

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DAMIJAN KNEZ

**SINTEZA NOVIH CIANOTIOFENSKIH ZAVIRALCEV
BAKTERIJSKEGA ENCIMA MURF**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2013

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DAMIJAN KNEZ

**SINTEZA NOVIH CIANOTIOFENSKIH ZAVIRALCEV
BAKTERIJSKEGA ENCIMA MURF**

**SYNTHESIS OF NEW CYANOTHIOPHENE INHIBITORS
OF BACTERIAL ENZYME MURF**

Ljubljana, 2013

Magistrsko nalogo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, 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.

Zahvala

Zahvaljujem se prof. dr. Stanislavu Gobcu, mag. farm., in asist. dr. Martini Hrast, mag. farm., za strokovno pomoč in nasvete pri magistrskem delu.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim kolegom na Katedri za farmacevtsko kemijo, ki so mi pri izdelavi magistrske naloge kakorkoli pomagali.

Na koncu bi se zahvalil še moji družini in prijateljem za podporo in pomoč v času študija.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelal pod vodstvom mentorja prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm., in somentorice asist. dr. Martine Hrast, mag. farm.

Damijan Knez

Ljubljana, 2013

VSEBINA

1. UVOD.....	1
1.1. Kemoterapevtiki.....	1
1.2. Odpornost bakterij na protibakterijske zdravilne učinkovine.....	1
1.2.1. Biološki mehanizmi odpornosti.....	2
1.2.2. Razvoj novih protibakterijskih učinkovin.....	3
1.3. Celična stena.....	4
1.3.1. Gram-pozitivne bakterije.....	4
1.3.2. Gram-negativne bakterije.....	5
1.4. Peptidoglikan.....	6
1.4.1. Biosinteza peptidoglikana.....	7
1.5. Mur ligaze.....	9
1.5.1. MurF.....	10
1.5.2. Zaviralci MurF.....	12
2. NAMEN DELA.....	15
3. MATERIALI IN METODE.....	17
3.1. Materiali.....	17
3.2. Metode.....	17
4. EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ.....	20
4.1. Sinteza 2,4-dikloro-5-(klorosulfonyl)benzojske kisline (2a).....	20
4.2. Sinteza cianotiofenov (3a–d).....	21
4.2.1. Sinteza 4-(4-oksocikloheksil)fenil acetata (2b).....	22
4.2.2. Sinteza 4-(4-metoksifenil)cikloheksanona (2c).....	22
4.2.3. Sinteza 8-(4-nitrofenil)-1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekana (2d).....	23
4.2.4. Sinteza 1-(4-nitrofenil)piperidin-4-ona (2e).....	23
4.3. Splošni postopek sinteze aminotiofenov 3a–d	24
4.4. Sinteza sulfonamidnih derivatov.....	26
4.4.1. Splošni postopek sinteze spojin 4a–e in 2f	26
4.4.2. Sinteza 2,4-dikloro-5-(4-oksopiperidin-1-ilsulfonyl)benzojske kisline (4f)..	31
4.4.3. Sinteza 2,4-dikloro-5-(3-oksopiperazin-1-ilsulfonyl)benzojske kisline (4g).	32
4.5. Splošni postopek sinteze spojin 5a–g	33

4.5.1.	Sinteza 2,4-dikloro- <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-5-(4-hidroksipiperidin-1-ilsulfonyl)benzamida (5h).....	40
4.5.2.	Sinteza 2-(2,4-dikloro-5-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il karbamoil)fenilsulfonamido)etanamonijevega klorida (5i).....	41
4.5.3.	Sinteza 1-(2,4-dikloro-5-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il karbamoil)fenilsulfonyl)piperidin-4-karboksilne kisline (5j)	42
4.6.	Sinteza sulfonamidnih zaviralcev s substitucijo na mestu 6 nasičenega obroča aminotiofena (6b–d).....	43
4.6.1.	Sinteza 2,4-dikloro- <i>N</i> -(3-ciano-6-(4-hidroksifenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-5-(morfolinosulfonyl)benzamida (1c).....	46
4.7.	Sinteza etrskih derivatov cianotiofenov (13a–b , 14a–b , 15–16).....	47
4.7.1.	Sinteza metil 2-kloro-5-hidroksibenzoata (8a) in metil 3-hidroksibenzoata (8b)	48
4.7.2.	Sinteza metil 3-(2-(<i>terc</i> -butoksikarbonilamino)propoksi)benzoata (9b) in metil 5-(2-(<i>terc</i> -butoksikarbonilamino)etoksi)-2-klorobenzoata (9a).....	49
4.7.3.	Sinteza 5-(2-(<i>terc</i> -butoksikarbonilamino)etoksi)-2-klorobenzojske kisline (10a) in 3-(2-(<i>terc</i> -butoksikarbonilamino)propoksi)benzojske kisline (10b)	50
4.7.4.	Sinteza 2-(3-karboksi-4-klorofenoksi)etanamonijevega trifluoroacetata (11a) in 3-(3-karboksifenoksi)propan-1-amonijevega trifluoroacetata (11b).....	51
4.7.5.	Sinteza 2-kloro-5-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)etoksi)benzojske kisline (12a) in 3-(3-(2,2,2-trifluoroacetamido)propoksi)benzojske kisline (12b).....	51
4.7.6.	Sinteza 4-(2-(2-kloro-5-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)etoksi)benzamido)-3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-6-il)fenil acetata (13a) in <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-3-(3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-propoksi)benzamida (13b)	53
4.7.7.	Sinteza 5-(2-aminoetoksi)-2-kloro- <i>N</i> -(3-ciano-6-(4-hidroksifenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)benzamida (14a) in 3-(3-aminopropoksi)- <i>N</i> -(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)benzamida (14b)	54
4.7.8.	Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>terc</i> -butoksikarbonilamino)(2-(4-kloro-3-(3-ciano-6-(4-hidroksifenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)etilamino) metilen karbamata (15).....	56
4.7.9.	Sinteza 1-(2-(4-kloro-3-(3-ciano-6-(4-hidroksifenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-ilkarbamioil)fenoksi)etil)gvandinijevega klorida (16)	57
5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	58
5.1.	Komentar sinteznih postopkov.....	58
5.1.1.	Gewaldova sinteza spojin 3a–d	58
5.1.2.	Sinteza sulfonamidnih zaviralcev 5a–j	59

5.1.3. Sinteza etrskih derivatov 14a–b in 16	60
5.1.4. Sinteza gvanidina (15, 16).....	60
5.2. Rezultati in komentar biokemijskega vrednotenja.....	61
ZAKLJUČEK.....	66
LITERATURA.....	67

SLIKOVNO KAZALO

Slika 1: Celična stena G ⁺ bakterij	4
Slika 2: Celična stena G ⁻ bakterij	5
Slika 3: Zgradba osnovne disaharid-peptid monomerne enote peptidoglikana pri G ⁺ (L-Lys) oz. G ⁻ (m-A ₂ pm) bakteriji	6
Slika 4: Shema biosinteze peptidoglikana	8
Slika 5: Reakcijski mehanizem ligaz Mur	9
Slika 6: Reakcija, ki jo katalizira MurF (na mestu 3 je L-Lys značilen za G ⁺ bakterije) ...	11
Slika 7: 3D struktura MurF iz <i>S. pneumoniae</i> kokristalizirana s spojino 1b	11
Slika 8: Načrtovane spremembe na spojini 1b	15
Slika 9: Načrtovane spremembe spojine 1c	16
Slika 10: Struktura barvila malahit zeleno	19
Slika 11: Shema sinteze cianotiofenov	21
Slika 12: Sinteza sulfonamidnih derivatov	26
Slika 13: Sinteza zaviralcev s spremembami na mestu 6 aminotiofenov	43
Slika 14: Shema sinteze etrskih derivatov	47
Slika 15: Mehanizem Gewaldove sinteze 2-aminotiofenov	58
Slika 16: Demetilacija aril metil etra	59
Tabela I: Znani zaviralci MurF.....	14
Tabela II: Substituenti na nasičenem obroču aminotiofenov	21
Tabela III: Spremembe na sulfonamidni strani molekule	26
Tabela IV: Rezultati biokemijskega vrednotenja sulfonamidnih derivatov 1	62
Tabela V: Rezultati biokemijskega vrednotenja sulfonamidnih derivatov 2	63
Tabela VI: Rezultati biokemijskega vrednotenja etrskih derivatov	64
Tabela VII: Protibakterijska aktivnost spojin 14a in 16	65

POVZETEK

Razvoj bakterijske odpornosti na številne protibakterijske zdravilne učinkovine in postopno povečevanje hudih bakterijskih infekcij postavljata zahtevo po razvoju novih protibakterijskih učinkovin. Velik potencial za razvoj novih učinkovin predstavljajo encimi, ki sodelujejo pri znotrajceličnih stopnjah biosinteze peptidoglikana, saj bi bili zaviralci teh encimov širokospektralni in baktericidni.

V magistrski nalogi smo se usmerili v sintezo novih cianotiofenskih zaviralcev od ATP odvisne ligaze MurF, ki katalizira pripajanje dipeptida D-Ala-D-Ala na rastočo peptidno verigo monomernega gradnika peptidoglikana. Zaviralce smo načrtovali na osnovi strukture že znanih zaviralcev, pripravljenih v družbi Abbott. Najprej smo zamenjali morfolinski obroč z različnimi amini in sintetizirali devet novih zaviralcev MurF iz bakterije *Streptococcus pneumoniae*. Nato smo spremenili fragment, vezan na cianotiofenski del molekule in pripravili še tri dodatne zaviralce MurF. Nazadnje smo načrtovali in sintetizirali etrske derivate z namenom širjenja spektra delovanja zaviralcev na MurF iz drugih bakterij in izboljšanja protibakterijske učinkovitosti spojin.

