešetanja visoke zmogljivosti, ki temelji na afinitetno-masno spektroskopski identifikaciji, odkrili dva sulfonamidna zaviralca (Slika 7: 1) MurF iz *S. pneumoniae* (12, 19, 25). Kristalizacija kompleksa encima z zaviralcem je razkrila, da sta se oba inhibitorja vezala v področje vezave substratov in povzročila zaprtje konformacije. Podatki o interakcijah med inhibitorjem in encimom so postali osnova za oblikovanje serije novih sulfonamidnih zaviralcev z optimizirano strukturo (Slika 7: 2), ki zavirajo encim v nanomolarnem območju. Na žalost nobeden od sintetiziranih derivatov ne izkazuje pomembnejše protibakterijske aktivnosti. Potencialnih razlogov za odsotnost protibakterijskega učinka je veliko, vključno s premajhno prehodnostjo zaviralcev v citoplazmo, neselektivno vezavo na citoplazemske proteine ali kakšen drug neznan razlog. Da bi izključili težave s prehodnostjo zunanje membrane in prisotnost iztočnih črpalk, ki spojine odstranjujejo iz citoplazme, so opravili teste protibakterijskega delovanja v prisotnosti dobro znanih spojin za povečanje prehodnosti celične membrane in bakterijskih sevov brez iztočnih črpalk, a protibakterijske aktivnosti niso opazili (12, 19, 26, 27).

V družbi Johnson & Johnson so pri rešetanju kemijskih knjižnic s testom vezave molekul na MurF najprej odkrili spojino vodnico s tiazolilaminopirimidinskim skeletom. Identificirana analoga te spojine sta trikrat močnejša zaviralca MurF od prvotno identificirane spojine z IC_{50} vrednostmi 2,5 μ M (Slika 7: 3). A tudi pripadniki te skupine zaviralcev ne izkazujejo merljive protibakterijske aktivnosti pri testih na *E. coli* (28). Kasneje so na ta način odkrili še 8-hidroksikinolonsko skupino spojin, ki so poleg zaviralnega delovanja na izoliran encim ($IC_{50} \geq 330$ nM) izkazovale skromno protibakterijsko aktivnost (MIK na *E. coli* 8 – 32 μ g/ml). Vendar so z nadaljnjimi študijami sprememb razmerij koncentracij med MurF UDP-MurNAc-tripeptidnim substratom in UDP-MurNAc-pentapeptidnim produktom pri netretiranih bakterijah in bakterijah tretiranih s cikloserinom, ki zavira tvorbo MurF substrata D-Ala-D-Ala, ugotovili, da opazovana protibakterijska aktivnost ni posledica inhibicije MurF, temveč najverjetneje dobro znane kelatorske sposobnosti 8-hidroksikinolonov. Na osnovi 8-hidroksikinolinske serije pripravljen farmakoforni model je omogočil odkritje spojine s 4-fenilpiperidinskim fragmentom z IC_{50} vrednostjo 26 ± 2 μ M, MIK med 8 in 16 μ g/ml pri laboratorijsko spremenjenih sevih bakterij (povečana prepustnost membran), ter precej višjim MIK > 32 μ g/ml pri *E. coli* nativnega tipa. 4-fenilpiperidinski derivat je prva znana spojina, ki zavira delovanje MurF v bakterijskih celicah, kar posledično povzroči njihovo lizo. Z njenim odkritjem so potrdili hipotezo, da so zaviralci MurF potencialne protibakterijske

učinkovine (29). Njihovo najnovejše odkritje so arilkinolini (Slika 7: 4), ki zavirajo MurF v gramnegativnih in grampozitivnih bakterijah in potrjujejo širokospektralno delovanje MurF inhibitorjev (30).

S strukturno podprtim virtualnim rešetanjem osnovanem na kristalni strukturi kompleksa MurF encima s sulfonamidnim inhibitorjem (PDB oznaka 2AM1) so našli strukturno nov zaviralec z 2-hidroksi-4-merkaptio-1,3,5-triazinskim skeletom (Slika 7: 5), ki ima IC_{50} vrednost 63 μM , MIK pa 128 $\mu g/ml$ (31).

S sistematično strukturno modifikacijo sulfonamidnih zaviralcev so razvili novo skupino inhibitorjev MurF s cianotiofensko osnovo, ki zavirajo MurF iz *S. pneumoniae* v nanomolarnem območju, MurF iz *S. aureus* in *E. coli* v mikromolarnem območju, MIK najbolj aktivnih derivatov pa znaša 16 $\mu g/ml$ (32). Razumevanje načina vezave cianotiofenskih zaviralcev v *S. pneumoniae* MurF, ki sta ga razkrili kristalni strukturi kompleksa MurF z dvema predstavnikoma cianotiofenskih zaviralcev, je omogočilo oblikovanje novih, izboljšanih analogov z optimiziranimi fizikalno-kemijskimi lastnostmi (33).



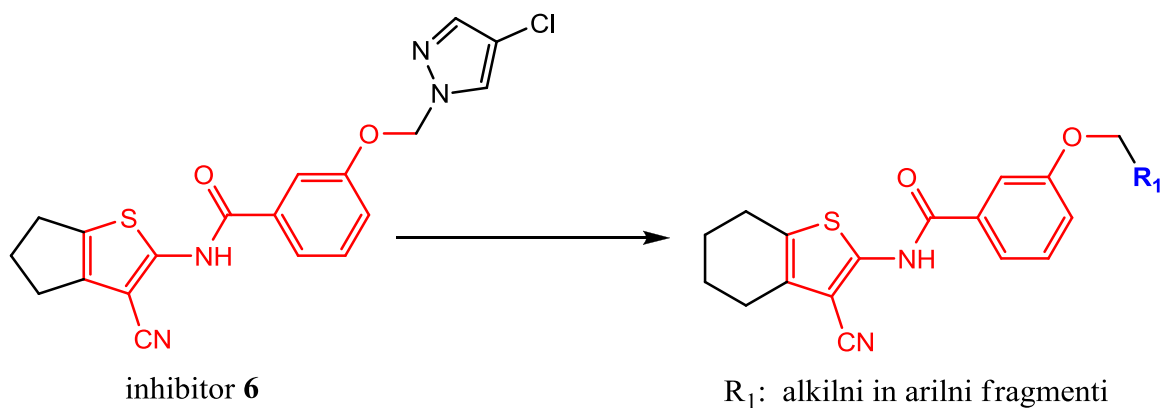
Slika 7: Znani zaviralci encima MurF (19, 26, 27, 28, 30, 31, 33).

2. Namen dela

Cilj diplomskega dela je sinteza in biološko vrednotenje novih spojin s cianotiofensko osnovo, ki bi dodatno razjasnile povezavo med strukturo in zaviralnim delovanjem te skupine inhibitorjev MurF.

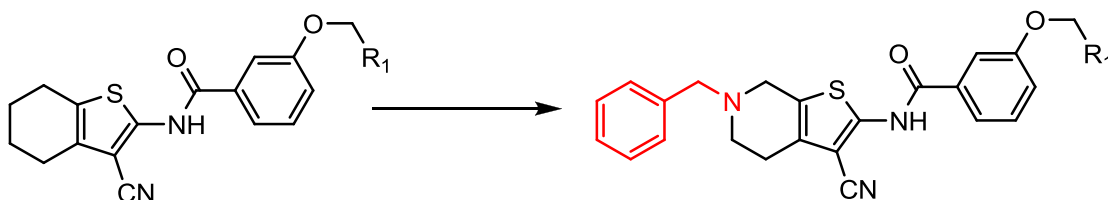
Iz predhodnih študij cianotiofenskih zaviralcev MurF je razvidno, da sta tetrahydrobenzo-2-amino-3-cianotiofen in benzojska kislina, med seboj povezana z amidno vezjo, ključna za dobro zaviralno aktivnost spojin (26, 27, 32). Poleg tega bomo spojine načrtovali na podlagi strukture inhibitorja **6** (Slika 7), ki so ga odkrili pri iskanju spojin s podobno tri dimenzionalno strukturo (33).

Prvi skupini spojin bomo pripeli različne alkilne in arilne fragmente s polarnimi funkcionalnimi skupinami. Na ta način bomo raziskali vpliv surogatov 4-kloropirazolnega fragmenta inhibitorja **6** na zaviralno delovanje. Uvedba polarnih fragmentov pa bo zmanjšala lipofilnost molekul, kar bi lahko izboljšalo prehajanje spojin v bakterijske celice (33).



Slika 8: Shema spremembe etilnih fragmentov. Z rdečo je obarvan fragment osnovnega skeleta, ki smo ga ohranili glede na strukturo inhibitorja **6**.

Da bi ugotovili vpliv podaljšanja osnovnega cianotiofenskega skeleta na naše spojine, kar temelji na v kristalnih strukturah kompleksov opaženi prostornosti tega vezavnega mesta in boljših rezultatih podaljšanih spojin v predhodnih SAR študijah (26, 27, 32), bomo sintetizirali spojine z benzilnim fragmentom pripetim na osnovni piperidinocianotiofenski biciklični sistem. Tudi na ta osnoven skelet bomo poskusili pripeti različne alkilne fragmente.



Slika 9: Shema podaljšanja osnovnega skeleta. Z redečo smo obarvali fragment, s katerim smo podaljšali osnovni fragment.

Sintetizirane spojine bomo biokemijsko ovrednotili z določitvijo njihovega zaviralnega delovanja na dva različna encima MurF (*S. pneumoniae* in *E. coli* MurF). Aktivnim spojinam bomo določili IC_{50} vrednosti, najbolj obetavnim pa bomo določili tudi protibakterijsko delovanje z opredelitvijo njihove vrednosti MIK.

3. Materiali in metode

3.1. Materiali

Pri sinteznem delu v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev, kot so Acros, Apollo Scientific, Fluka, Sigma – Aldrich in Merck. Brezvodni tetrahidrofuran (THF) smo tik pred uporabo pripravili z destilacijo nad natrijem ob dodatku benzofenona kot indikatorja v argonovi atmosferi.

3.2. Metode

○ *Kromatografske metode*

Za *tenkoplastno kromatografijo (TLC)* smo uporabljali plošče TLC Silica gel 60 GF254 proizvajalca Merck z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem (velikost 20 x 20 cm). Mobilne faze smo navedli pri posameznih spojinah. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetlobo valovnih dolžin $\lambda = 254$ nm in $\lambda = 366$ nm, ter orositvena reagenta ninhidrin in FeCl_3 .

Za čiščenje nekaterih produktov sintez smo uporabili *kolonsko kromatografijo pod tlakom*, imenovano tudi »flash« kolonska kromatografija. V vseh primerih smo kot stacionarno fazo uporabili silikagel 60 z velikostjo delcev med 0,04 in 0,063 mm proizvajalca Merck. Uporabili smo različne mobilne faze, ki so navedene pri opisu postopka sinteze in čiščenja posamezne spojine.

Za analizo nekaterih spojin smo uporabili *tekočinsko kromatografijo visoke zmogljivosti (HPLC)*, ki smo jo izvedli na sistemu Agilent Technologies HP 1100 z G1365B UV-VIS detektorjem (220 in 254 nm). Uporabili smo kolono Luna C18 (4,6 x 250 mm), ki smo jo termostatirali na 25°C. Volumen injiciranega vzorca je bil 10 μl , hitrost pretoka mobilne faze pa 1 ml/min. Mobilna faza je bila mešanica 0,1 % raztopine trifluorocetne kisline (A) v bidestilirani vodi, ki smo jo pridobili z Millipore Advantage A10 sistemom, in acetonitrila (B). Gradient je bil od 10 % do 80 % v času 30 min.

○ *Spektroskopske metode*

Spektre *jedrskе magnetne resonance (NMR)* so posneli na Bruker Avance III 400 MHz spektrometru na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Interni standard je bil TMS, vzorce spojin pa smo raztopili v devteriranih topilih CDCl_3 , DMSO-d_6 in aceton- d_6 .

NMR spektre smo obdelali s programi MestRe-C in MestReNova proizvajalca MESTRELAB RESEARCH, S.L ter NMRnotebook 2.70 proizvajalca NMRTEC S.A.S. Kemijske premike (δ) smo podali v ppm – parts per million glede na interni standard.

Spektre *infrardeče spektroskopije* smo posneli na Perkin-Elmer, FT-IR System, Spectrum BX spektrometru na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Spektre *masne spektroskopije* so posneli v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani na VG – Analytical AutoSpec Q spektrometru proizvajalca Micromass iz Manchesterja v Veliki Britaniji z ESI tehniko.

○ *Elementna analiza*

Določanje relativne vsebnosti elementov ogljika, vodika in dušika pri novo sintetiziranih spojinah so izvedli na Perkin-Elmer 240C analizatorju na Katedri za organsko kemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

○ *Določanje temperatur tališča*

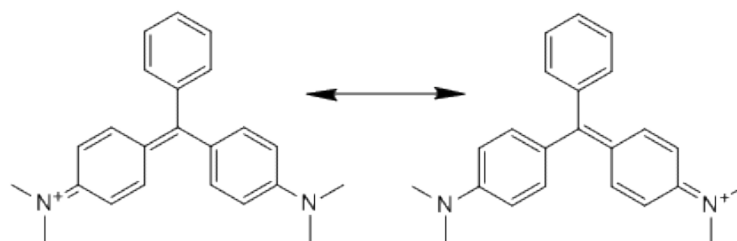
Temperature tališča sintetiziranih spojin smo določili s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in so nekorrigirana.