Z zamenjavo substituenta na sulfonamidu smo dobili dva zaviralca, ki sta delovala bolje kot izhodna Abbottova spojina **1b** (IC_{50} : **1b** = 4 μ M; **5f** = 3,37 μ M; **5b** = 3,75 μ M). V nizkem mikromolarnem območju sta MurF zavirala še dva derivata (IC_{50} : **5h** = 10,45 μ M; **5b** = 17,9 μ M). Kot odlična zaviralca sta se izkazala sulfonamidna derivata s spremenjenim cianotiofenskim skeletom **6b** in **6c** (IC_{50} za **6b** je 0,12 μ M in za **6c** 0,17 μ M). Etrski derivata **14a** in **16** sta delovala na MurF iz *S. pneumoniae* in *Escherichia coli*, hkrati pa sta pokazala tudi protibakterijsko delovanje na več sevov *E. coli* in na sev bakterije *Staphylococcus aureus* (minimalna inhibitorna koncentracija = 4–64 μ g/mL).

Etrski derivati predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnje načrtovanje in sintezo novih zaviralcev s širšim spekterom delovanja in izboljšano protibakterijsko aktivnostjo.

Ključne besede: cianotiofenski zaviralci, MurF, *Streptococcus pneumoniae*

ABSTRACT

Development of bacterial resistance to numerous antimicrobial agents and growing number of serious bacterial infections have raised an urgent need for development of new antibacterial agents. Enzymes that participate in intracellular steps of peptidoglycan biosynthesis have a great potential for development of new antimicrobial agents. Inhibitors of these enzymes have the potential to be bactericidal and have broad-spectrum activity.

In our work we synthesized new cyanothiophene inhibitors of ATP dependent MurF ligase, which catalyses the addition of dipeptide D-Ala-D-Ala to growing peptide chain on monomeric unit of peptidoglycan. We designed and synthesized a new series of inhibitors which are based on the compounds developed by Abbott. First, we replaced the morpholine moiety with different amines. Then, different substituents on 3-cyanothiophene ring were introduced. Twelve new inhibitors were synthesized and assayed for inhibition of MurF enzyme from *Streptococcus pneumoniae*. Furthermore, the antibacterial activities of these inhibitors were determined. Additionally, the ether derivatives were designed and synthesized in order to broaden the spectrum of inhibition also to MurF enzymes from other bacteria and to enhance antibacterial activity.

The variations of substituents on sulfonamide moiety did not bring significant enhancement of inhibitory activities, however, we prepared several inhibitors that were active in low micromolar range (IC_{50} for **5f** 3,37 μ M; for **5b** 3,75 μ M). The best inhibitors were compounds **6b** and **6c** with different substituent on 3-cyanothiophene ring which showed excellent inhibition of isolated MurF enzyme (IC_{50} 0,12 μ M and 0,17 μ M, respectively). In addition, ether derivatives **14a** and **16** inhibited MurFs from *S. pneumoniae* and *Escherichia coli*. Moreover, these compounds displayed antimicrobial effect on multiple strains of *E. coli* and on *Staphylococcus aureus* (minimal inhibitory concentrations = 4–64 μ g/mL).

Compounds with ether functional group represent a good basis for further development and design of inhibitors with broader spectrum of activity and improved antibacterial activity.

Keywords: cyanothiophene inhibitors, MurF, *Streptococcus pneumoniae*

SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozin difosfat
ATP	adenozin trifosfat
Ala	alanin
bs	širok singlet
C ₅₅ -P	undekaprenol fosfat
CDCl ₃	devteriran kloroform
CD ₃ OD	devteriran metanol
d	dublet
dd	dublet dubleta
ddd	dublet dubleta dubleta
dt	dublet tripleta
D-Ala-D-Ala	dipeptid D-alanil-D-alanin
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
Et ₃ N	<i>N,N,N</i> -trietylamin
EtOH	etanol
EtOAc	etil acetat
eq	molarni ekvivalent
G+	po Gramu pozitivne bakterije
G-	po Gramu negativne bakterije
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
GlmU	encim glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza in <i>N</i> -acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferaza
Glu	glutaminska kislina
Gly	glicin
Hex	<i>n</i> -heksan
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HRMS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
Hz	Hertz

IC ₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta v Hertzih
kat.	katalitična količina
Lac	laktat
lit.	literaturni podatek
Lys	lizin
<i>m</i> -A ₂ pm	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
m	multiplet
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
Mpl	muropeptidna ligaza
MraY	fosfo-MurNAc-pentapeptid translokaza
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruvil transferaza
MurB	UDP- <i>N</i> -acetenolpiruvilglukozamin reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat L-alanin ligaza
MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanil D-glutamat ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamil <i>m</i> -diaminopimelat/L-lizin ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat- <i>m</i> -diaminopimelat/L-lizin D-alanil-D-alanin ligaza
MurF _{SP}	encim MurF iz <i>Streptococcus pneumoniae</i>
MurF _{EC}	encim MurF iz <i>Escherichia coli</i>
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NMR	jedrska magnetna resonanca
p	pentet
PBP	penicilin vezoči proteini
P _i	anorganski fosfat
PMBN	polimiksin B nonapeptid
Py	piridin
q	kvartet
qd	kvartet dubleta

RA	rezidualna aktivnost
R _f	retencijski faktor
s	singlet
SAR	odnos med strukturo in delovanjem
Ser	serin
s.t.	sobna temperatura
t	triplet
td	triplet dubleta
tt	triplet tripleta
T _{tal}	temperatura tališča
TFA	trifluorocetna kislina
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija
t _r	retencijski čas
UDP	uridin difosfat
UTP	uridin trifosfat
UDP-GlcNAc	uridildifosfat- <i>N</i> -acetilglukozamin
UDP-MurNAc	uridildifosfat- <i>N</i> -acetilmuraminska kislina

1. UVOD

1.1. KEMOTERAPEVTIKI

Antibiotiki so produkti bakterij ali njihovi sintetični analogi, ki zavirajo rast in preživetje bakterij. Sintetične spojine, ki ne izhajajo iz naravnih produktov in imajo enako delovanje kot antibiotiki, imenujemo kemoterapevtiki. Izraz kemoterapevtiki se uporablja tudi v širšem pomenu in predstavlja obe predhodno omenjeni skupini zdravilnih učinkovin in se enači z izrazom protibakterijske zdravilne učinkovine. Te delujejo po temeljnem principu selektivne toksičnosti, ki izhaja iz strukturnih in biokemijskih razlik med mikroorganizmi in gostiteljem (človek, žival). Te spojine delujejo škodljivo za mikroorganizme, na gostitelja pa imajo minimalen toksičen vpliv (1, 2). Delimo jih lahko glede na njihovo kemijsko strukturo ali glede na njihov mehanizem delovanja. Po mehanizmu delovanja jih delimo na:

- zaviralce sinteze celične stene (β -laktami, glikopeptidi, ciklični lipopeptidi),
- zaviralce sinteze proteinov (aminoglikozidi, tetraciklini, makrolidi, kloramfenikol, klindamicin),
- zaviralce sinteze folne kisline (sulfonamidi, trimetoprim),
- zaviralce sinteze in funkcije nukleinskih kislin (fluorokinoloni, rifampicin),
- spojine, ki vplivajo na strukturo celične membrane (izoniazid),
- spojine z drugačnim mehanizmom delovanja (metronidazol, nitrofurantoin) (1, 3, 4).

1.2. ODPORNOST BAKTERIJ NA PROTIBAKTERIJSKE ZDRAVILNE UČINKOVINE

Prepoznavanje in terapija infekcijskih bolezni ter razvoj protibakterijskih zdravilnih učinkovin v 2. polovici 20. stoletja sta predstavljala velik napredek pri zmanjšanju obolelosti ter smrtnosti zaradi teh bolezni. Pojav resnih infekcij, ki jih povzročajo številne bakterije, odporne na splošno uporabljane protibakterijske zdravilne učinkovine, danes predstavlja resen svetovno-zdravstveni problem. Odpornost bakterij je bila sprva problem v bolnišnicah v povezavi s povečanjem števila bolnišničnih okužb predvsem med kritično bolnimi in imunsko oslabljenimi pacienti, danes pa je ta odpornost že široko razširjena v celotni družbi in povzroča resne infekcije, ki so težavne za identifikacijo in zdravljenje (4). Odpornost je lahko intrinzična – prisotna že pred izpostavitvijo zdravilu ali pridobljena in

se lahko razvije tako v laboratorijskem kot tudi v zunanjem okolju (1). Dejavniki tveganja za razvoj bakterijske odpornosti so pretirana in nesmiselna uporaba teh učinkovin bodisi v terapevtske ali profilaktične namene, njihova uporaba v prehrambeni industriji, daljše preživetje kritično obolelih pacientov, ki so dlje časa zdravljeni s temi zdravili in lahko zaradi tega predstavljajo rezervoar odpornih sevov bakterij ter daljša pričakovana življenjska doba in s tem povezana večja poraba antibiotikov pri starejših. Pridobljena odpornost se razvije po stiku bakterije s protibakterijsko zdravilno učinkovino v koncentracijah, ki za bakterijo niso toksične. Najpogostejši mehanizem za razvoj odpornosti je bakterijski prilagoditveni odziv kot posledica selektivnega pritiska zaradi prisotnosti zdravilne učinkovine, do razvoja odpornosti pa pride tudi zaradi spontane mutacije ob njeni odsotnosti.

Prenos informacije za odpornost med celicami poteka vertikalno ob celični delitvi ali horizontalno. Geni za odpornost – geni R se običajno nahajajo na specializiranem segmentu DNA, ki se imenuje transpozon, in omogočajo enostaven prehod genske informacije med posameznimi plazmidi (krožna izvenkromosomska oblika DNA) znotraj celice. Prenos genetskega materiala z zapisom za eno od oblik odpornosti lahko med celicami poteka horizontalno na tri različne načine:

- s konjugacijo, ki je najpomembnejši in najpogostejši način prenosa odpornosti med bakterijami (prenos preko plazmidov);
- s transformacijo (direkten privzem proste DNA iz okolja);
- s transdukcijo, ki poteka s pomočjo vektorja (najpogosteje bakteriofag) (4).