○ *Risanje in poimenovanje struktur spojin*

Za risanje strukturnih formul in poimenovanje spojin smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 11.0 proizvajalca Cambridge Soft. Pri iskanju literature v podatkovnih bazah smo si pomagali s programskim orodjem SciFinder Scholar.

○ *Biokemijsko testiranje*

Sintetizirane spojine so biokemijsko ovrednotili z določitvijo njihove zaviralne aktivnosti na encimu MurF izoliranem iz bakterij *S. pneumoniae* in *E. coli* z uporabo testa na osnovi barvila malahitno zeleno, s katerim lahko določimo sproščeni anorganski fosfat, ki se poleg ATP sprosti pri z MurF katalizirani tvorbi amidne vezi med UDP-tripeptidom in dipeptidom D-Ala-D-Ala.



Slika 10: Struktura barvila malahitno zeleno (MG).

Reakcijska zmes za inkubacijo encima s končnim volumnom 50 μ L je vsebovala:

→ *S. pneumoniae* MurF: pufer 50 mM Hepes, pH 8,0; 50 mM $MgCl_2$, 0,005 % Triton X-114; 100 μ M D-Ala-D-Ala; 50 μ M UDP-tripeptid-L-Lys; 250 μ M ATP; očiščen MurF_{Sp} in 250 ali 100 μ M testirane spojine raztopljene v DMSO,

→ *E. coli* MurF: pufer 50 mM Hepes, pH 8,0; 50 mM $MgCl_2$, 0,005 % Triton X-114, 600 μ M D-Ala-D-Ala, 100 μ M UDP-tripeptid-*m*-DAP; 500 μ M ATP; očiščen MurF_{Ec} in 250 ali 100 μ M testirane spojine raztopljene v DMSO.

Končna koncentracija DMSO je bila v obeh primerih 5 % (v/v). Po končani 15 minutni inkubaciji pri 37°C smo z dodatkom reagenta Biomol[®] ustavili encimsko reakcijo. Sproščen anorganski fosfat z molibdatom tvori fosfomolibdat, ki tvori s 3 molekulami malahitnega zelenega obarvan kompleks, ki ga spektrofotometrično določamo pri valovni dolžini 650 nm. Vsi poizkusi so bili izvedeni v dveh paralelah.

Dodatek zaviralca zniža katalitično aktivnost encima in posledično zmanjša količino pri reakciji sproščenega anorganskega fosfata v primerjavi s kontrolno meritvijo brez zaviralca. To spremembo v aktivnosti encima podamo z rezidualno aktivnostjo (RA), ki predstavlja razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti zaviralca in aktivnostjo encima kontrolne meritve, ki ne vsebuje zaviralca. Podane rezidualne aktivnosti so določili pri koncentraciji zaviralca 100 μ M, razen če je navedeno drugače. Najaktivnejšim spojinam so določili IC₅₀ vrednosti, ki predstavljajo koncentracijo spojine, pri kateri je rezidualna aktivnost 50%.

Meritve encimske aktivnosti ligaze MurF je opravila asist. dr. Martina Hrast, mag. farm. na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

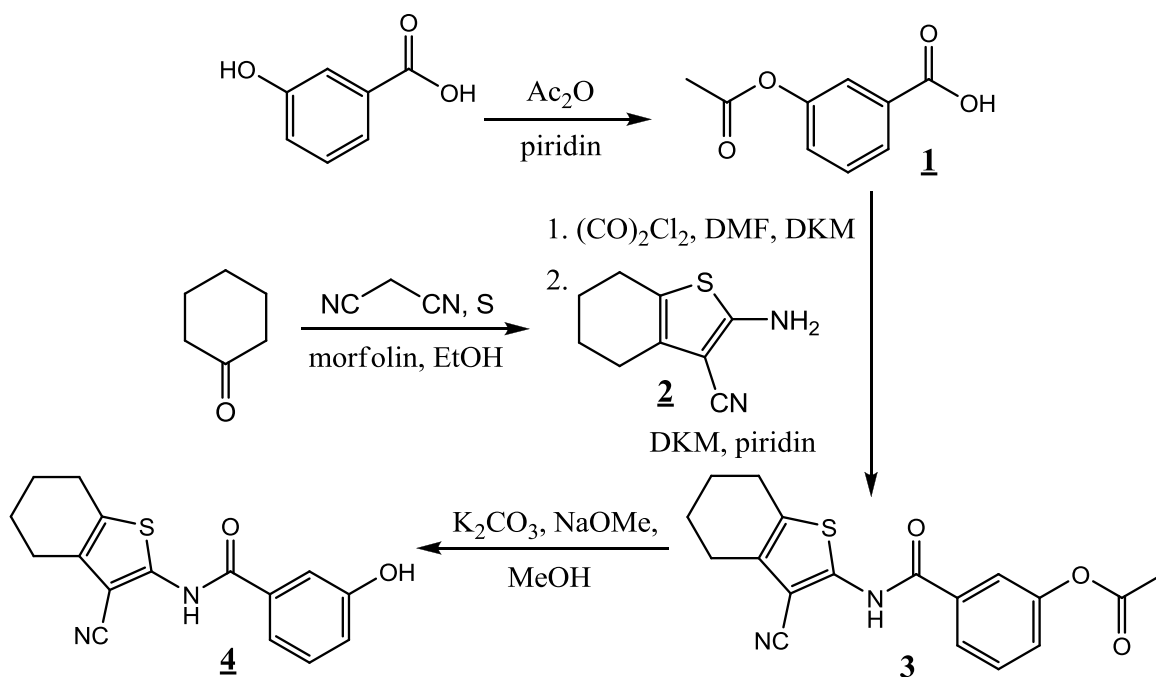
○ **Protibakterijsko delovanje**

Protibakterijsko delovanje spojin, ki sta imeli najboljši zaviralni učinek na izoliran encim MurF, so določili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotitrskih ploščicah s 5% (v/v) lizatom konjske krvi na sevu *S. pneumoniae* R6. Protimikrobno delovanje spojin **6** in **17** so preverili na sevu *S. aureus* (SH1000) in na sevih *E. coli* (1411, AB734, SM1411, ES100).

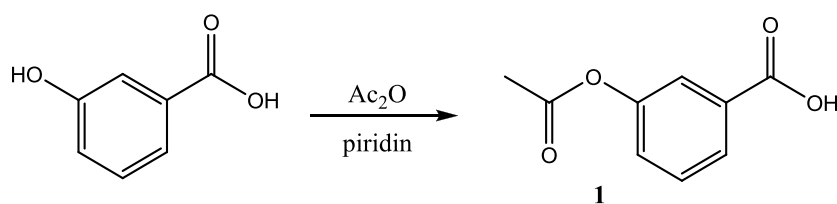
4. Eksperimentalno delo

4.1. Sinteza osnovnih skeletov (spojini 4 in 6)

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



4.1.1.1. Sinteza 3-acetoksibenzojske kisline (spojina 1) (33)

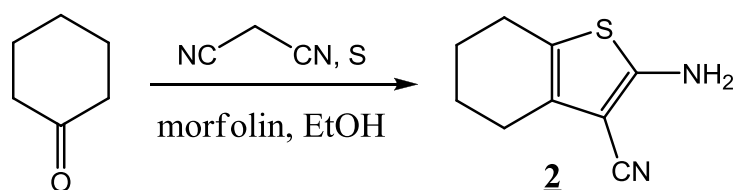


3 – hidroksibenzojsko kislino (10,01 g, 72,5 mmol) smo raztopili v piridinu (20 ml) in med mešanjem dodali acetanhidrid (27,4 ml, 289,9 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 1 uro pri sobni temperaturi. Konec reakcije smo preverili s TLC.

Zmes smo zlili v vodo (100 ml) in jo nakisali s koncentrirano HCl do pH = 2. Vodno fazo smo ekstrahirali z EtOAc (3x 100 ml). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (1x 100 ml), posušili z Na_2SO_4 , sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom.

3-acetoksibenzojska kislina		$M_r = 180,16$
Izgled:	beli kristali	
Rf:	0,31 (MF: 5% MeOH v DKM, 0,3% očetne kisline)	
Tališče:	130 – 131 ⁰ C (lit. (34) 130 – 135 ⁰ C)	
Izkoristek:	93%	
¹H – NMR (400MHz, DMSO - d₆)	$\delta = 2,28$ (s, 3H, CO – CH ₃); 7,39 (ddd, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, $J_3 = 1,1$ Hz, 1H, Ar – H); 7,52 – 7,56 (m, 1H, Ar – H); 7,65 – 7,69 (m, 1H, Ar – H); 7,80 – 7,86 (m, 1H, Ar – H); 13,18 (bs, 1H, Ar – COOH) ppm.	

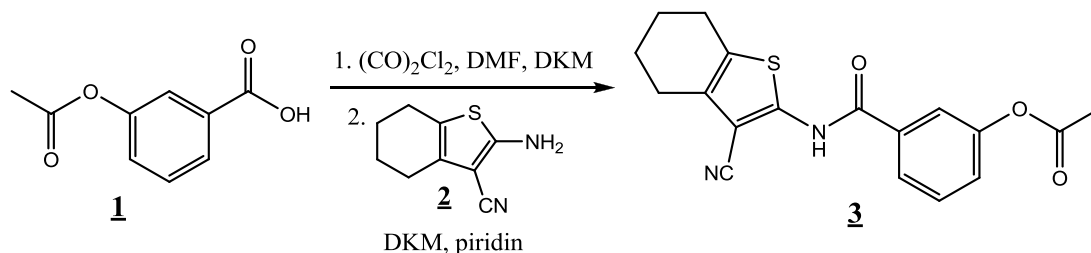
4.1.1.2. Sinteza 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-karbonitrila (spojina 2)



Cikloheksanon (9,3 ml, 88,4 mmol) in malononitril (6,61 g, 100,1 mmol) smo raztopili v etanolu (25 ml), ter med mešanjem dodali žveplo (3,53 g, 110,1 mmol) in morfolin (17,4 ml, 199,5 mmol). Reakcijsko zmes smo 3 ure segrevali ob refluxu. Zmes smo ohladili na ledeni kopeli. Oborina je izpadla po dodatku vode (10 ml). Oborino smo odnučali in sprali z vodo.

2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-karbonitril		$M_r = 178,25$
Izgled:	rumenorjavi kristali	
Rf:	0,60 (MF: EtOAc/Hex = 1/1)	
Tališče:	145 – 146 ⁰ C (lit. (35) 144 – 146 ⁰ C)	
Izkoristek:	79%	
¹H – NMR (400 MHz, CDCl₃)	$\delta = 1,73 – 1,85$ (m, 4H, CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂); 2,47 – 2,53 (m, 4H, CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂); 4,61 (s, 2H, –NH ₂) ppm.	

4.1.1.3. Sinteza 3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenil acetata (spojina **3**) (**33**)



Spojino **1** (3,00 g, 16,7 mmol) smo raztopili v diklorometanu (25 ml) in med mešanjem dodali DMF (0,2 ml, 2,6 mmol). Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli in med mešanjem po kapljicah dodali oksalil klorid (4,3 ml, 50,1 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 1 uro pri sobni temperaturi. Topilo in prebitni oksalil klorid smo odparili pod znižanim tlakom.

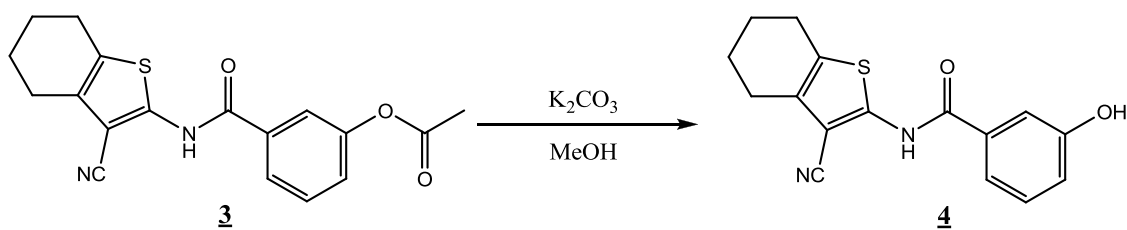
Ostanek smo raztopili v diklorometanu (10 ml). Spojino **2** (2,82 g, 15,8 mmol) smo raztopili v diklorometanu (40 ml) ter ji dodali piridin (4,0 ml, 49,4 mmol). Tako pripravljeno zmes smo prenesli v kapalnik. Zmes spojine **2** in piridina smo počasi s kapalnikom dokapavali v raztopino ostanka, ki smo jo medtem hladili na ledeni kopeli. Končno reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi.

Reakcijsko zmes smo spirali z 1M HCl (3x 25 ml), nasičeno raztopino NaHCO_3 (1x 25 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1x 25 ml). Organsko fazo smo na koncu sušili z Na_2SO_4 , sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Ostanek smo prekristalizirali iz etanola.

3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)karbamoil)fenil acetat		$M_r = 340,40$
Izgled:	beli kristali	
Rf:	0,50 (MF: EtOAc/Hex = 1/1)	
Tališče:	161 – 162 ⁰ C	
Izkoristek:	65%	
¹H – NMR (400 MHz, CDCl₃)	$\delta = 1,82 - 1,88$ (m, 4H, $\text{CH}_2 - \underline{\text{CH}_2} - \underline{\text{CH}_2} - \text{CH}_2$); 2,34 (s, 3H, O – CO – $\underline{\text{CH}_3}$); 2,59 – 2,71 (m, 4H, $\underline{\text{CH}_2} - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \underline{\text{CH}_2}$); 7,35 (ddd, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 2,3$ Hz, $J_3 = 1,0$ Hz, 1H, Ar – H); 7,54 (t, $J = 8,0$ Hz, 1H, Ar – H); 7,65 (t, $J = 2,0$ Hz, 1H, Ar – H); 7,78 (ddd, $J_1 = 7,8$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, $J_3 = 1,0$ Hz, 1H, Ar – H); 8,99 (s, 1H, CO – $\underline{\text{NH}}$) ppm.	

¹³ C – NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 21,11; 22,12; 23,09; 23,98; 94,26; 114,54; 121,12; 124,93; 126,26; 128,94; 130,07; 131,25; 133,41; 146,53; 150,95; 162,87; 169,30 ppm.			
ESI – HRMS	izračunano za C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ S (m/z):		341,0960 [M+H] ⁺	
	izmerjen (m/z):		341,0966	
IR (KBr)	3237, 3202, 3074, 2936, 2842, 2365, 2345, 2223, 2212, 1765, 1671, 1572, 1545, 1458, 1369, 1325, 1291, 1272, 1206, 1146, 1094 in 1010 cm ⁻¹			
Elementna analiza		% C	% H	% N
	izračunano za C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O ₃ S x 0,1 H ₂ O	63,18	4,77	8,19
	Ugotovljeno	62,90	4,45	8,05

4.1.1.4. Sinteza *N*-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)-3-hidroksi benzamida (spojina **4**) (**33**)



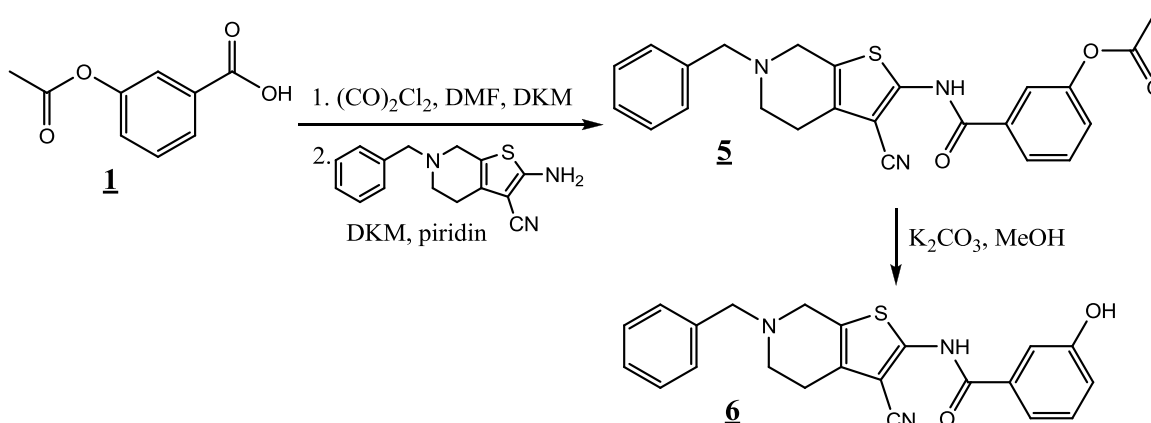
Spojino **3** (3,71 g, 10,9 mmol) smo suspendirali v metanolu (30 ml) in dodali K_2CO_3 (4,52g, 32,7 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 1 uro pri sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

Ostanek smo raztopili v 1M HCl (200 ml). Vodno fazo smo ekstrahirali z EtOAc (3x 150 ml). Združene organske faze smo spirali s koncentrirano HCl (1x 70 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1x 100 ml), jih sušili z Na_2SO_4 ter sušilno sredstvo odfiltrirali. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

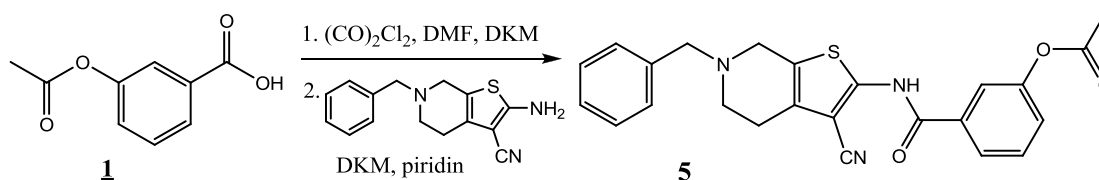
<i>N</i>-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-3-hidroksibenzamid		$M_r = 298,36$
Izgled:	drobni beli kristali	
Rf:	0,44 (MF: EtOAc/Hex = 1/1)	
Tališče:	249 – 250 $^{\circ}\text{C}$	
Izkoristek:	87%	

¹ H – NMR (400 MHz, aceton-d ₆)	δ = 1,80 – 1,90 (m, 4H, CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂); 2,53 – 2,71 (m, 4H, CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂); 7,07 – 7,13 (m, 1H, Ar – <u>H</u>); 7,35 – 7,42 (m, 1H, Ar – <u>H</u>); 7,45 – 7,54 (m, 2H, 2x Ar – <u>H</u>); 8,85 (s, 1H, CO – <u>NH</u>); 10,52 (s, 1H, Ar – <u>OH</u>) ppm.			
¹³ C - NMR (400 MHz, aceton-d ₆)	δ = 22,92; 23,84; 24,46; 24,67; 96,20; 114,52; 115,62; 119,87; 120,44; 129,47; 130,70; 132,17; 134,96; 147,33; 158,47; 165,45 ppm.			
ESI – HRMS	izračunano za C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ S (m/z):		299,0854 [M+H] ⁺	
	izmerjen (m/z):		299,0856	
IR (KBr)	3380, 3244, 3077, 2992, 2943, 2922, 2840, 2345, 2222, 1660, 1616, 1587, 1576, 1559, 1490, 1458, 1399, 1327, 1306, 1283, 1260, 1216, 1147, 1078 in 1029 cm ⁻¹			
Elementna analiza		% C	% H	% N
	izračunano za C ₁₆ H ₁₄ N ₂ O ₂ S	64,41	4,73	9,39
	ugotovljeno	64,19	4,56	9,27

4.1.2. Sinteza *N*-(6-benzil-3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridin-2-il)-3-hidroksibenzamida (spojina **6**)



4.1.2.1. Sinteza 3-(6-benzil-3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridin-2-il karbamoil)fenil acetata (spojina **5**)



Spojino **1** (2,00 g, 11,1 mmol) smo raztopili v diklorometanu (20 ml) in med mešanjem dodali DMF (130 µl, 1,7 mmol). Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli

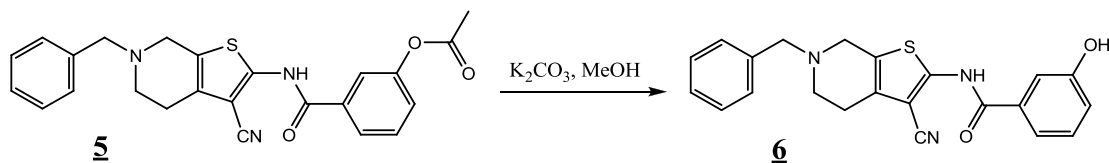
in med mešanjem po kapljicah dodali oksalil klorid (2,9 ml, 33,8 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 45 minut. Prvih 20 minut smo zmes hladili na ledeni kopeli, preostalih 25 minut pa smo mešali pri sobni temperaturi. Topilo in prebitni oksalil klorid smo odparili pod znižanim tlakom.

Ostanek smo raztopili v diklorometanu (10 ml). 2-amino-6-benzil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridin-3-karbonitril (2,86 g, 10,6 mmol) smo raztopili v diklorometanu (60 ml) in dodali piridin (2,7 ml, 33,5 mmol). Tako pripravljeno zmes smo prenesli v kapalnik in jo počasi dokapavali v raztopino ostanka, ki smo jo medtem hladili na ledeni kopeli. Končno reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi.

Reakcijsko zmes smo sprali z 1M HCl (1x 50 ml). Organski fazi smo odparili topilo pod znižanim tlakom in ostanek raztopili v EtOAc (100 ml). Organsko fazo smo spirali z 1M HCl (1x 50 ml), nasičeno raztopino NaHCO₃ (1x 40 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1x 40 ml). Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄ ter sušilno sredstvo odfiltrirali. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

3-(6-benzil-3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3- <i>c</i>]piridin-2-ilkarbamoi)fenil acetat			Mr = 431,51	
Izgled:	drobni rumeni kristali			
Rf:	0,43 (MF: EtOAc/Hex = 1/1)			
Tališče:	169 – 171 ⁰ C			
Izkoristek:	34%			
1H – NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 2,37 (s, 3H, O – CO – CH ₃); 2,74 – 2,80 (m, 2H, C – CH ₂ – CH ₂ – N); 2,83 – 2,92 (m, 2H, C – CH ₂ – CH ₂ – N); 3,61 (s, 2H, C – CH ₂ – N); 3,76 (s, 2H, N – CH ₂ – Ar); 7,30 – 7,43 (m, 6H, 6x Ar – H); 7,57 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H, Ar – H); 7,67 (t, <i>J</i> = 1,9 Hz, 1H, Ar – H); 7,80 (ddd, <i>J</i> ₁ = 7,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,7 Hz, <i>J</i> ₃ = 1,0 Hz, 1H, Ar – H); 9,12 (s, 1H, CO – NH – C) ppm.			
¹³ C – NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 21,12; 23,67; 49,18; 50,34; 61,28; 93,74; 114,12; 121,20; 125,02; 126,41; 127,90; 128,65; 129,42; 129,71; 130,14; 133,15; 147,53; 150,95; 163,02; 169,34 ppm.			
ESI – HRMS	izračunano za C ₂₄ H ₂₁ N ₃ O ₃ S (m/z):		432,1382 [M+H] ⁺	
	izmerjen (m/z):		432,1384	
IR (KBr)	3267, 3207, 3084, 2912, 2804, 2771, 2224, 1767, 1664, 1584, 1558, 1456, 1368, 1296, 1270, 1204, 1138, 1092, 1049, 1012 in 1001 cm ⁻¹			
Elementna analiza		% C	% H	% N
	izračunano za C ₂₄ H ₂₁ N ₃ O ₃ S	65,44	5,03	9,54
	ugotovljeno	65,51	4,71	9,47

4.1.2.2. Sinteza *N*-(6-benzil-3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridin-2-il)-3-hidroksibenzamida (spojina **6**)



Spojino **5** (1,48 g, 3,4 mmol) smo suspendirali v metanolu (30 ml) in dodali K_2CO_3 (1,42 g, 10,3 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali eno uro pri sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

Ostanek smo raztopili v 1M HCl (200 ml) ter odnučali nastalo oborino.

<i>N</i> -(6-benzil-3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3- <i>c</i>]piridin-2-il)-3-hidroksibenzamid		Mr = 389,47
Izgled:	beli kristali	
Rf:	0,37 (MF: EtOAc/Hex = 1/1)	
Tališče:	184 – 186 ⁰ C	
Izkoristek:	86%	
¹H – NMR (400 MHz, DMSO – d₆)	δ = 2,99 (s, 2H, N – CH ₂ – Ar); 3,69 (s, 2H, C – CH ₂ – N); 4,26 – 4,53 (m, 4H, C – CH ₂ – CH ₂ – N); 7,03 – 7,12 (m, 1H, Ar – H); 7,31 – 7,43 (m, 3H, Ar – H); 7,45 – 7,54 (m, 3H, Ar – H); 7,69 – 7,61 (m, 2H, Ar – H); 9,99 (bs, 1H, CO – NH – C); 11,40 (bs, 1H, Ar – OH) ppm.	
ESI – HRMS	izračunano za C ₂₂ H ₁₉ N ₃ O ₂ S (m/z):	390,1276 [M+H] ⁺
	izmerjen (m/z):	390,1266
IR (KBr)	3191, 2936, 2677, 2552, 2214, 1670, 1584, 1546, 1496, 1450, 1421, 1293, 1214, 1085 in 1032 cm ⁻¹	
HPLC	t _R = 9,570 min, 100% (λ = 220nm), 100% (λ = 254nm)	