1.2.1. Biološki mehanizmi odpornosti

Mehanizmi, ki bakterijskim celicam omogočajo odpornost so:

- Encimska inaktivacija ali uničenje protibakterijske zdravilne učinkovine. Bakterija proizvaja encime, ki kemično spremenijo učinkovino, ta pa je v spremenjeni obliki za bakterijo nenevarna. Najbolj značilen primer so β -laktamaze, ki hidrolitsko inaktivirajo peniciline, cefalosporine in strukturno podobne spojine. Nekateri mikroorganizmi se branijo tudi z acetiltransferazami (inaktivacija aminoglikozidov in kloramfenikola) ali z esterazami, ki hidrolizirajo laktonski obroč makrolidov.
- Zmanjšana akumulacija zdravilne učinkovine v celici zaradi zmanjšane prehode v celico (manjša permeabilnost porinov pri G⁻ bakterijah) ali zaradi izčrpanja

učinkovine iz celice. Preko tega mehanizma so nekateri sevi bakterij razvili odpornost na tetracikline, makrolide in fluorokinolone.

- Sprememba celične tarče zdravilne učinkovine. Zaradi spremembe aminokislinskih ostankov v proteinskih molekulah, ki so tarče protibakterijskih učinkovin, pride do spremembe strukturne konformacije molekul proteinov, kar zmanjša vezavo antibiotika na tarčo in s tem tudi njegov učinek. Primer so strukturne spremembe penicilin vezočih proteinov, ki jih opazimo pri nekaterih na peniciline odpornih sevih bakterij. Tudi spremembe ribosomov in DNA giraze omogočijo bakterijam odpornost na aminoglikozide oziroma fluorokinolone (3, 4).

1.2.2. Razvoj novih protibakterijskih učinkovin

Od leta 1930 do 1962 so odkrili več kot 20 razredov protibakterijskih zdravilnih učinkovin z različnimi mehanizmi delovanja. Od takrat do leta 2010 pa so razvili le dva razreda zdravilnih učinkovin z novim načinom delovanja ter številne analoge učinkovin z že predhodno znanim delovanjem. Razvoj teh analogov je do danes še zadoščal za uspešno omejevanje in obvladovanje rezistentnih bakterij ter bakterijskih infekcij, vendar pa se vedno bolj kaže potreba po skupinah spojin, ki bodo zavirale in uničevale patogene z delovanjem na nove tarče. Nove tarče predstavljajo tudi znotrajcelične stopnje biosinteze peptidoglikana, ki je ključen za preživetje bakterij.

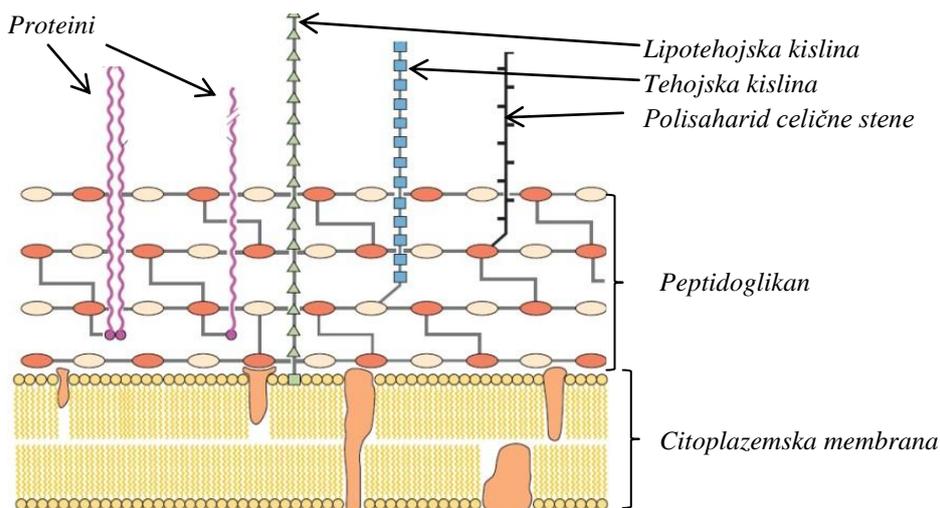
Potrebno je zbuditi zanimanje za razvoj novih protibakterijskih učinkovin, ki je v preteklosti upadlo predvsem zaradi finančne neuspešnosti tovrstnih učinkovin in zaradi težavnega in zahtevnega razvoja. Veliko nalogo pri tem pripisujejo predvsem državni podpori razvoju, ki bi spodbudila farmacevtska podjetja k raziskavam na tem področju. Pomembno vlogo pri razvoju lahko v prihodnosti predstavlja tudi akademska skupnost z aktivnim sodelovanjem v raziskavah novih učinkovin (4, 5).

1.3. CELIČNA STENA

Celična stena je kompleksna struktura, ki obdaja citoplazemsko membrano večine bakterijskih celic. Celici daje zunanjo obliko in rigidnost, vzdržuje osmotski tlak znotraj celice, sodeluje pri komunikaciji z zunanjim okoljem, ščiti celico pred zunanjimi dejavniki in služi kot mesto za vezavo proteinov in drugih zunajcitoplazemskih struktur. Specifična in ključna komponenta celične stene je peptidoglikan ali murein, ki pa je odsoten pri nekaterih bakterijah (*Mycoplasma*, *Plantomyces*). Bakterije lahko razdelimo v dve veliki skupini: G⁺ in G⁻ bakterije, ki se razlikujejo po barvanju po Gramu zaradi različne strukture celične stene. Te razlike v celični steni so pomembne tudi z vidika terapije in patogenosti bakterij (1, 6).

1.3.1. Gram-pozitivne bakterije

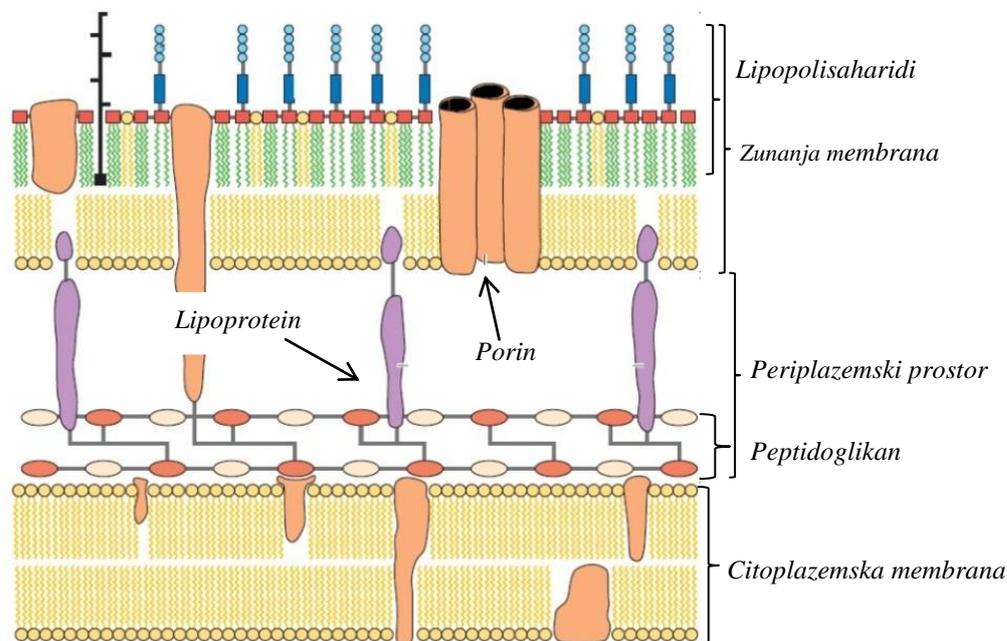
Celična stena G⁺ bakterij (slika 1) je sestavljena iz do 45 plasti polimernih molekul peptidoglikana, ki so med seboj prečno povezane s peptidnimi strukturami. Peptidoglikanska plast je debela od 15 do 85 nm ter predstavlja do 30 % suhe mase celične stene. Na celično steno so pripeti znanj značilni proteini, pomembna sestavina je tudi kisli polisaharid tehojska kislina, ki je lahko pripet na celično steno (tehojska kislina) ali na citoplazemsko membrano (lipotehojska kislina). Tehojska kislina je sestavljena iz monomernih enot glicerolfosfata oziroma ribitolfosfata, ki dajeta molekuli negativen naboj, s čimer ta vpliva na prehod ionov skozi celično steno (7, 8).



Slika 1: Celična stena G⁺ bakterij (prirejeno po (8))

1.3.2. Gram-negativne bakterije

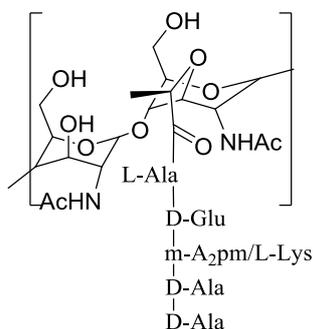
Celična stena G⁻ bakterij je v primerjavi s celično steno G⁺ bakterij bolj kompleksna in vsebuje večje količine lipofilnih sestavin. Bakterijske celice imajo običajno dodatno zunanjo membrano, ki se precej razlikuje od notranje – citoplazemske membrane (slika 2). Del zunanje membrane, ki je obrnjen proti okolici, sestavljajo lipopolisaharidi. Lipopolisaharidi so sestavljeni iz O-specifičnega polisaharida, jedrnega polisaharida in lipida A, ki deluje kot endotoksin po razpadu bakterijske celice. Zunanja membrana vsebuje številne encime in druge značilne proteinske molekule, ki predstavljajo do 50 % mase membrane. Najpomembnejši so transmembranski proteini porini sestavljeni iz dveh ali treh monomernih enot, ki tvorijo pore različnih velikosti. Nekateri porini omogočajo nespecifičen prehod manjših molekul, drugi pa vsebujejo posebna receptorska mesta, ki zagotavljajo prehod samo določenim substancam. Pod zunanjo membrano se nahaja periplazemski prostor z eno ali dvema plastema peptidoglikana debeline 2–7 nm. Sledi citoplazemska membrana bogata s fosfolipidi in membranskimi proteini, ki opravljajo različne funkcije. Zunanja membrana je vezana na peptidoglikan preko različnih lipoproteinov, ki jih najdemo v periplazmi (1, 7, 8).



Slika 2: Celična stena G⁻ bakterij (prirejeno po (8))

1.4. PEPTIDOGLIKAN

Peptidoglikan je kompleksen polimer sestavljen iz dolgih polisaharidnih (glikanskih) verig prečno povezanih s kratkimi peptidi. Polisaharidna veriga je sestavljena iz dveh izmenjujočih se sladkornih enot *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc), ki sta povezani z β -1-4 glikozidno vezjo. D-laktatna skupina vsake *N*-acetilmuraminske kisline je povezana s peptidno verigo, katere sestava je v nastajajočem peptidoglikanu najpogosteje L-Ala- γ -D-Glu-*m*-A₂pm/L-Lys-(*m*-A₂pm pri večini G⁻ bakterij, L-Lys pri G⁺ bakterijah)-D-Ala-D-Ala. Zadnji D-Ala ostanek se pri zreli molekuli peptidoglikana v celični steni odcepi (slika 3).



Slika 3: Zgradba osnovne disaharid-peptid monomerne enote peptidoglikana pri G⁺ (L-Lys) oz. G⁻ (*m*-A₂pm) bakteriji

Prečna povezava med polisaharidnimi verigami se običajno vzpostavi med peptidno karboksilno skupino aminokislinskega ostanka na mestu 4 in amino skupino diaminokislina na mestu 3 (*m*-A₂pm ali L-Lys) druge peptidne verige. Takšno povezavo imenujemo 3-4 povezava, druga večja skupina prečne povezave pa je povezava 2-4 med α -karboksilno skupino D-Glu na položaju 2 in karboksilno skupino D-Ala na položaju 4 druge peptidne podenote. Povezava je lahko direktna ali preko kratkega peptidnega mosta, ki ga lahko sestavljajo različni aminokislinski ostanki npr. Gly, L-Ala, L- ali D-Ser, L- ali D-Glu, D-ornitin. Peptidni most je lahko sestavljen iz enega do sedmih aminokislinskih ostankov. Pri veliki večini G⁻ bakterij je povezava direktna, pri G⁺ bakterijah pa poteka povezava preko interpeptidnega mostu npr. (Gly)₅ pri *Staphylococcus aureus* ali L-Ser-L-Ala oz. L-Ala-L-Ala pri *S. pneumoniae*. Prečno povezavo katalizira transpeptidazna domena na penicilin vezočih proteinih (6, 9).

1.4.1. Biosinteza peptidoglikana

Biosinteza peptidoglikana je zapleten proces, sestavljen iz okoli 20 reakcij, ki potekajo v citoplazmi ter na notranji in zunanji strani citoplazemske membrane. Citoplazemske stopnje sinteze lahko razdelimo v 4 skupine reakcij:

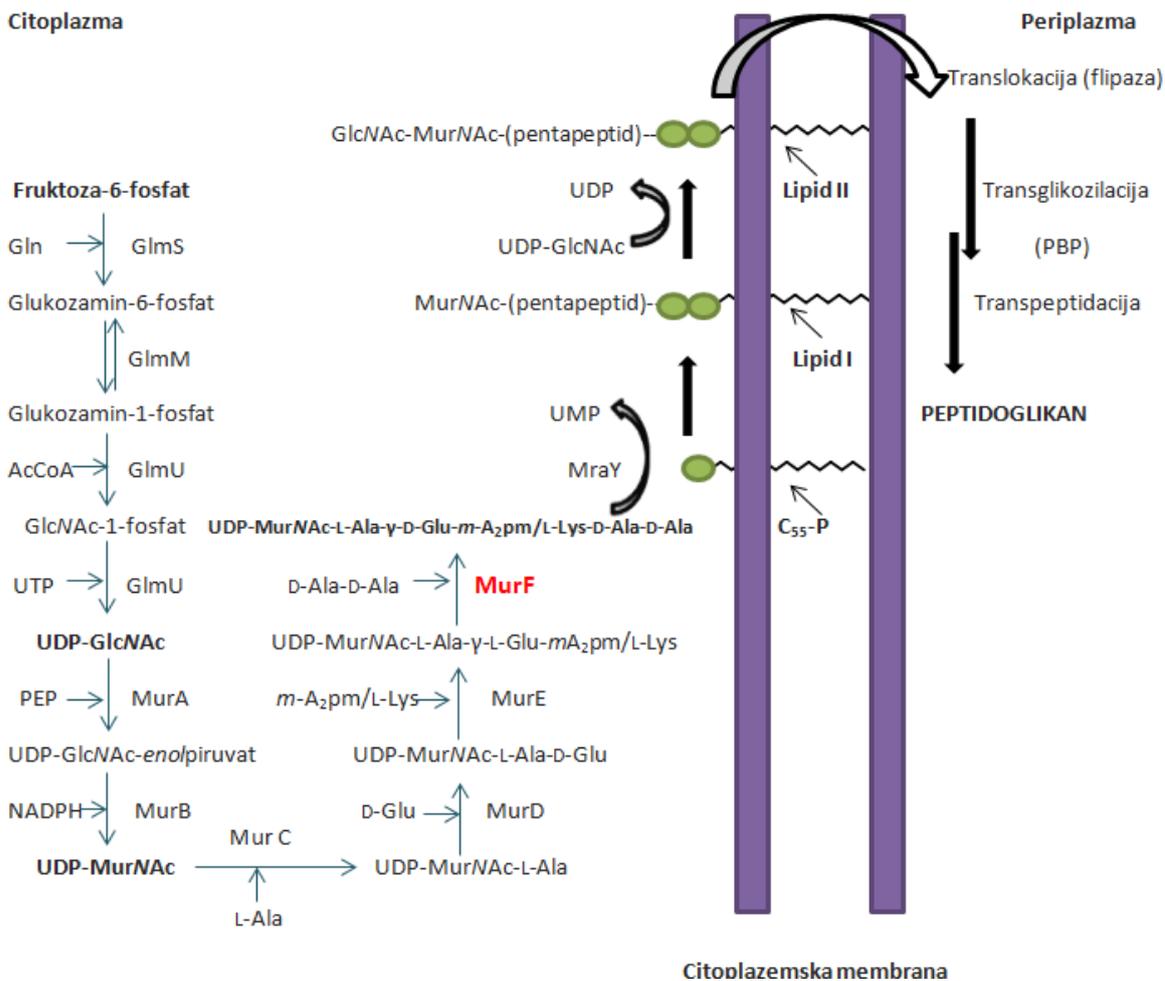
- sinteza UDP-GlcNAc iz fruktoze-6-fosfata,
- sinteza UDP-MurNAc iz UDP-GlcNAc,
- sinteza pentapeptidnega fragmenta na UDP-MurNAc,
- stranske reakcije za sintezo D-Glu in D-Ala-D-Ala dipeptida (9).

Iz D-fruktoze-6-fosfata nastane ob katalitski aktivnosti encima glukozamin-6-fosfat sintetaze (GlmS) D-glukozamin-6-fosfat. Slednji z encimom fosfoglukozamin mutazo (GlmM) izomerizira do D-glukozamin-1-fosfata, na katerega bifunkcionalen encim GlmU najprej prenese acetilno skupino ter nato še UDP. Kot donorja teh skupin delujeta acetilkoencim A in UTP. Na nastali uridildifosfat-*N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc) encim MurA prenese enolpiruvat iz fosfoenolpiruvata po adicijsko-eliminacijskem mehanizmu, kjer pride do odcepa fosfata. Flavoprotein MurB ob pomoči stehiometrično vezanega flavin adenin dinukleotida ter NADPH reducira vinilenol eter, pri čemer nastane uridildifosfat-*N*-acetilmuraminska kislina (UDP-MurNAc). Sinteza UDP-MurNAc pentapeptida poteka z Mur ligazami MurC, MurD, MurE in MurF, ki zaporedoma dodajajo na D-laktatno skupino aminokislino L-Ala, D-Glu, *m*-A₂pm ali L-Lys ter dipeptid D-Ala-D-Ala. Pri različnih bakterijah obstajajo razlike v sestavi pentapeptida, kar je lahko posledica vgradnje različnih aminokislin v nastajajočo verigo ali pa posledica sprememb nastalih po sintezi osnovnega pentapeptidnega dela molekule. Te spremembe lahko vplivajo tudi na manjšo ali večjo občutljivost določenih bakterij na nekatere protibakterijske zdravilne učinkovine. Vse opisane sintezne stopnje in encimi so specifični za bakterije in predstavljajo zaradi tega idealno tarčo za razvoj novih protibakterijskih učinkovin (4, 6, 9).

Po sintezi osnovnih fragmentov pride do pripetja fosfo-MurNAc-pentapeptida na undekaprenol fosfat (baktoprenol fosfat, C₅₅-P), nastane lipid I (C₅₅-PP-MurNAc-pentapeptid), ki je vezan na notranjo stran citoplazemske membrane. Nadalje se pripne GlcNAc, ki pride iz UDP-GlcNAc, na C4 hidroksi skupino lipida I, nastane lipid II. Ti dve reakciji katalizirata encima MraY (fosfo-MurNAc-pentapeptid translokaza) in MurG (UDP-GlcNAc : MurNAc-pirofosforil undekaprenol GlcNAc transferaza). Na nastalem lipidu II poteče večina modifikacij peptidne verige, kot so pripetje pentaglicinskega mostu

oziroma drugih povezovalnih fragmentov na mestu 3 peptidne verige; pogosto poteče tudi amidacija ali metilacija α -karboksilne skupine D-Glu na mestu 2 pentapeptida ali na ϵ -karboksilni skupini *m*-A₂pm (10).