4.2. Splošni predpis za sintezo spojin 7, 8 in 9

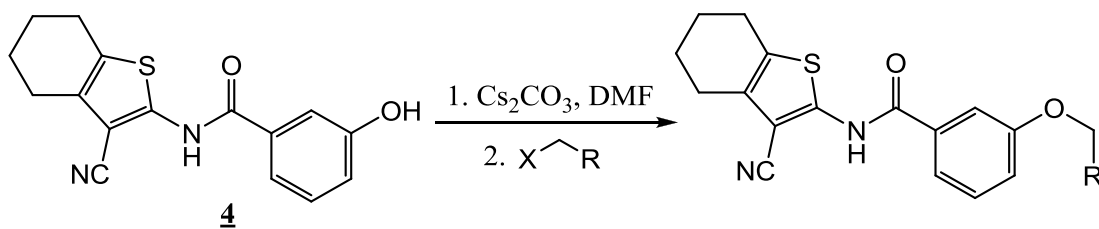


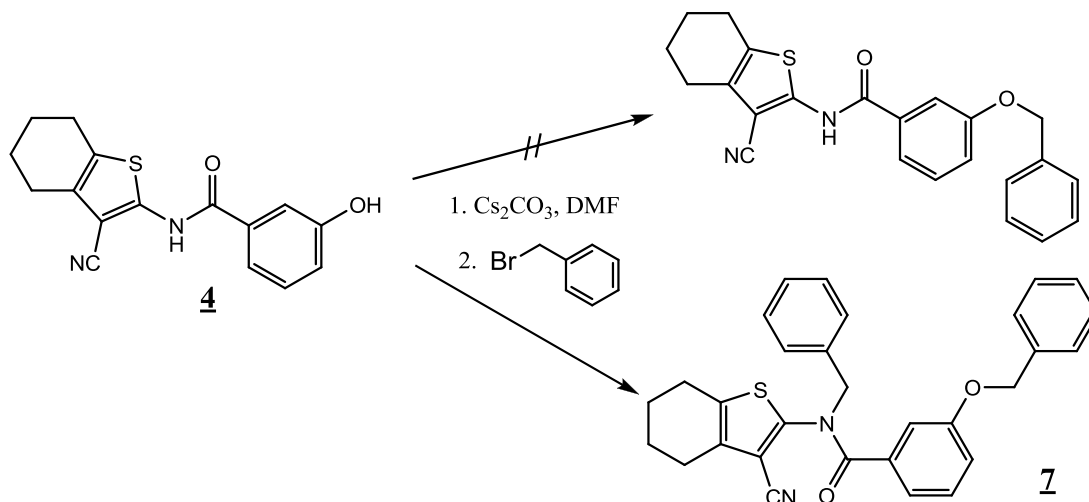
Tabela 1: Izbrani šestčlenski heterociklični substituenti.

Oznaka spojine	X	R
<u>7</u>	Br	
<u>8</u>	Cl	
<u>9</u>	Br	

Spojino 4 (0,30 g, 1,0 mmol) smo raztopili v DMF (2-5 ml), dodali Cs_2CO_3 (0,98 g, 3,0 mmol; 0,29 g, 0,9 mmol) in mešali 15-20 minut. Benzilhalidni derivat (1,1 mmol) smo raztopili v DMF (1 ml), raztopino dodali reakcijski zmesi in mešali čez noč pri sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

Ostanek smo raztopili. Raztopino smo sprali z vodo in nasičeno raztopino NaCl, posušili smo jo z Na_2SO_4 , sušilno sredstvo odfiltrirali ter topilo odparili pod znižanim tlakom.

4.2.1. Sinteza *N*-benzil-3-(benziloksi)-*N*-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)benzamida (spojina **7**)

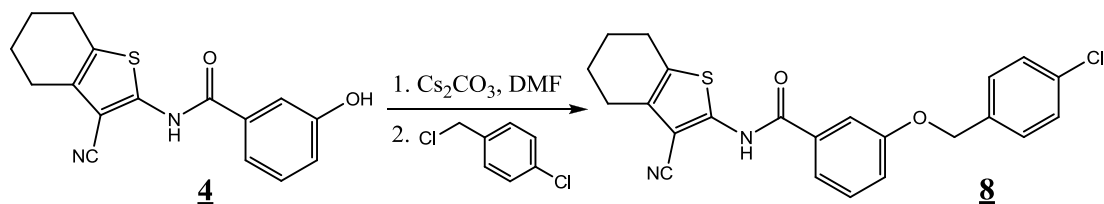


Ostanek smo raztopili v EtOAc (30 ml). Raztopino smo enkrat sprali z 10 ml vode in enkrat z 10 ml nasičene raztopine NaCl.

Čiščenje spojine **5** smo nadaljevali s kolonsko kromatografijo v mobilni fazi EtOAc/Hex = 1/4.

<i>N</i> -benzil-3-(benziloksi)- <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>] tiofen-2-il)benzamid			M _r = 478,60	
Izgled:	rumeno olje			
Rf:	0,25 (MF: EtOAc/Hex = 1/4)			
Izkoristek:	51%			
¹ H – NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 1,68 – 1,80 (m, 4H, CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂); 2,41 – 2,56 (m, 4H, CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂); 5,00 (s. 2H, N – CH ₂ – Ar); 5,10 (s, 2H, O – CH ₂ – Ar); 6,97 (ddd, <i>J</i> ₁ = 8,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,6 Hz, <i>J</i> ₃ = 0,9 Hz, 1H, Ar – <u>H</u>); 7,04 – 7,09 (m, 1H, Ar – <u>H</u>); 7,16 – 7,22 (m, 2H, 2x Ar – <u>H</u>); 7,28 – 7,42 (m, 10H, 10x Ar – <u>H</u>) ppm.			
¹³ C – NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 21,77; 22,78; 24,15; 24,60; 54,90; 70,17; 108,95; 113,23; 113,90; 118,15; 120,60; 127,56; 128,11; 128,65; 128,72; 129,24; 133,94; 135,33; 135,93; 136,10; 136,57; 151,11; 158,37; 170,35 ppm.			
ESI	izračunano za C ₃₀ H ₂₆ N ₂ O ₂ S (m/z):		479,2 [M+H] ⁺	
	izmerjen (m/z):		479,2	
IR (KBr)	3402, 3063, 3031, 2931, 2859, 2221, 1953, 1665, 1579, 1496, 1436, 1366, 1291, 1212, 1130, 1077, 1026 cm ⁻¹			
Elementna analiza		% C	% H	% N
	izračunano za C ₃₀ H ₂₆ N ₂ O ₂ S x 0,4 H ₂ O	74,17	5,56	5,77
	ugotovljeno	74,01	5,75	5,72

4.2.2. Sinteza 3-(4-klorobenziloksi)-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)benzamida (spojina **8**) (**33**)

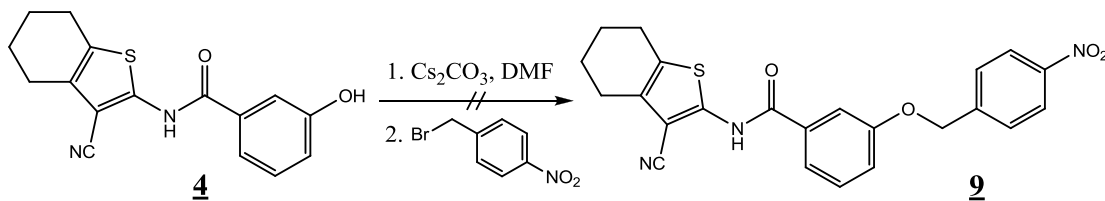


Ostanek smo raztopili v DKM (50 ml). Raztopino smo dvakrat sprali s 50 ml vode in enkrat s 30 ml nasičene raztopine NaCl.

Ostanek smo prekrystalizirali iz etanola.

3-(4-klorobenziloksi)-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b] tiofen-2-il)benzamid			M _r = 422,93	
Izgled:	beli kristali			
Rf:	0,23 (MF: EtOAc/Hex = 1/4)			
Tališče:	195 – 196 ⁰ C			
Izkoristek:	44%			
¹ H – NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 1,79 – 1,90 (m, 4H, CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂); 2,58 – 2,70 (m, 4H, CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂); 5,11 (s, 2H, O – CH ₂ – Ar); 7,17 – 7,21 (m, 1H, Ar – H); 7,34 – 7,42 (m, 4H, 4x Ar – H); 7,42 – 7,48 (m, 2H, 2x Ar – H); 7,51 – 7,55 (m, 1H, Ar – H); 8,85 (s, 1H, CO – NH) ppm.			
¹³ C – NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 22,12; 23,10; 24,00; 69,46; 94,08; 113,64; 114,49; 119,42; 120,07; 128,87; 128,92; 130,26; 131,12; 133,29; 134,06; 134,74; 146,57; 159,04; 163,27 ppm.			
ESI – HRMS	izračunano za C ₂₃ H ₁₉ ClN ₂ O ₂ S (m/z):		423,0934 [M+H] ⁺	
	izmerjen (m/z):		423,0939	
IR (KBr)	3446, 3252, 3200, 3076, 2932, 2855, 2366, 2217, 1889, 1670, 1602, 1595, 1573, 1558, 1490, 1470, 1456, 1411, 1399, 1378, 1327, 1296, 1279, 1229, 1164, 1153, 1116, 1095, 1082, 1054, 1032, 1014 cm ⁻¹			
Elementna analiza		% C	% H	% N
	izračunano za C ₂₃ H ₁₉ ClN ₂ O ₂ S x 0,3 H ₂ O	64,49	4,61	6,54
	ugotovljeno	64,29	4,32	6,44

4.2.3. Poskus sinteze *N*-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)-3-(4-nitrobenziloksi)benzamida (spojina **9**)



Ostanek smo raztopili v EtOAc (30 ml). Raztopino smo spirali z vodo (2x 20 ml) nasičeno raztopino NaCl (1x 20 ml), 1M NaOH (1x 30 ml) in ponovno z nasičeno raztopino NaCl (1x 20 ml).

Čiščenje spojine **9** smo nadaljevali s kolonsko kromatografijo v mobilni fazi EtOAc/Hex = 1/3. S kolonsko kromatografijo nam ni uspelo očistiti produkta.

4.3. Splošni predpis za sintezo spojin **10**, **11** in **12**

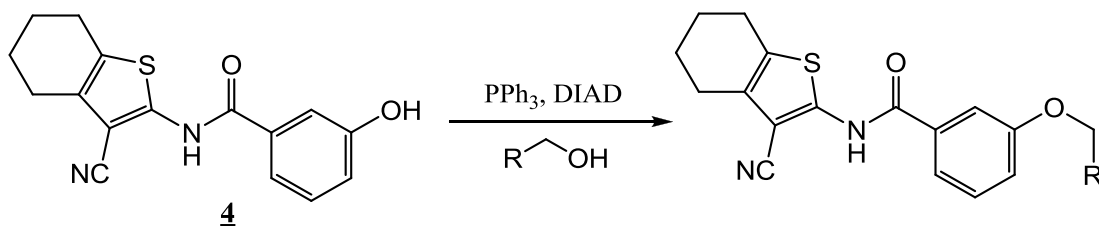
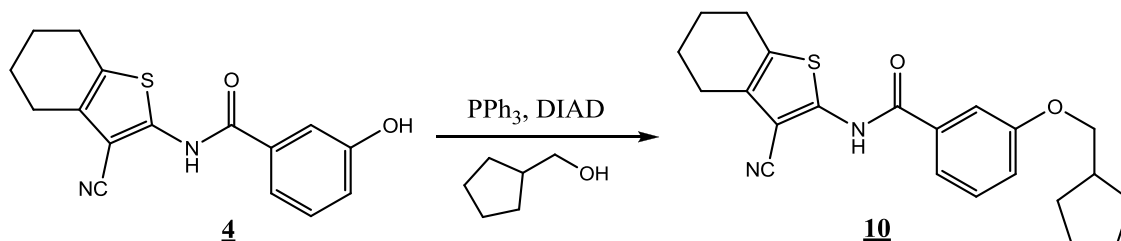


Tabela 2: Izbrani petčlenski heterociklični substituenti.

Oznaka spojine	R
10	
11	
12	

Spojino **4** (1 mmol) smo raztopili v brezvodnem THF (5 ml), dodali smo 1,5 ekvivalenta PPh₃ in 1,1 ekvivalent alkohola. Zmes smo ohladili na ledeni kopeli. Med hlajenje in mešanjem smo po kapljicah dodali 1,5 ekvivalenta diizopropil azodikarboksilata. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

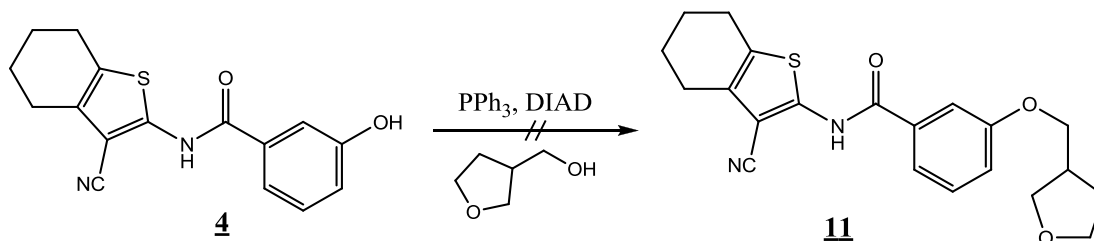
4.3.1. Sinteza *N*-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)-3-(ciklopentilmetoksi)benzamida (spojina **10**) (33)



Ostanek smo raztopili v EtOAc (30 ml). Organsko fazo smo spirali z vodo (1x 10 ml), 1M HCl (2x 15 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1x 10 ml), sušili z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali ter topilo odparili pod znižanim tlakom. Čiščenje spojine **12** smo nadaljevali s kolonsko kromatografijo v mobilni fazi EtOAc/Hex = 1/3.