Lipid II se prenese čez citoplazemsko membrano z encimom FtsW (flipaza) ali z nekaterimi drugimi encimi s podobno funkcijo. Na periplazemski strani se lipid II porabi kot substrat za sintezo peptidoglikanske makromolekule z različnimi PBP v reakcijah transglikozilacije in transpeptidacije (slika 4) (11, 12).

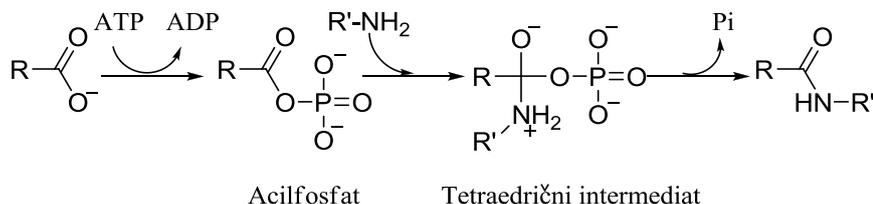


Slika 4: Shema biosinteze peptidoglikana (z rdečo je označen tarčni encim; prirejeno po (9, 13))

1.5. MUR LIGAZE

Stopenjsko sintezo peptidnega mostu peptidoglikana zagotavljajo štiri ključni bakterijski encimi poznani kot Mur ligaze (tudi Mur sintetaze). Zagotavljajo zaporedno pripajanje L-Ala (MurC), D-Glu (MurD), diaminokislina *m*-A₂pm ali L-Lys (MurE) in dipeptida D-Ala-D-Ala (MurF) na D-laktatno skupino UDP-MurNAc. Encim muropeptidna ligaza (Mpl) doda tripeptid L-Ala-γ-D-Glu-*m*-A₂pm neposredno na UDP-MurNAc pri ponovni uporabi gradnikov peptidoglikana in je neesencialen encim, ki ga najdemo samo pri nekaterih bakterijskih vrstah (9, 13).

Mur ligaze katalizirajo tvorbo amidne vezi ob hkratnem sproščanju ADP in P_i, ki izhajata iz ATP. Za potek reakcije je nujno potreben dvovalentni kation, ta je lahko Mg²⁺ ali Mn²⁺. Vse Mur ligaze imajo enak reakcijski mehanizem. Najprej poteka aktivacija karboksilne skupine UDP-prekursorja z ATP pri čemer nastane acilfosfatni intermediat in ADP. Acilfosfat napade nukleofilna amino skupina vstopajoče aminokislinske ali dipeptida. Ob nukleofilnem napadu pride do nastanka visokoenergijskega tetraedričnega intermediata, ki se nato razcepi do P_i in peptida (slika 5).



Slika 5: Reakcijski mehanizem ligaz Mur (prirejeno po (9, 13))

Poleg reakcijskega mehanizma je ligazam Mur skupnih tudi 6 aminokislinskih ostankov ohranjenih v vseh štirih ligazah ter značilno vezavno zaporedje za ATP. To je vodilo v uvrstitev ligaz Mur v novo družino encimov. V tej družini encimov so poleg teh tudi trije drugi encimi, ki nimajo povezave s sintezo peptidoglikana in sicer folilpoli-γ-L-glutamat sintetaza FolC, sintetaza C-terminalnega dela cianoficina CphA in poli-γ-glutamat sintetaza CapB.

Vse štiri ligaze imajo podobno tri-dimenzionalno strukturo oblikovano v treh domenah, kar so potrdile tudi kristalografske raziskave:

- N-terminalna domena (udeležena pri vezavi UDP-prekursorja),
- centralna domena (sodeluje pri vezavi ATP),
- C-terminalna domena (odgovorna za vezavo vstopajoče aminokislinske ali dipeptida).

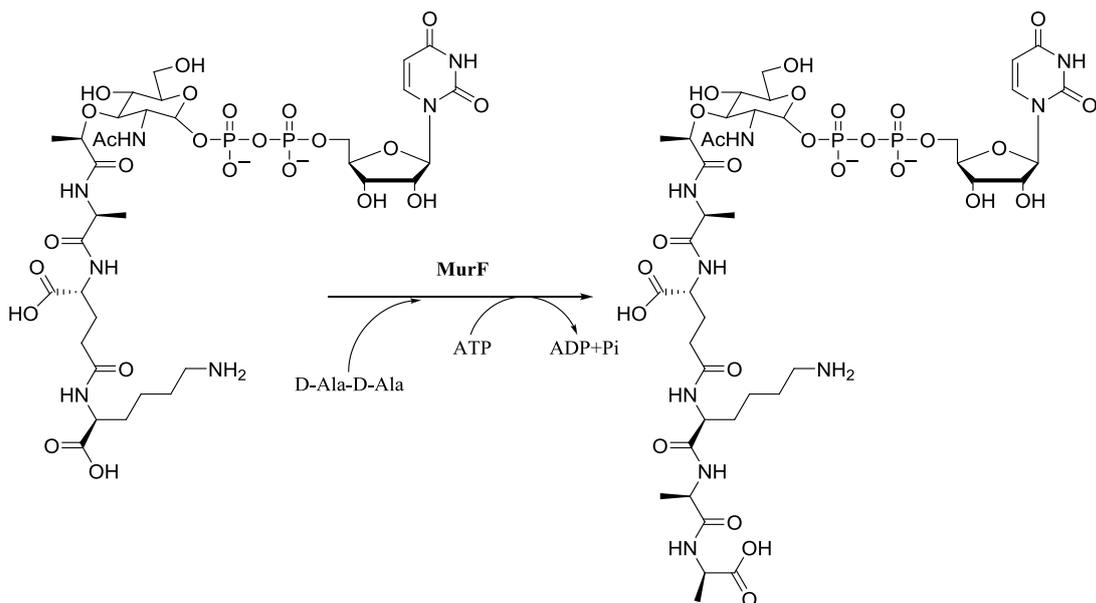
Topološko sta si centralna in C-terminalna domena podobni med vsemi Mur ligazami, do razlik pa prihaja predvsem pri N-terminalni domeni. N-terminalna domena MurC je podobna N-terminalni domeni MurD, obe pa se razlikujeta od N-domene MurE in MurF. Razlog za razlike v topološki strukturi je tudi različna dolžina peptidne verige pri UDP-substratu. Ti encimi obstajajo v odprti ali zaprti konformaciji, zaprte konformacije pa je povezano z vezavo ligandov (9).

Mur ligaze so ključni encimi pri citoplazemskih stopnjah biosinteze peptidoglikana in jih najdemo samo pri eubakterijah. Zaradi njihove odsotnosti pri človeku in živalih in njihove pomembnosti za preživetje bakterijskih celic ter njihove podobne topološke zgradbe med posameznimi bakterijami, bi bili zaviralci teh encimov baktericidni in širokospektralni (9, 13–15).

1.5.1. MurF

MurF ali UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanil-L-glutamil-*m*-diaminopimelat/L-lizin D-alanil-D-alanin ligaza je encim, ki na nastajajočo peptidno verigo pripne dipeptid in je edini poznani encim s takšno funkcijo. Najpogosteje kot dipeptid nastopa D-Ala-D-Ala (slika 6). Pri enterokokih odpornih na vankomicin (VRE), MurF namesto D-Ala-D-Ala vgrajuje dipeptid D-Ala-D-Ser ali depsipeptid D-Ala-D-Lac. Zaradi mehanizma delovanja vankomicina ima nastali pentapeptidni segment trikrat (tetrapeptid + D-Lac) oziroma enkrat (tetrapeptid + D-Ser) manjšo afiniteto do vankomicina. Sintezo alternativnega depsipeptida oziroma dipeptida zagotavljajo encimi iz družine D-Ala:D-X ligaz, ki imajo različno afiniteto do vstopajočih molekul (X = D-Ala, D-Ser ali D-Lac) (9, 14, 16).

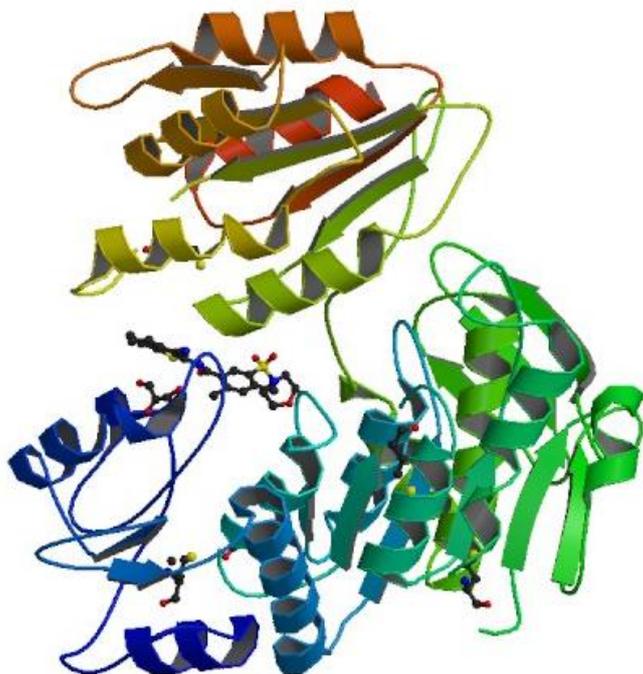
MurF najprej veže ATP, sledi sprememba konformacije, ki olajša vezavo UDP-MurNAc-tripeptida ter nazadnje vezava dipeptida. Pri encimu iz bakterije *E. coli* sta obe obliki UDP-MurNAc-tripeptida, ki vsebujeta *m*-A₂pm ali L-Lys, enako učinkoviti kot substrata za MurF. Specifičnost encima za dipeptidni substrat določena na *in vivo* sistemih ni pokazala točno definirane selektivnosti za posamezen D-Ala:D-X (X = D-Ala, D-Ser ali D-Lac) substrat. Raziskave na čistem izoliranem encimu pa so pokazale veliko specifičnost za C-terminalni del di/depsi-peptida. Ta specifičnost je komplementarna specifičnosti D-Ala:D-Ala ligaz, ki so specifične predvsem za N-terminalno aminokislino. Takšna komplementarnost zagotavlja, da se sinteza UDP-MurNAc-pentapeptida konča predvsem s pripajanjem D-alanil-D-alanina (9, 14).