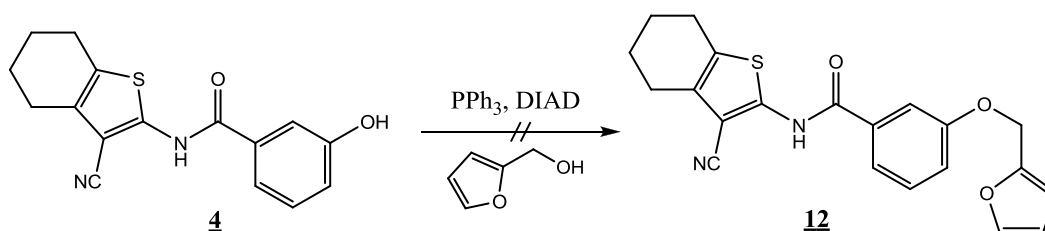
<i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-3-(ciklopentilmetoksi)benzamid			Mr = 380,50	
Izgled:	rumeni kristali			
Rf:	0,25 (MF: EtOAc/Hex = 1/3)			
Tališče:	128 – 130 ⁰ C			
Izkoristek:	23%			
¹ H – NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 1,28 – 1,31 (m, 2H, CH ₂); 1,49 – 1,60 (m, 6H, CH ₂); 1,70 – 1,79 (m, 7H, CH); 2,30 – 2,34 (m, 1H, CH); 2,46 – 2,49 (m, 4H, CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂); 6,85 – 6,88 (m, 1H, Ar – H); 6,91 – 6,96 (m, 2H, 2 x Ar – H); 7,17 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H, Ar – H) ppm.			
¹³ C – NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 21,07; 22,11; 23,23; 23,49; 24,35; 28,47; 37,73; 114,31; 114,82; 117,30; 119,92; 128,74; 131,05; 131,95; 154,98 ppm.			
ESI – HRMS	izračunano za C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₂ S (m/z):		381,1637 [M+H] ⁺	
	izmerjen (m/z):		381,1634	
IR (KBr)	3340, 3026, 2943, 2867, 2479, 2365, 2217, 2164, 1942, 1869, 1610, 1586, 1488, 1458, 1402, 1385, 1352, 1301, 1262, 1242, 1214, 1172, 1100, 1082 in 1026 cm ⁻¹			
Elementna analiza		% C	% H	% N
	izračunano za C ₂₂ H ₂₄ N ₂ O ₂ S x 0,7H ₂ O	67,22	6,51	7,13
	ugotovljeno	67,15	6,37	7,12

4.3.2. Poskus sinteze *N*-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)-3-((tetrahidro furan-3-il)metoksi)benzamida (spojina **11**)



Ostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo v mobilnih fazah EtOAc/Hex = 1/2 in nato še E/PE = 1/1. Z analizno metodo ^1H – NMR nam ni uspelo potrditi istovetnosti spojine.

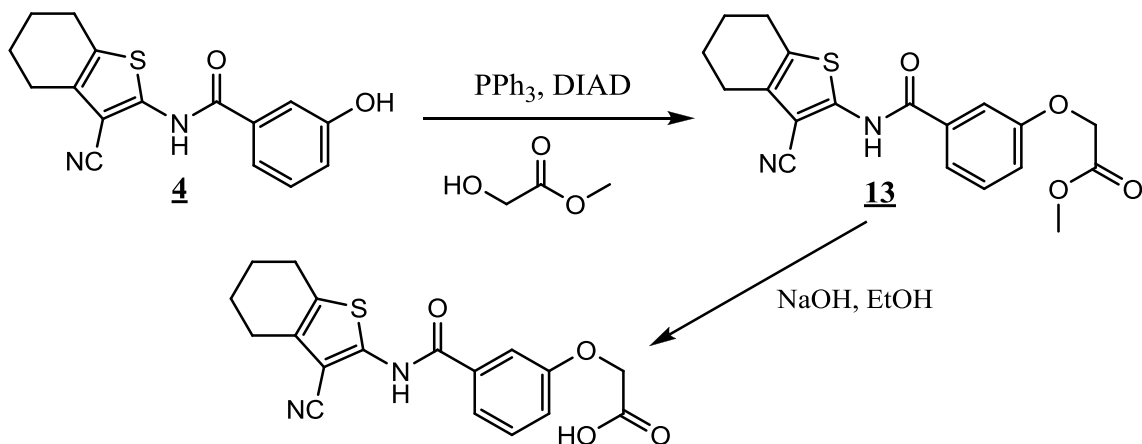
4.3.3. Poskus sinteze *N*-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)-3-(furan-2-ilmetoksi)benzamida (spojina **12**)



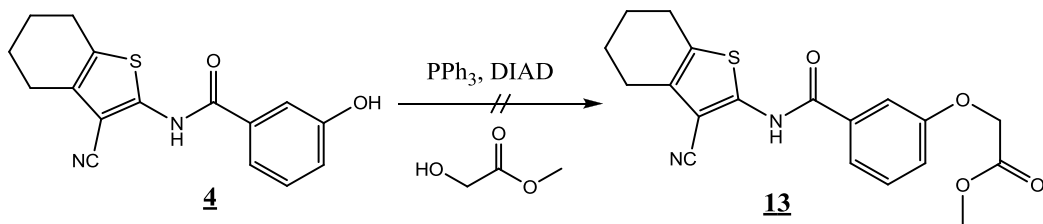
Ostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo v mobilnih fazah EtOAc/Hex = 1/2 in nato še E/PE = 1/1. Z analizno metodo ^1H – NMR nam ni uspelo potrditi istovetnosti spojine.

4.4. Sinteza alkilnih etrskih derivatov

4.4.1. Sinteza 2-(3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)ocetne kisline



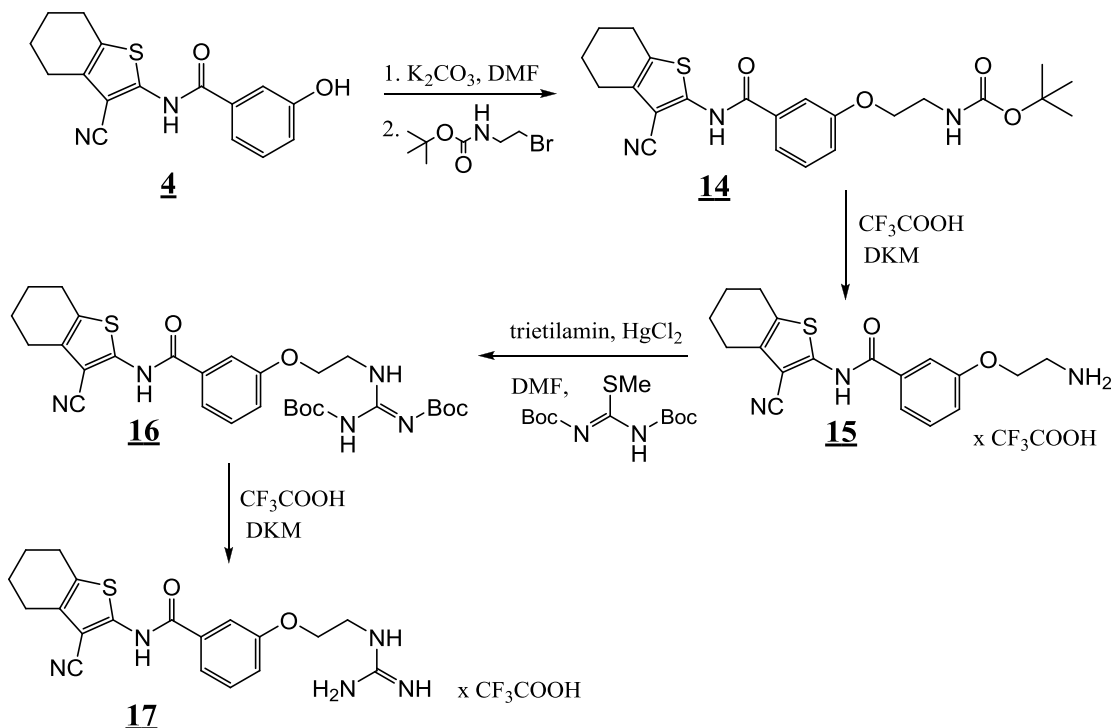
4.4.1.1. Poskus sinteze metil 2-(3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]thiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)acetata (spojina 13)



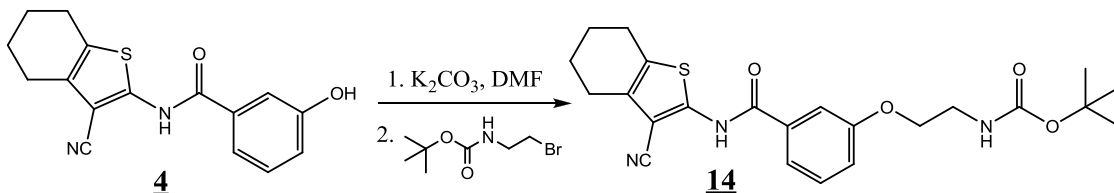
Spojino 4 (0,30 g, 1,0 mmol) smo raztopili v brezvodnem THF (5 ml), dodali smo PPh_3 in metil glikolat (60 μl , 0,8 mmol). Zmes smo ohladili na ledeni kopeli. Med hlajenjem in mešanjem smo po kapljicah dodali diizopropil azodikarboksilat. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo dodali še 0,5 ekvivalenta PPh_3 (0,40 g + 0,13 g, 2,0 mmol). Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli in med mešanjem po kapljicah dodali še 0,5 ekvivalenta diizopropil azodikarboksilata (300 μl + 100 μl , 2,0 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

Ostanek smo čistili s kolonsko kromatografijo v mobilni fazi $\text{EtOAc/Hex} = 1/1$, vendar nam ni uspelo ločiti v ostanku reakcijske zmesi prisotnih spojin.

4.4.2. Sinteza 2-(3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoi)fenoksi)etilamino)(iminio)metanaminijevega 2,2,2-trifluoro acetata



4.4.2.1. Sinteza *terc*-butil 2-(3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoi) fenoksi)etilkarbamata (spojina 14) (33)

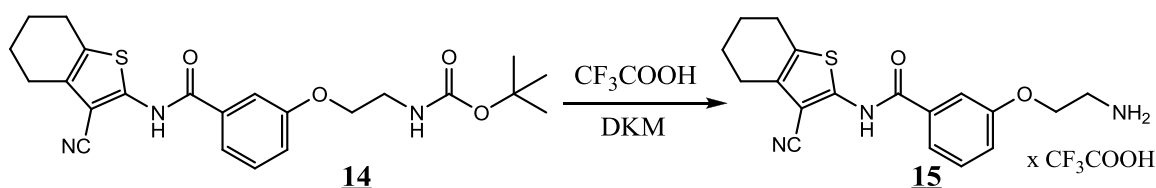


Spojino 4 (1,00 g, 3,4 mmol) smo raztopili v DMF (5 ml), dodali K_2CO_3 (1,39 g, 10,1 mmol) in mešali 10 minut. Dodali smo 2-(*Boc*-amino)etil bromid (0,83 g, 3,7 mmol) in mešali čez noč pri temperaturi 50°C. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

Ostanek smo raztopili v EtOAc (60 ml). Organsko fazo smo spirali z vodo (2x 30 ml), 1M NaOH (2x 10 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1x 20 ml). Sušili smo jo z Na_2SO_4 , sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Ostanek smo prekrizalizirali iz etanola.

terc-butil 2-(3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)karbamoil)fenoksi)etilkarbammat			M _r = 441,54	
Izgled:	beli kristali			
Rf:	0,49 (MF: EtOAc/Hex = 1/1)			
Tališče:	181 – 182 ⁰ C			
Izkoristek:	14%			
¹H – NMR (400MHz, CDCl₃)	δ = 1,48 (s, 9H, COO – (CH ₃) ₃); 1,83 – 1,93 (m, 4H, CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂); 2,62 – 2,73 (m, 4H, CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂); 3,59 (q, <i>J</i> = 5,1 Hz, 2H, NH – CH ₂ – CH ₂ – O); 4,12 (t, <i>J</i> = 5,1 Hz, 2H, NH – CH ₂ – CH ₂ – O); 5,03 (s, 1H, CO – NH – CH ₂); 7,13 – 7,18 (m, 1H, Ar – H); 7,44 – 7,50 (m, 3H, 3x Ar – H); 8,86 (s, 1H, CO – NH) ppm.			
¹³C - NMR (MHz, CDCl₃)	δ = 22,12; 23,10; 23,99; 28,40; 39,97; 67,49; 79,67; 94,14; 113,68; 114,54; 119,20; 119,46; 128,84; 130,17; 131,13; 133,30; 146,64; 155,89; 159,09; 163,43 ppm.			
ESI – HRMS	izračunano za C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₄ S (m/z):		442,1801 [M+H] ⁺	
	izmerjen (m/z):		442,1812	
IR (KBr)	3358, 3245, 3077, 2979, 2939, 2880, 2223, 1684, 1670, 1576, 1539, 1465, 1395, 1365, 1330, 1295, 1280, 1268, 1254, 1228, 1172, 1135, 1111, 1051 in 1001 cm ⁻¹			
Elementna analiza		% C	% H	% N
	izračunano za C ₂₃ H ₂₇ N ₃ O ₄ S	62,56	6,16	9,52
	ugotovljeno	62,34	6,23	9,42

4.4.2.2. Sinteza 2-(3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)etanaminijevega 2,2,2-trifluoroaceta (spojina **15**) (33)

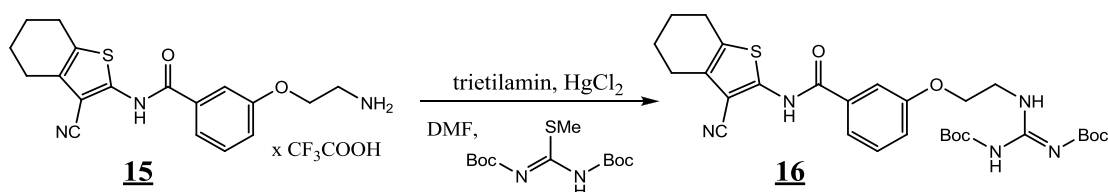


Spojino **14** (214 mg, 0,5 mmol) smo raztopili v diklorometanu (20 ml) in po kapljicah dodali trifluoroacetno kislino (1,0 ml, 13,1 mmol). Reakcijsko zmes smo 1 uro mešali pri sobni temperaturi. Konec reakcije smo preverili s TLC. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

Ostanek smo prekrystalizirali iz etanola.

2-(3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)etanaminijev 2,2,2-trifluoroacet			Mr = 455,45	
Izgled:	beli kristali			
Rf:	0,00 (MF: EtOAc/Hex = 1/1)			
Tališče:	158 – 160 ⁰ C			
Izkoristek:	76%			
¹ H – NMR (400 MHz, DMSO - d ₆)	δ = 1,73 – 1,84 (m, 4H, CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂); 2,54 – 2,67 (m, 4H, CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂); 3,25 – 3,31 (m, 2H, NH – CH ₂ – CH ₂ – O); 4,22 – 4,30 (m, 2H, NH – CH ₂ – CH ₂ – O); 7,25 – 7,31 (m, 1H, Ar – H); 7,50 – 7,57 (m, 2H, 2x Ar – H); 7,58 – 7,64 (m, 1H, Ar – H); 7,93 – 8,14 (bs, 3H, NH ₃ ⁺); 11,75 (bs, 1H, CF ₃ COOH) ppm.			
¹³ C – NMR (400 MHz, DMSO - d ₆)	δ = 21,67; 22,57; 23,45; 23,59; 38,32; 64,63; 96,29; 114,18; 114,30; 118,81; 121,07; 128,84; 129,82; 131,45; 133,80; 146,16; 157,74; 164,79 ppm.			
ESI – HRMS	izračunano za C ₂₀ H ₂₀ F ₃ N ₃ O ₄ S (m/z):		342,1276 [M+H] ⁺	
	izmerjen (m/z):		342,1277	
IR (KBr)	3434, 3235, 3195, 3080, 2936, 2220, 1669, 1576, 1559, 1511, 467, 1450, 1326, 1297, 1282, 1230, 1203, 1183, 1128, 1076 in 1025 cm ⁻¹			
Elementna analiza		% C	% H	% N
	izračunano za C ₁₈ H ₁₉ N ₃ O ₂ S × CF ₃ COOH	52,74	4,43	9,23
	ugotovljeno	52,56	4,22	9,13

4.4.2.3. Sinteza *terc*-butil (*terc*-butoksikarbonilamino)(2-(3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)etilamino)metilenkarbamata (spojina **16**) (33)

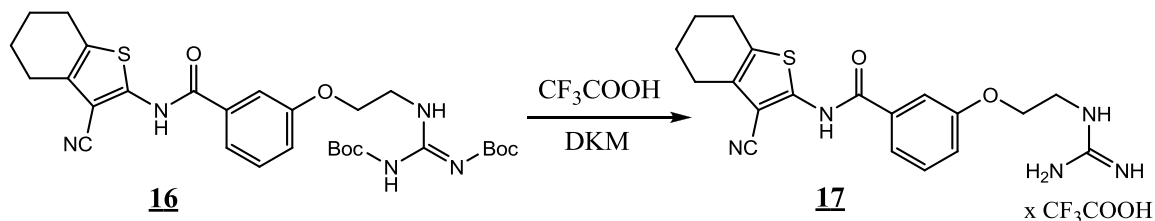


Spojino **15** (0,23 g, 0,5 mmol) smo raztopili v brezvodnem DMF (5 ml), dodali *N,N'*-di(*terc*-butoksikarbonil)-S-metilizotiosečnino (0,15 g, 0,5 mmol), trietilamin (0,1 ml, 1,0 mmol) in HgCl₂ (0,14 g, 0,5 mmol). Reakcijsko zmes smo čez noč mešali pri sobni temperaturi, jo filtrirali in filtratu odparili topilo pod znižanim tlakom.

Ostanek smo raztopili v EtOAc (20 ml). Organsko fazo smo spirali z vodo (3 x 20 ml), nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 x 15 ml) in nasičeno raztopino NaCl (2 x 10 ml). Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄, sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Čiščenje smo nadaljevali s kolonsko kromatografijo v mobilni fazi EtOAc/Hex = 1/4. Izbranim frakcijam smo odparili topilo pod znižanim tlakom. Ostanek smo raztopili v mobilni fazi (EtOAc/Hex = 1/4) in odnučali nastalo oborino.

<i>terc</i>-butil (<i>terc</i>-butoksikarbonilamino)(2-(3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-ilkarbamoi)fenoksi)etilamino) metilenkarbamat			Mr = 583,70	
Izgled:	beli kristali			
Rf:	0,63 (MF: Ea/Hex = 1/1)			
Tališče:	165 – 166 ⁰ C			
Izkoristek:	51%			
¹H – NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ = 1,53 (dd, <i>J</i> ₁ = 6,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,2 Hz, 16H, 2x (CH ₃) ₃); 1,81 – 1,94 (m, 4H, C – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – C); 2,61 – 2,74 (m, 4H, C – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – C); 3,90 (q, <i>J</i> = 5,3 Hz, 2H, NH – CH ₂ – CH ₂ – O); 4,20 (t, <i>J</i> = 5.2 Hz, 2H, NH – CH ₂ – CH ₂ – O); 7,18 – 7,27 (m, 1H, Ar – H); 7,41 – 7,50 (m, 2H, 2x Ar – H); 7,50 – 7,56 (m, 1H, Ar – H); 8,78 (t, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H, C – NH – CH ₂); 8,90 (s, 1H, CO – NH – C); 11,52 (s, 1H, C – NH – Boc) ppm.			
¹³C – NMR (400 MHz, aceton-<i>d</i>₆)	δ = 14,37; 22,92; 23,30; 23,83; 24,46; 24,68; 28,14; 28,47; 32,32; 40,70; 67,21; 79,02; 83,84; 96,29; 114,50; 114,93; 119,77; 121,46; 129,56; 130,78; 132,27; 135,00; 159,79 ppm.			
ESI – HRMS	izračunano za C ₂₉ H ₃₇ N ₅ O ₆ S (m/z):		584,2543 [M+H] ⁺	
	izmerjen (m/z):		584,2545	
IR (KBr)	3341, 3285, 3080, 2976, 2934, 2362, 2344, 2219, 1741, 1656, 1623, 1576, 1546, 1493, 1459, 1434, 1415, 1397, 1362, 1330, 1300, 1276, 1223, 1146, 1086, 1062, 1046 in 1027 cm ⁻¹			
Elementna analiza		% C	% H	% N
	izračunano za C ₂₉ H ₃₇ N ₅ O ₆ S x 0,9 H ₂ O	58,06	6,52	11,67
	ugotovljeno	58,33	6,44	11,27

4.4.2.4. Sinteza (2-(3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)etilamino)(iminio)metanaminijevega 2,2,2-trifluoroacetata (spojina **17**) (**33**)

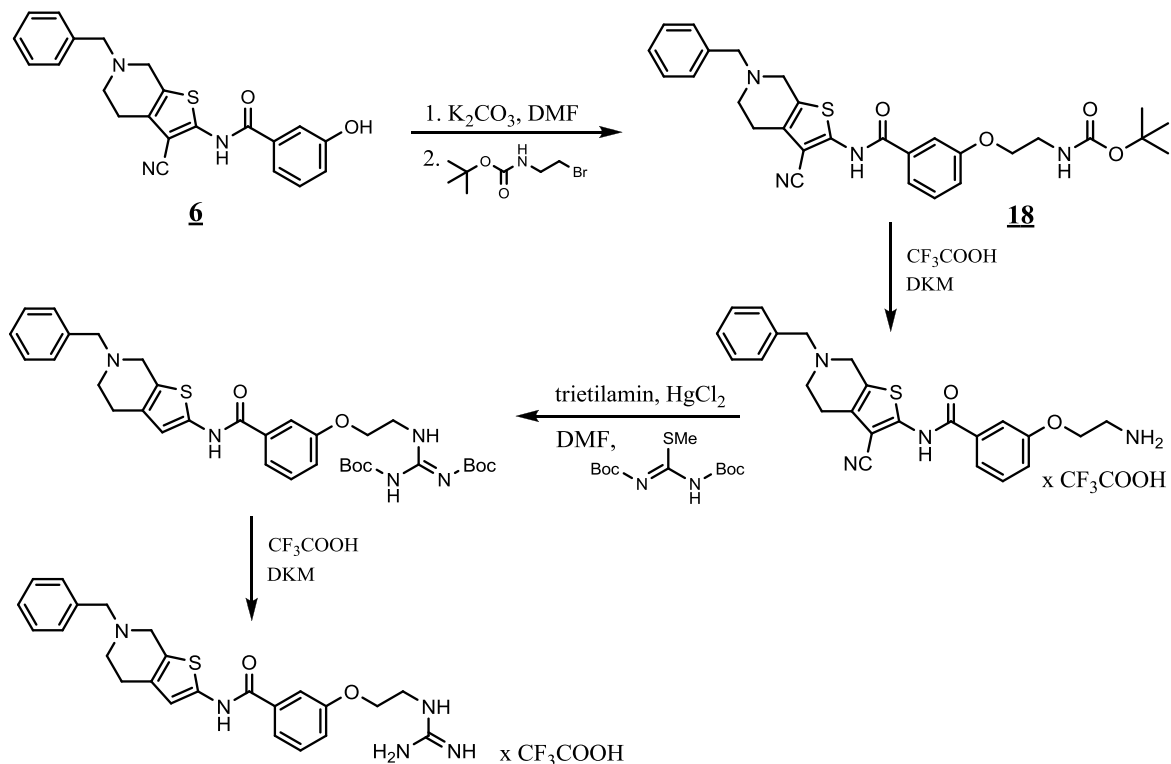


Spojino **16** (100 mg, 0,2 mmol) smo raztopili v diklorometanu (3 ml) in po kapljicah dodali trifluoroacetno kislino (400 μl , 5,2 mmol). Reakcijsko zmes smo 1 uro in 45 minut mešali pri sobni temperaturi. Konec reakcije smo preverili s TLC. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

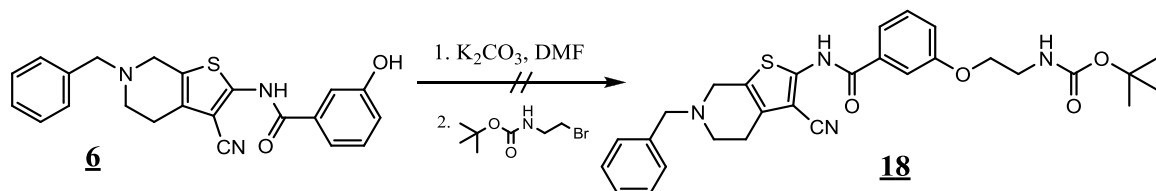
Ostanek smo prekrystalizirali iz etanola.