Slika 6: Reakcija, ki jo katalizira MurF (na mestu 3 je L-Lys značilen za G^+ bakterije; prirejeno na osnovi vira (14))

Struktura encima

Znana je kristalna struktura apo oblike MurF iz *E. coli* in kristalne strukture MurF iz *S. pneumoniae* kokristalizirane z nizkomolekularnimi sulfonamidnimi zaviralci (slika 7).



Slika 7: 3D struktura MurF iz *S. pneumoniae* kokristalizirana s spojino **1b** (17, 18)

Oba encima sta sestavljena iz treh domen, ki so pri apo obliki encima v odprtem stanju, v kokristaliziranem encimu pa v zaprtem stanju. MurF iz *E. coli* je sestavljen iz 452 aminokislinskih ostankov razporejenih v 3 domene:

- *N-terminalna domena* (ostanki 1–81) je sestavljena iz petih β trakov, ki jih obdajajo tri vijačnice, dve α vijačnici in ena 3_{10} vijačnica. Prisotna je še kratka dvodelna antiparalelna β ploskev, ki je pravokotna glede na osnovno zgradbo domene.
- *Centralna domena* (ostanki 82–310) ima v centralnem delu šestdelno paralelno β ploskev, ki jo obdaja osem α vijačnic. Prisotna je še majhna trodelna antiparalelna β ploskev. Zvitje centralne domene je podobno klasični strukturi za vezavo mononukleotidov in je del številnih proteinov, ki vežejo ATP.
- *C-terminalna domena* (ostanki 311–447) je sestavljena iz šestih β trakov, ki tvorijo β ploskev, ta pa je obdana s petimi α vijačnicami.

Encim iz *S. pneumoniae* je sestavljen iz 454 aminokislinskih. Aminokislinsko zaporedje obeh encimov je v 26 % identično. Vse tri domene kažejo podobne strukturne značilnosti, če jih primerjamo vsako posamezno, prostorska razporeditev vseh treh domen med obema encimoma pa se znatno razlikuje (14, 17).

1.5.2. Zaviralci MurF

Prvi zaviralci encima MurF so bili psevdo tripeptidi in psevdo tetrapeptidi aminoalkilfosfinske kisline, ki delujejo kot analogi prehodnega stanja. Kinetični testi na izoliranem encimu MurF iz *E. coli* so pokazali, da fosfinatni analogi delujejo kot reverzibilni kompetitivni zaviralci s K_i vrednostmi med 200 in 700 μM , niso pa pokazali protibakterijskega delovanja na testiranih bakterijah. Kot močan zaviralec se je pokazal tudi ATP analog AMP-PCP (5'-adenilil-(β,γ -metilen)difosfonat), ki je hidrolitsko odporen in deluje ATP kompetitivno (13, 19).

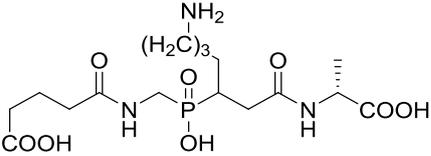
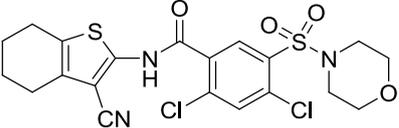
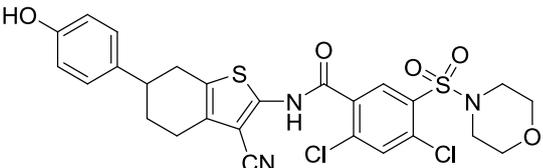
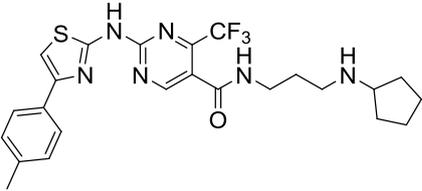
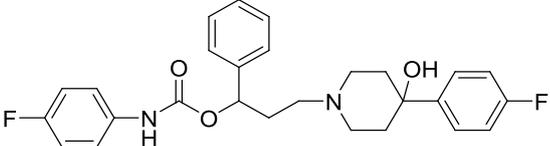
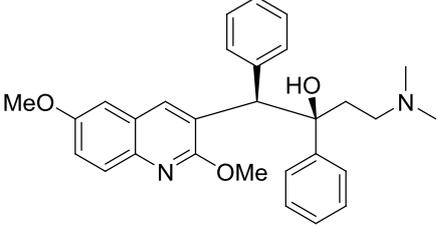
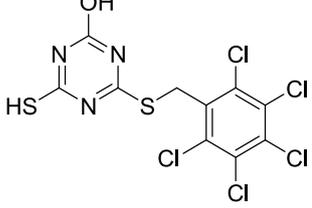
V družbi Abbott so s pomočjo učinkovitega presejalnega testiranja osnovanega na afinitetno-masno spektroskopski identifikaciji odkrili dva sulfonamidna zaviralca, ki sta bila nadalje optimizirana (20). Optimizacija je vodila do novih spojin, ki zavirajo encim v nanomolarnem območju. S pomočjo sinteze številnih analogov so določili SAR tega strukturnega tipa zaviralcev encima, hkrati pa so na podlagi kristalnih struktur encima z zaviralci določili tudi interakcije, ki so pomembne za vezavo. Zaviralci se vežejo na področje, kjer se veže tudi UDP substrat reakcije in povzročijo zaprtje domen. Na podlagi

primerjav s kristalnimi strukturami drugih Mur ligaz so prišli do sklepa, da ta zaprta struktura ni popolnoma identična katalitični strukturi, ki jo encim zavzame med *in vivo* katalizo v bakterijski celici. Pri določanju protibakterijskega delovanja so te spojine pokazale slabše rezultate, saj ni bilo pri nobeni zaznati pomembnejšega protibakterijskega delovanja tudi v primeru prisotnosti spojin za povečanje prehodnosti celične membrane. Razlog za odsotnost učinka je lahko premajhna prehodnost teh spojin v bakterijsko citoplazmo, časovno prekratka doba delovanja ali kakšen drug še neidentificiran razlog (9, 17, 21–23). Na podlagi serije sulfonamidnih zaviralcev so postavili tri QSAR modele, s pomočjo katerih je omogočeno lažje iskanje novih strukturo podobnih spojin z izboljšanimi fizikalno-kemijskimi značilnostmi (24).

Odkrili so tudi novo skupino specifičnih zaviralcev MurF z IC_{50} vrednostmi $2,5 \mu M$ s tiazolilaminopirimidinskim skeletom. Mikrobiološko testiranje treh molekul iz te skupine ni pokazalo dobrega protibakterijskega delovanja (MIK > $64 \mu g/ml$) (25). Na osnovi farmakofornega modela pripravljenega na podlagi 8-hidroksikinolinov, ki že sami zmanjšajo aktivnost MurF, so odkrili spojino s 4-fenilpiperidinskim fragmentom, ki je zavirala preiskovani encim v nizkem mikromolekularnem območju ($IC_{50} = 26 \pm 2 \mu M$). Ta spojina je pokazala protibakterijsko delovanje proti nekaterim laboratorijsko spremenjenim sevom bakterij, proti naravnim sevom pa so bili rezultati nekoliko slabši (MIK za *E. coli* > $32 \mu g/ml$) (23). Ista raziskovalna skupina je kot zaviralce encima MurF odkrila tudi arilkinoline (26). Encimsko aktivnost MurF je zmanjšal peptid MurFpI, ki vpliva na vezavo dipeptida D-Ala-D-Ala, pri čemer pa se ne veže na njegovo vezavno mesto (27). Pred kratkim so s pomočjo strukturo podprtega virtualnega rešetanja določili strukturo nov zaviralec z 2-hidroksi-4-merkaptio-1,3,5-triazinskim skeletom (28).

Strukture nekaterih pomembnejših zaviralcev MurF so podane v tabeli I.

Tabela I: Znani zaviralci MurF

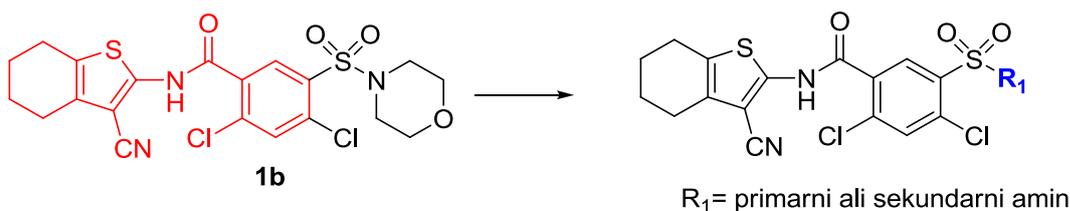
Spojina	Struktura spojine	IC ₅₀ [μM]
<u>1a</u>		K _i = 200 μM
<u>1b</u>		1
<u>1c</u>		0,022
<u>1d</u>		2,5
<u>1e</u>		26 ± 2
<u>1f</u>		24
<u>1g</u>		63