(2-(3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)etilamino)(iminio)metanaminijev 2,2,2-trifluoroacetat		Mr = 611,51
Izgled:	beli kristali	
Rf:	0,00 (MF: EtOAc/Hex = 1/1)	
Tališče:	179 – 181 ⁰ C	
Izkoristek:	86%	
¹H – NMR (400 MHz, acetone-d₆)	δ = 1,84 – 1,89 (m, 4H, C – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – C); 2,57 – 2,61 (m, 2H, C – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – C); 2,68 – 2,72 (m, 2H, C – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – CH ₂ – C); 3,78 – 3,83 (m, 2H, NH – CH ₂ – CH ₂ – O); 4,33 (t, J = 5,2 Hz, 2H, NH – CH ₂ – CH ₂ – O); 7,25 – 7,29 (m, 1H, Ar - H); 7,48 – 7,53 (m, 1H, Ar - H); 7,62 – 7,69 (m, 2H, 2x Ar - H); 7,79 (bs, 3H, C – NH ₃ ⁺); 8,68 (bs, 1H, NH); 10,72 (bs, 1H, NH) ppm.	
¹³C – NMR (400 MHz, acetone-d₆)	δ = 22,91; 23,82; 24,47; 24,68; 41,68; 41,79; 67,71; 96,50; 114,50; 114,94; 119,87; 121,62; 129,64; 130,74; 132,31; 135,02; 147,20; 159,52; 165,34 ppm.	
ESI – HRMS	izračunano za C ₂₃ H ₂₃ F ₆ N ₅ O ₆ S (m/z):	384,1494 [M+H] ⁺
	izmerjen (m/z):	384,1493
IR (KBr)	3425, 3366, 3179, 2936, 2855, 2363, 2344, 2225, 1674, 1579, 1558, 1454, 1397, 1326, 1304, 1272, 1206, 1186, 1134, 1063 in 1028 cm ⁻¹	
HPLC	t _R = 11,836 min, 98,16% (λ = 220nm), 100% (λ = 254nm)	

4.4.3. Sinteza *N*-(6-benzil-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridin-2-il)-3-(2-guanidinoetoksi)benzamid 2,2,2-trifluoroacetata



4.4.3.1. Poskus sinteze terc-butil 2-(3-(6-benzil-3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridin-2-ilkarbamoil)fenoksi)etilkarbamata (spojina **18**)



Spojino **6** (0,73 g, 1,9 mmol) smo raztopili v DMF (10 ml), dodali K_2CO_3 in mešali 10 minut. Dodali smo še 1 ekvivalent K_2CO_3 (0,52 g + 0,26 g, 5,6 mmol) in mešali še 20 minut. Reakcijski zmesi smo dodali 2 – (Boc – amino)etil bromid in mešali čez noč pri sobni temperaturi. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom.

Ostanek smo raztopili v EtOAc (25 ml). Organsko fazo smo spirali z vodo (2x 10 ml), 1M NaOH (2x 10 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1x 15 ml). Sušili smo jo z Na_2SO_4 , sušilno sredstvo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Čiščenje spojine **18** smo nadaljevali s kolonsko kromatografijo v mobilni fazi EtOAc/Hex = 1/4. Posnet 1H – NMR spekter je pokazal, da smo izolirali reagent 2-(Boc-amino)etil bromid. Reakcija ni potekla.

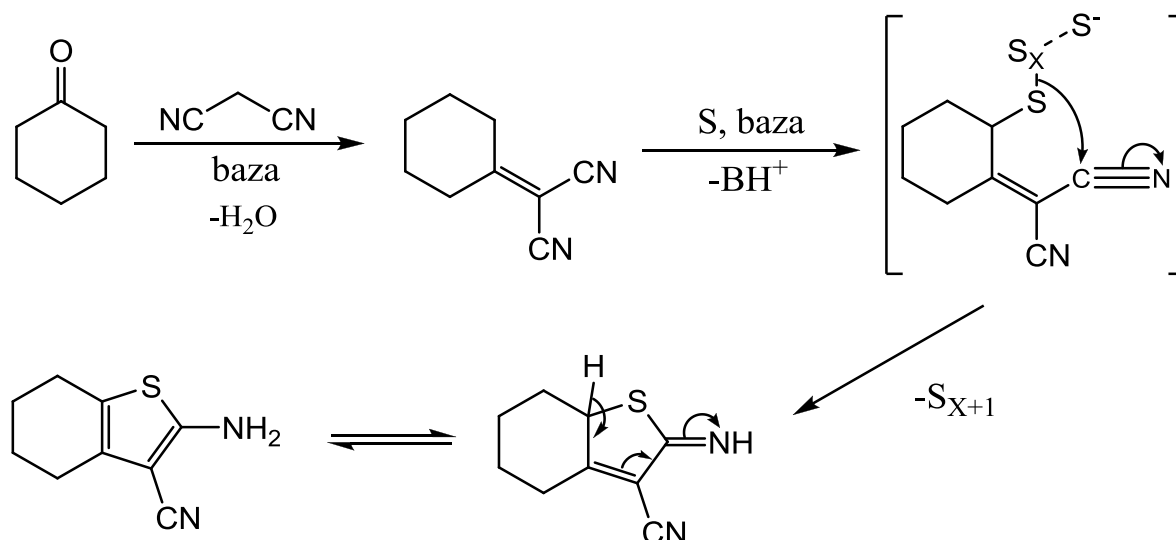
5. Rezultati in razprava

5.1. Komentar sinteznih postopkov

Osnovni skelet (spojino **4**) smo sintetizirali v štirih korakih. V prvem koraku smo hidroksilno skupino 3-hidroksibenzojske kisline zaščitili, tako da smo jo pretvorili v acetat z acetanhidridom v prisotnosti piridina. Reakcija sinteze spojine **1** poteče po mehanizmu bazično katalizirane polarne adicije na karboksilno skupino, pri čemer piridin kot baza deprotonira fenolno hidroksilno skupino in s tem poveča njeno nukleofilnost (36). V drugem koraku smo pripravili cianotiofenski fragment (spojino **2**) iz cikloheksanona, malononitrila in elementarnega žvepla z Gewaldovo sintezo (opisana spodaj). V tretjem koraku smo karboksilno skupino spojine **1** pretvorili v kislinski klorid v prisotnosti prebitnega oksalil klorida (3 molarne ekvivalente glede na kislino) in DMF, ki učinkuje kot katalizator. Nastali kislinski klorid smo nato brez čiščenja uporabili za tvorbo amidne vezi s spojino **2** v prisotnosti piridina, ki nevtralizira pri reakciji nastalo HCl. Tvorba amidne vezi (N-aciliranje) poteče po mehanizmu nukleofilne substitucije preko tetraedričnega intermediata. Na koncu smo spojini **3** odstranili acetilno zaščito s K_2CO_3 v metanolu.

5.1.1. Gewaldova sinteza substituiranih tiofenov

Pri Gewaldovi sintezi iz ketona, acetonitrila in elementarnega žvepla v prisotnosti baze sintetiziramo substituirane tiofene. Med cikloheksanonom in malononitrilom poteče Knoevenagelova kondenzacija. Nato poteče adicija žvepla na nastali α,β -nenasičen nitril in ciklizacija (Slika 11). Točen mehanizem adicije žvepla in ciklizacije še ni znan. Prisotnost baze, ki je v našem primeru morfolin, je nujna za odcepitev protona pri Knoevenagelovi kondenzaciji in aktivacijo elementarnega žvepla. Kot topilo smo uporabili etanol, saj polarna topila (etanol, metanol, DMF, 1,4-dioksan) pospešijo kondenzacijo žvepla na nitrilni intermediat in reakcijo ciklizacije (37).



Slika 11: Mehanizem Gewaldove sinteze substituiranih tiofenov (37).

5.1.2. Komentar sinteze etrskih derivatov z Williamsonovo sintezo etrov

Prvo skupino etrskih derivatov (spojine **7** – **9**) smo sintetizirali po mehanizmu Williamsonove sinteze etrov. Z bazo smo odcepili proton s hidroksilne skupine spojine **4**. Nato med nastalim alkoksidnim ionom in benzilhalidnim derivatom poteče nukleofilna substitucija po $\text{S}_{\text{N}}2$ mehanizmu. Kot topilo pri reakciji smo uporabili DMF. Kot bazo pa cezijev karbonat, ker je v organskih topilih boljše topen od natrijevega in kalijevega karbonata (38, 39).

Spojina **7** je bila načrtovana kot benzilni eter osnovnega cianotiofenskega skeleta. Vendar je reakcija nukleofilne substitucije potekla tudi na amidnem dušiku. Ker sta tudi po zmanjšanju dodanega cezijevega karbonata, s prvotnih 3 ekvivalentov na 0,9 ekvivalenta glede na spojino **4**, potekli obe substituciji, smo kot spojino **7** ovrednotili derivat z obema benzilnima substituentama.

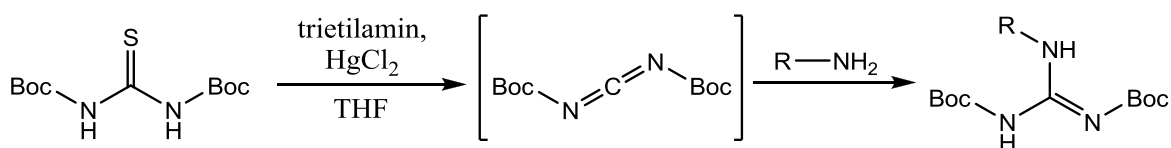
5.1.3. Komentar sinteze etrskih derivatov z Mitsunobujevo sintezo

Drugo skupino etrskih derivatov (spojine **10** – **13**) smo sintetizirali po mehanizmu Mitsunobu reakcije. PPh_3 in diizopropil azodikarboksilat (DIAD) omogočata reakcijo, ki v osnovi poteka po $\text{S}_{\text{N}}2$ mehanizmu (39). Ker pri reakciji nastaja precej stranskih produktov (poleg POPh_3 , sta možna še produkta vezave DIAD z alkoholnim in fenolnim derivatom), smo imeli veliko težav pri čiščenju spojin.

5.1.4. Komentar sinteze etilaminskih in etilgvanidinskih derivatov

Etilaminska derivata (spojini **15** in **18**) smo sintetizirali z reakcijo nukleofilne substitucije med spojinama **4** in **6**, ter komercialno dostopnim 2-(Boc-amino)etil bromidom po S_N2 mehanizmu. Vendar sinteza spojine **18** ni uspela. Za pripravo alkoksidnega iona smo uporabili kalijev karbonat in DMF kot topilo. Zaščiteno obliko amina smo uporabili, ker bi tudi na njej lahko potekla nukleofilna substitucija. Produktu reakcije s spojino **4** (spojina **14**) smo s trifluorocetno kislino odstranili zaščitno skupino in nastalo spojino **15** biokemijsko ovrednotili.

Gvanidinski derivat (spojina **17**) smo sintetizirali iz etilaminskega derivata (spojina **15**) in S-metil-di-Boc-izotiosečnine v prisotnosti katalizatorja (živosrebrov(II) klorid) in baze (trietilamina). Živosrebrov(II) klorid aktivira izotiosečnino, trietilamin pa pospeši izstop žvepla iz izotiosečnine. Nukleofilna aminska skupina etilaminskega derivata nato napade centralni ogljikov atom karbodiimidnega intermedata, ki zaradi hitrega poteka reakcije pri teh pogojih še ni bil izoliran (40, 41).



Slika 12: Shema sinteze gvanidina (40, 41).

Produktu (spojina **16**) smo s trifluorocetno kislino odstranili zaščitno skupino in nastalo spojino **17** biokemijsko ovrednotili.

5.2. Rezultati testiranja

Sintetiziranim spojinam smo z uporabo testa na osnovi barvila malahitno zeleno določili zaviralno delovanje na ligazi MurF iz *S. pneumoniae* in *E. coli*. Rezultate smo podali z rezidualno aktivnostjo (RA), ki predstavlja razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti zaviralca in aktivnostjo encima kontrolne meritve, ki ne vsebuje zaviralca. Najaktivnejšima spojinama smo določili še IC₅₀ vrednost, ki predstavljajo koncentracijo spojine, pri kateri je rezidualna aktivnost 50 %. Spojinama **6** in **17** smo določili tudi protibakterijsko delovanje na sevih *S. aureus* in *E. coli*.

Tabela 3: Rezultati biokemijskega testiranja sintetiziranih spojin.

oznaka spojine	strukturna formula	RA (%) pri 100 μ M ali IC ₅₀ (μ M) MurF (<i>S. pneumoniae</i>)	RA (%) pri 100 μ M ali IC ₅₀ (μ M) MurF (<i>E. coli</i>)
5		76	91
6		65 IC ₅₀ = 341 μ M	83 IC ₅₀ = 289 μ M
7		95	100
8		96	97
10		81	99
15		98	93 (51% pri 500 μ M)
17		78 IC ₅₀ = 167 μ M	73 IC ₅₀ = 258 μ M

Tabela 4: Rezultati testiranja protibakterijske aktivnosti.

Spojina	MIK ($\mu\text{g/ml}$)						
	<i>S. aureus</i> SH1000 ^a	1411 ^b	1411 + PMBN ^e	AB734 ^b	AB734 + PMBN ^e	SM1411 ^c	ES100 ^d
6	>256	>256	>256	>256	>256	>256	>256
17	64	64	64	64	>256	16	16

Opomba: ^a reprezentativen sev bakterije *S. aureus*

^b reprezentativna seva bakterije *E. coli*, starševska seva SM1411 in ES100

^c hčerinski sev 1411, ki so mu odstranili *acrAB* gen za iztočno črpalko

^d hčerinski sev AB734, ki so mu odstranili *tolC* gen za iztočno črpalko

^e PMBN je okrajšava za polimiksin B nonapeptid

5.2.1. Komentar testiranja na izoliranem encimu MurF

Sintetizirana heterociklična etrska derivata (spojini **7** in **8**) nimata zaviralnega delovanja na testiranih MurF encimih ($\text{RA} \geq 95\%$). Izjema v seriji heterocikličnih etrskih derivatov je spojina **10**, ki ima skromen zaviralni učinek na MurF encim iz grampozitivne bakterije *S. pneumoniae* ($\text{RA} = 81\%$). Na amidni dušik vezan benzilni fragment (spojina **7**) najverjetneje ovira vezavo na encim in prepreči interakcije med molekulo in encimom. Glede na to da ima spojina **10**, ki ima edina šibko delovanje na tarčni encim, vezan petčlenski ciklični fragment (ciklopentan), predvidevamo, da so večji fragmenti s šestčlenskimi obroči preveliki za vezavno mesto fragmenta v encimu. Spojina **15** pri 100 μM nima zaviralnega učinka. Spojina **17** je najmočnejša sintetizirana spojina (IC_{50} za MurF_{Sp} je 167 μM in za MurF_{Ec} je 258 μM).