2. NAMEN DELA

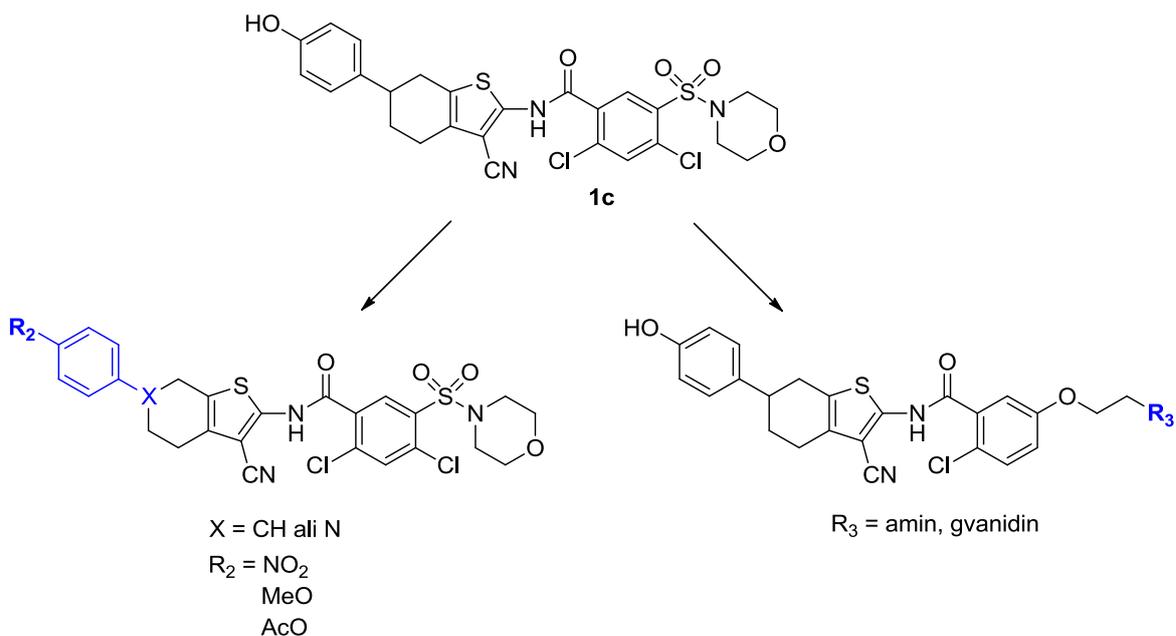
Cilj našega dela je sinteza novih zaviralcev ligaze MurF na osnovi že znanih – objavljenih sulfonamidnih zaviralcev (21). 2-amino-3-cianotiofen in 2-klorobenzojska kislina, povezani preko amidne vezi, sta po znanih podatkih ključna za zaviralno aktivnost, zato ju bomo obdržali pri vseh novih spojinah (17, 21). Najprej bomo na podlagi spojine **1b** morfolinski del zamenjali z različnimi sekundarnimi ali primarnimi amini (substituent R_1 , slika 8), ki jih bomo pripajali na benzensulfonil klorid. Z modifikacijami tega dela molekule želimo ugotoviti vpliv različnih skupin na zaviralno in protibakterijsko delovanje spojine **1b**.

Na osnovi že znane spojine z najboljšim zaviralnim delovanjem na MurF iz *Streptococcus pneumoniae* **1c** bomo preverili, kako na aktivnost spojin vpliva manjša sprememba funkcionalnih skupin (substituent R_2 , slika 9) na para mestu fenilnega obroča vezanega na mestu 6,4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofenskega dela molekule.

Nadalje bomo poskušali razširiti zaviralno in protibakterijsko delovanje tudi na MurF iz bakterije *Escherichia coli*, saj so sulfonamidni zaviralci pokazali delovanje predvsem na MurF G+ bakterije *S. pneumoniae*. K temu bomo pristopili z zamenjavo celotnega sulfonamidnega fragmenta spojine **1c**, na mestu katerega bomo naredili aminoalkilni eter ter nato amino skupino pretvorili v gvanidinsko skupino (substituent R_3 , slika 9). Podobno modifikacijo bomo naredili tudi na analogu brez hidroksifenilnega substituenta.



Slika 8: Načrtovane spremembe na spojini **1b** (z rdečo označen nespremenjen del molekule)



Slika 9: Načrtovane spremembe spojine **1c**

Vse končne spojine bomo biokemijsko ovrednotili in jim določili zaviralno aktivnost na izoliranih encimih MurF iz *S. pneumoniae* in *E. coli*, aktivnim pa bomo določili IC₅₀ vrednosti. Najbolj obetavnim spojinam bomo določili tudi protibakterijsko delovanje, ki ga bomo opredelili z vrednostjo MIK.

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Pri delu v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev (Acros, Sigma, Fluka, Apollo Scientific, Merck) brez posebne predhodne predpriprave. Brezvodni diklorometan smo pripravili z destilacijo ob prisotnosti CaH_2 v argonovi atmosferi tik pred uporabo topila.

3.2. METODE

- **Kromatografske metode**

Za TLC smo uporabljali plošče TLC Silica gel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu velikosti 20 x 20 cm z dodanim fluorescenčnim indikatorjem ter mobilne faze navedene pri posameznih spojinah. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabili UV svetlobo ($\lambda = 254 \text{ nm}$ in $\lambda = 366 \text{ nm}$) in različne orositvene reagente pripravljene v ustreznih raztopinah (ninhidrin, FeCl_3 , bromkrezol zeleno, 2,4-dinitrofenilhidrazin).

Za čiščenje produktov smo uporabili »flash« kolonsko kromatografijo (v nadaljevanju kolonska kromatografija). Stacionarna faza je bil silikagel 60 z velikostjo delcev 0,04–0,063 mm (Merck), mobilne faze pa so bile različne in so navedene pri opisih postopkov sinteze in čiščenja.

Analitsko HPLC smo 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) termostatorirano na 25 °C. Hitrost pretoka mobilne faze je bila 1 mL/min, volumen injiciranja pa 10 μL . Mobilna faza je bila mešanica 0,1 % raztopine trifluoroacetne kisline v bidestilirani vodi (pridobljena z Millipore Advantage A10 sistemom) in acetonitrila. Gradient je bil 10 % do 90 % acetonitrila v 19 minutah.

Reverzno fazno »flash« kromatografijo smo izvedli na Biotage Isolera One System sistemu. Uporabili smo kolono Biotage SNAP Cartridge KP-C18-HS 12g. Mobilna faza je bila mešanica 0,1 % raztopine trifluoroacetne kisline v destilirani vodi in acetonitrila, spojino pa smo detektirali pri valovnih dolžinah 220 in 254 nm.

- **Spektroskopske metode**

Jedrski magnetna resonanca (NMR): NMR spektre so posneli na Bruker Avance III 400 MHz spektrometru na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v devteriranih topilih CDCl_3 , DMSO-d_6 , Py-d_5 , CD_3OD , devteriran aceton (aceton-d_6); kot interni standard je bil uporabljen TMS. Kemijske premike (δ) smo podali v »parts per million« (ppm) glede na interni standard. Spektre smo obdelali s programoma MestRe-C (MASTERLAB RESEARCH SL.) in NMRnotebook 2.70 (NMRTEC S.A.S.).

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

Masna spektroskopija: Masne spektre so posneli na masnem spektrometru VG-Analytical AutoSpec Q proizvajalca Micromass (Manchester, Velika Britanija) z ESI tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

- **Elementna analiza**

Elemente analize so izvedli na analizatorju Perkin-Elmer 240C na Katedri za organsko kemijo Fakultete za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

- **Določanje temperatur tališč**

Temperature tališča spojin smo določili s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo in so nekorogirana.

- **Poimenovanje in risanje spojin**

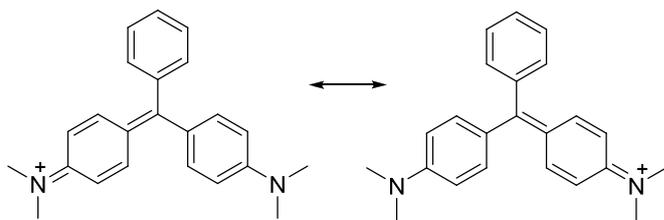
Za poimenovanje spojin in risanje struktur smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 11.0 proizvajalca Cambridge Soft. Pri iskanju sinteznih postopkov v podatkovnih bazah smo si pomagali s programskim orodjem SciFinder.

- **Ekstrakcije in spiranja**

Za ekstrakcije in spiranja reakcijskih zmesi smo uporabili nasičeni vodni raztopini NaCl in NaHCO_3 , 1M in 0,1M vodno raztopino NaOH in 1M vodno raztopino HCl .

- **Biokemijsko testiranje**

Sintetizirane spojine so bile biokemijsko ovrednotene z določitvijo njihove zaviralne aktivnosti na izoliranem encimu MurF iz bakterij *S. pneumoniae* in *E. coli*. Ob nastanku vezi med karboksilno skupino UDP-tripeptida in aminske skupino dipeptida D-Ala-D-Ala pride do nastanka ADP in P_i . Sproščeni anorganski fosfat lahko določimo s testom na osnovi barvila malahit zeleno (slika 10) (29).



Slika 10: Struktura barvila malahit zeleno

Končni volumen reakcijske zmesi 50 μ L za inkubacijo encima je vseboval:

- pri MurF iz *S. pneumoniae*: pufer 50 mM Hepes, pH 8,0; 50 mM MgCl₂, 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,
- pri MurF iz *E. coli*: pufer 50 mM Hepes, pH 8,0; 50 mM MgCl₂, 0,005 % Triton X-114, 600 μ M D-Ala-D-Ala, 100 μ M UDP-tripeptid-mA₂pm; 500 μ M ATP; očiščen MurF_{EC} in 250 ali 100 μ M testirane spojine raztopljene v DMSO.

V obeh primerih je bila končna koncentracija DMSO 5 % (v/v). Po končani inkubaciji smo dodali zmesi reagent Biomol[®]. Pri encimski reakciji sproščen anorganski fosfat tvori z molibdatom fosfomolibdat, ta pa s 3 molekulami malahit zelenega tvori obarvan kompleks, ki ga določamo spektrofotometrično pri 650 nm. Ob dodatku zaviralca encima je količina sproščenega P_i manjša v primerjavi s kontrolnim vzorcem brez dodatka zaviralca. Zmanjšanje aktivnosti encima podamo z rezidualno aktivnostjo (RA), ki predstavlja razmerje med aktivnostjo encima ob dodatku in v odsotnosti zaviralca izraženo v odstotkih. Rezidualne aktivnosti so bile določene pri koncentraciji zaviralca 100 μ M, razen če je navedeno drugače. Najaktivnejšim spojinam so bile določene vrednosti IC₅₀, ki predstavljajo koncentracijo spojine, pri kateri je bila rezidualna aktivnost 50 %.