Ker nam sinteza etilaminskega derivata (spojina **18**) s podaljšanim osnovnim skeletom ni uspela, smo biokemijsko ovrednotili osnovni fragment z in brez acetilne zaščite fenolne hidroksilne skupine (spojini **5** in **6**). Obe izkazujeta šibko zaviralno delovanje na obeh testiranih MurF encimih (IC_{50} spojine **6** za MurF_{Sp} je 341 μM in za MurF_{Ec} je 289 μM), kar potrjuje ugodni vpliv podaljšanja osnovnega skeleta na zaviralno aktivnost inhibitorjev MurF. Zaradi nižjih IC_{50} vrednosti spojine **17** v primerjavi s spojino **6**, predvidevamo, da ima tvorba etra z ustreznimi fragmenti ugoden vpliv na vezavo na MurF encime.

5.2.2. Komentar testiranja protibakterijskega delovanja

Spojina **6** ne izkazuje protibakterijskega delovanja na nobenega od testiranih sevov. Ker je neučinkovita tudi pri testih s prisotnim polimiksin B nonapeptidom, ki poveča prepustnost zunanje membrane in sevih brez iztočnih črpalk, sklepamo, da razlog za pomanjkanje delovanja ni v njeni sposobnosti prehajanja v celice, ali odstranjevanje molekul iz nje. Predvidevamo, da je razlog prešibko zaviralno delovanje na tarčni encim, ali nespecifična vezava na proteinske strukture celic.

Spojina **17** ima zmerno protibakterijsko delovanje tako na bakterijo *S. aureus* (MIK = 64 µg/ml), kot na različne seve *E. coli* (MIK = 16 – 64 µg/ml). Zaradi nespremenjene oziroma slabše MIK v prisotnosti polimiksin B nonapeptida predvidevamo, da sposobnost prehajanja zunanje membrane ni razlog za šibko protibakterijsko delovanje. Izboljšanje MIK pri obeh sevih brez iztočnih črpalk nakazuje, da je tako protibakterijsko delovanje posledica delovanja iztočnih črpalk na spojino **17** v celici.

6. Zaključek

Razvoj in širjenje rezistence na protibakterijske učinkovine je resen problem moderne medicine. Zato je razumevanje delovanja ključnih in bakterijam specifičnih metabolnih sistemov ter razvoj novih skupin inhibitorjev zanje bistvenega pomena.

V diplomskem delu smo sintetizirali nove predstavnike cianotiofenske skupine zaviralcev MurF ligaze. Naš namen je bil preučiti vpliv zamenjave sulfonamidnega fragmenta z etrsko vezanimi heteroarilnimi fragmenti, etilamino ali etilgvanidinskimi fragmenti ter podaljšanja osnovnega skeleta na zaviralno delovanje na MurF ligazo.

Iz rezultatov biokemijskega testiranja je razvidno, da etrska derivata z benzilnima fragmentoma (spojini **7** in **8**) ne zavirata delovanja MurF ligaze. Spojina **10** s ciklopentanskim fragmentom, ki je strukturno najbolj podobna inhibitorju **6** (Slika 7), je edina s šibkim delovanjem v seriji s pripetimi heterocikličnimi fragmenti. Podaljšanje osnovnega skeleta pri spojini **6** je izboljšalo zaviralno delovanje. Spojina **17**, ki je najaktivnejša med sintetiziranimi, ima tudi zmerno protibakterijsko delovanje na grampozitivno bakterijo *S. aureus* in gramnegativno bakterijo *E. coli* (MIK = 64 µg/ml). Protibakterijsko delovanje na bakterijo *E. coli* se signifikantno izboljša (MIK = 16 µg/ml) pri sevih, ki so jim odstranili gen za iztočne črpalke.

Del rezultatov so objavili v članku *Design, synthesis and evaluation of second generation MurF inhibitors based on a cyanothiophene scaffold* (Hrast M, Anderluh M, Knez D, Randall CP, Barreateau H, O'Neill AJ, Blanot D, Gobec S, European Journal of Medicinal Chemistry 2014; 73: 83–96) (33).

Skupina etrskih derivatov predstavlja dobro izhodišče za nadaljnjo načrtovanje in optimizacijo potencialnih zaviralcev MurF ligaze s cianotiofenskim ogrodjem s potencialno širokospektralnim in protibakterijskim delovanjem.

7. Literatura

1. Foye WO, Lemke TL, Williams DA: Foye's principles of medicinal chemistry. 6th Edition, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008: 1028-1083.
2. Madigan MT, Martinko JM: Brock Biology of Microorganisms. 11th Edition, Pearson Prentice Hall, 2006: 6-7, 74-81, 139-140, 681-699.
3. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ: Rang and Dale's Pharmacology. 7th Edition, Churchill Livingstone, 2012: 609-621.
4. Tortora GJ, Funke BR, Case CL: Microbiology An Introduction. 5th Edition, The Benjamin/Cummings publishing Company, 1995: 77-82, 491-510.
5. Alanis AJ: Resistance to antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? Archives of Medical Research 2005; 36(6): 697-705.
6. Coates ARM, Halls G, Hu Y: Novel classes of antibiotics or more of the same? British Journal of Pharmacology 2011; 163(1): 184-194.
7. Wright GD: Antibiotics: A New Hope. Chemistry & Biology 2012; 19(1): 3-10.
8. Cooper GM, Hausman RE: The Cell A Molecular Approach. 4th Edition, Sinauer Associates, Inc., 2007: 569-571.
9. Smith CA, Wood EJ: Cell Biology. 2nd Edition, Chapman & Hall, 1996: 59-64.
10. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA: Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiology Reviews 2008; 32(2): 149-167.
11. Scheffers DJ, Pinho MG: Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. Microbiology and Molecular Biology Reviews 2005; 69(4): 585-607.
12. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. FEMS Microbiology Reviews 2008; 32(2): 168-207.
13. Smith CA: Structure, Function and Dynamics in the mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases. Journal of Molecular Biology 2006; 362(4): 640-655.
14. El Zoeiby A, Sanschagrin F, Levesque RC: Structure and function of the Mur enzymes: Development of novel inhibitors. Molecular Microbiology 2003; 47(1): 1-12.
15. Bouhss A, Trunkfield AE, Bugg TDH, Mengin-Lecreulx D: The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. FEMS Microbiology Reviews 2008; 32(2): 208-233.

16. Van Heijenoort J: Lipid Intermediates in the Biosynthesis of Bacterial Peptidoglycan. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 2007; 71(4): 620-635.
17. Mohammadi T, van Dam V, Sijbrand R, Vernet T, Zapun A, Bouhss A, Diepeveen-de bruin M, Mguyen-Disteché M, de Kruijff B, Breukink E: Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. *The EMBO Journal* 2011; 30(8): 1425-1432.
18. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P: The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 2008; 32(2): 234-258.
19. Longenecker KL, Stamper GF, Hajduk AJ, Fry EH, Jakob CG, Harlan JE, Edalji R, Bartley DM, Walter KA, Solomon LR, Holzman TF, GU YG, Lerner CG, Beutel BA, Stoll VS: Structure of MurF from *Streptococcus pneumoniae* co-crystallized with a small molecule inhibitor exhibits interdomain closure. *Protein Science* 2005; 14(12): 3039-3047.
20. Yan Y, Munshi S, Leiting B, Anderson MS, Chrzas J, Chen Z: Crystal Structure of *Escherichia coli* UDP-MurNAc-tripeptide D-alanyl-D-alanine-adding Enzyme (MurF) at 2.3 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology* 2000; 304(3): 435-445.
21. Favini-Stabile S, Contreras-Martel C, Thielens N, Dessen A: MreB and MurG as scaffolds for the cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *Environmental Microbiology* 2013; 15(12): 3218-3228.
22. Healy VL, Lessard IAD, Roper DI, Knox JR, Walsh CT: Vancomycin resistance in enterococci: reprogramming of the D-Ala-D-Ala ligases in bacterial peptidoglycan biosynthesis. *Chemistry & Biology* 2000; 7(5): 109-119.
23. Yan Y, Munshi S, Leiting B, Anderson MS, Chrzas J, Chen Z: Crystal structure of *Escherichia coli* UDPMurNAc-tripeptide D-alanyl-D-alanine-adding enzyme (MurF) at 2.3 angstrom resolution. 2000 (2. 4. 2014); dostopno na: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1GG4>
24. Hrast M, Turk S, Sosič I, Knez D, Randall CP, Barreateau H, Contreras-Martel C, Dessen A, O'Neill AJ, Mengin-Lecreulx D, Blanot D, Gobec S: Crystal structure of MurF ligase in complex with cyanothiphenic inhibitor. 2013 (2. 4. 2014); dostopno na: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=3ZM6>
25. Comess KM, Schurdak ME, Voorbach MJ, Coen M, Trumbull JD, Yang H, Gao L, Tang H, Cheng X, Lerner CG, McCall JM, Burns DJ, Beutel BA: An Ultraefficient

- Affinity-Based High-Throughput Screening Process: Application to Bacterial Cell Wall Biosynthesis Enzyme MurF. *Journal of Biomolecular Screening* 2006; 11(7): 743-754.
26. Stamper GF, Longenecker KL, Fry EH, Jakob KG, Florjancic AS, Gu YG, Anderson DD, Cooper CS, Zhang T, Clark RF, Cia Y, Black-Schaefer CL, McCall JO, Lerner CG, Hajduk PJ, Beutel BA, Stoll VS: Structure-based Optimization of MurF Inhibitors. *Chemical Biology & Drug Design* 2006; 67(1): 58-65.
 27. Gu YG, Florjancic AS, Clark RF, Zhang T, Cooper CS, Anderson DD, Lerner CG, McCall JO, Cia Y, Black-Schaefer CL, Stamper GF, Hajduk PJ, Beutel BA: Structure–activity relationships of novel potent MurF inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2004; 14(1): 267-270.
 28. Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Abbanat D, Foleno B, Maden A, Goldschmidt R, Bush K: Utility of Muropeptide Ligase for Identification of Inhibitors of the Cell Wall Biosynthesis Enzyme MurF. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2006; 50(1): 230-236.
 29. Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Klinger A, Foleno BD, Turchi I, Macielag M, Bush K: A MurF Inhibitor That Disrupts Cell Wall Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2007; 51(12): 4420-4426.
 30. Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Foleno BD, Simon LD, Guillemont J, Macielag M, Bush K: MurF Inhibitors with Antibacterial Activity: Effect on Muropeptide Levels. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2009; 53(8): 3240-3247.
 31. Turk S, Kovač A, Boniface A, Bostock JM, Chopra I, Blanot D, Gobec S: Discovery of new inhibitors of the bacterial peptidoglycan biosynthesis enzymes MurD and MurF by structure-based virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2009; 17(5): 1884-1889.
 32. Hrast M, Turk S, Sosič I, Knez D, Randall CP, Barreteau H, Contreras-Martel C, Dessen A, O'Neill AJ, Mengin-Lecreulx D, Blanot D, Gobec S: Structure-activity relationships of new cyanothiophene inhibitors of the essential peptidoglycan biosynthesis enzyme MurF. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 66: 32-45.
 33. Hrast M, Anderluh M, Knez D, Randall CP, Barreteau H, O'Neill AJ, Blanot D, Gobec S: Design, synthesis and evaluation of second generation MurF inhibitors

- based on a cyanothiophene scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 73: 83-96.
34. Yerlikaya Z, Aksoy S, Bayramli E: Structure and properties of fully aromatic thermotropic liquid-crystalline copolyesters containing m-hydroxybenzoic acid units. *Journal of Applied Polymer Science* 2003; 90(12): 3260-3269.
35. Sopbue Fondjo E, Döpp D, Henkel G: Reactions of some anellated 2-aminothiophenes with electron poor acetylenes. *Tetrahedron* 2006; 62(29): 7121-7131.
36. Tišler M: *Organska kemija*. Tretja, popravljena in dopolnjena izdaja, Državna založba Slovenija, Ljubljana, 1991: 193-250.
37. Puterova Z, Krutošikova A, Vegh D: Gewald reaction: synthesis, properties and applications of substituted 2-aminothiophenes. *ARKIVOC* 2010; 2010(1): 209-46.
38. Solomons TWG, Fryhle CB: *Organic chemistry*. 9th Edition John Wiley & Sons, Inc., 2007: 489-490.
39. Smith MB: *March's Advanced Organic Chemistry*. 7th Edition, A John Wiley & Sons, New jersey, 2013: 459-487.
40. O'Donovan DH, Rozas I: A concise synthesis of asymmetrical *N,N'*-disubstituted guanidines. *Tetrahedron Letters* 2011, 52(32): 4117-4119.
41. Katritzky AR, Rogovoy BV: Recent developments in guanylation agents. *ARKIVOC* 2005, 2005(4): 49-87.