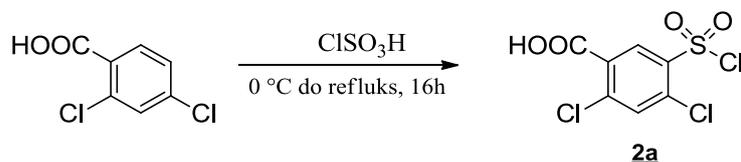
Meritve encimske aktivnosti ligaze MurF je na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani opravila asist. dr. Martina Hrast, mag. farm.

Protibakterijska aktivnost

Protibakterijsko delovanje spojin z najboljšim zaviralnim učinkom na izoliran encim MurF so določili z metodo razredčevanja v tekočem gojišču na mikrotiterskih ploščah s 5 % (v/v) lizatoma konjske krvi na sevu *S. pneumoniae* R6. Protimikrobno delovanje spojin **14a** in **16** je bilo preverjeno na sevu *Staphylococcus aureus* SH1000 in na štirih sevih *E. coli*.

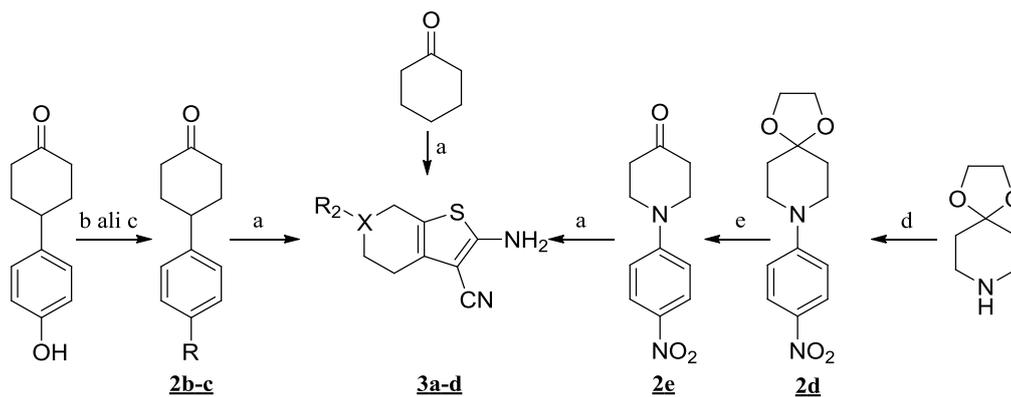
4. EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ

4.1. SINTEZA 2,4-DIKLORO-5-(KLOROSULFONIL)BENZOJSKE KISLINE (**2a**)



Klorsulfonsko kislino (31,3 mL, 471,2 mmol, 1,0 eq) smo na ledeni kopeli ohladili na 0 °C in postopoma dodajali trdno 2,4-diklorobenzojsko kislino (15,0 g, 78,5 mmol, 6 eq) in mešali še nadaljnjih 15 minut pri temperaturi 0 °C. Zatem smo zmes segrevali 16 ur pri 135 °C na oljni kopeli z vodnim hladilnikom. Ohlajeno reakcijsko zmes smo med mešanjem pazljivo zlili na približno 300 mL zdrobljenega ledu. Izpadlo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in v sušilniku posušili do suhega.

2,4-dikloro-5-(klorosulfonyl)benzojska kislina (2a)		M = 289,52 g/mol
<i>Izgled:</i> beli kristali	<i>T_{tal}:</i> 182–184 °C [lit. 183–185 °C; (30)]	
<i>TLC:</i> R _f (DKM/MeOH = 9/1 + 0,3 % očetna kislina) = 0,14		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 88 %		
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 7,65 (s, 1H, Ar-H), 8,29 (s, 1H, Ar-H), COOH izmenljiv	

4.2. SINTEZA CIANOTIOFENOV (**3a-d**)

Slika 11: Shema sinteze cianotiofenov; Reakcijski pogoji in reagenti: **a**) malononitril, žveplo, morfolin, 3h, 85 °C; **b**) Ac_2O , Py, 18h, s.t.; **c**) MeI, Cs_2CO_3 , aceton, 1h, reflux; **d**) fluoro-4-nitrobenzen, CaCO_3 , DMSO, 3h, s.t.; **e**) 10 % H_2SO_4 , THF, 48h, s.t.

Tabela II: Substituenti na nasičenem obroču aminotiofenov

Spojina	X	R^2
3a	CH_2	/
3b	CH	
3c	CH	
3d	N	

4.2.1. Sinteza 4-(4-oksocikloheksil)fenil acetata (**2b**)

Raztopini 4-(4-hidroksifenil)cikloheksanona (5,00 g, 26,28 mmol, 1,0 eq) v piridinu (15 mL) smo postopoma dodali acetanhidrid (10 mL, 105,2 mmol, 4 eq). Reakcijsko zmes smo mešali 18 ur pri sobni temperaturi. Po tem času smo ji dodali 100 mL vode in naravnali pH vrednost na 1 s 37 % HCl. Vodno fazo smo ekstrahirali z EtOAc (4 × 50 mL), združene organske faze sprali s 100 mL nasičene raztopine NaCl, posušili z Na₂SO₄ in odstranili topilo pod znižanim tlakom (v nadaljevanju uporevanje topila). Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/2).

4-(4-oksocikloheksil)fenil acetat (2b)		M = 232,28 g/mol
<i>Izgled:</i> beli igličasti kristali		<i>T_{tal}:</i> 109–111 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,24		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 58 %		
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,87–1,97 (m, 2H, CH _{2a} CH ₂ CO), 2,19–2,25 (m, 2H, CH _{2b} CH ₂ CO), 2,30 (s, 3H, CH ₃), 2,49–2,53 (m, 4H, CO(CH ₂) ₂), 3,03 (tt, <i>J</i> ₁ = 12,4, <i>J</i> ₂ = 3,4 Hz, 1H, CH), 7,04 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,25 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H, 2 × Ar-H)	
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 21,16; 34,01; 41,32; 42,21; 121,64; 127,67; 142,32; 149,18; 169,67; 211,00	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₄ H ₁₇ O ₃ [M+(H)] ⁺ (m/z): 233,1178, izmerjena vrednost: 233,1169	
IR (KBr)	3396, 3051, 2963, 2931, 2865, 1749, 1710, 1509, 1465, 1432, 1419, 1370, 1348, 1331, 1219, 1197, 1165, 1109, 1042, 1015 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₄ H ₁₇ O ₃ x 0,1 H ₂ O	% C = 71,84; % H = 6,98
	Izmerjene vrednosti	% C = 71,92; % H = 6,95

4.2.2. Sinteza 4-(4-metoksifenil)cikloheksanona (**2c**)

Mešanici 4-(4-hidroksifenil)cikloheksanona (1,70 g, 8,94 mmol, 1,0 eq) in Cs₂CO₃ (4,37 g, 13,4 mmol, 1,5 eq) v acetonu (20 mL) smo po kapljicah dodali MeI (7,84 mL, 126 mmol, 14 eq) ter zmes refluktirali 1 uro. Po tem času smo topilo uparili ter zaostanku dodali 30 mL vode, ki smo jo ekstrahirali z DKM (3 × 30 mL), združene organske faze posušili z Na₂SO₄ in uparili topilo. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo.

4-(4-metoksifenil)cikloheksanon (2c)		M = 204,26 g/mol
<i>Izgled:</i> beli igličasti kristali		<i>T_{tal}:</i> 78–79 °C [lit. 74 °C; (31)]
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,35		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 93 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,88–1,99 (m, 2H, CH _{2a} CH ₂ CO), 2,20–2,24 (m, 2H, CH _{2b} CH ₂ CO), 2,51–2,55 (m, 4H, CO(CH ₂) ₂), 3,01 (tt, <i>J</i> ₁ = 11,9, <i>J</i> ₂ = 2,9 Hz, 1H, CH), 3,82 (s, 3H, CH ₃), 6,89 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,19 (d, <i>J</i> = 8,6 Hz, 2H, 2 × Ar-H)	

4.2.3. Sinteza 8-(4-nitrofenil)-1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekana (2d)

Raztopini 1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekana (4,0 mL, 31,2 mmol, 1 eq) v 30 mL DMSO smo dodali CaCO₃ (4,69 g, 46,8 mmol, 1,5 eq) in postopoma še fluoro-4-nitrobenzen (3,3 mL, 31,2 mmol, 1 eq). Reakcijsko zmes smo mešali 3 ure pri sobni temperaturi ter jo nato zlili na 200 mL vode. Vodo smo ekstrahirali z DKM (4 × 50 mL), združene organske faze posušili z Na₂SO₄ in uparili topilo. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/2).

8-(4-nitrofenil)-1,4-dioksa-8-azaspiro[4.5]dekan (2d)		M = 264,28 g/mol
<i>Izgled:</i> rumeni kristali		<i>T_{tal}:</i> 158–160 °C [lit. 155–156 °C; (32)]
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,20		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 87 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,81 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 4H, C(CH ₂) ₂), 3,58 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 4H, N(CH ₂) ₂), 4,01 (s, 4H, O(CH ₂) ₂ O), 6,83 (d, <i>J</i> = 9,3 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 8,11 (d, <i>J</i> = 9,3 Hz, 2H, 2 × Ar-H)	

4.2.4. Sinteza 1-(4-nitrofenil)piperidin-4-ona (2e)

Raztopini spojine **2d** (1,03 g, 3,9 mmol) v THF (20 mL) smo dodali 25 mL 10 % vodne raztopine H₂SO₄ in mešali pri sobni temperaturi 48 ur. THF smo nato uparili, vodno fazo naalkalili z nasičeno raztopino NaHCO₃ in jo ekstrahirali z DKM (3 × 50 mL). Združene organske faze smo sprali s 50 mL nasičene raztopine NaCl, posušili z Na₂SO₄ in uparili topilo. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/2).

1-(4-nitrofenil)piperidin-4-on (2e)		M = 220,22 g/mol
<i>Izgled:</i> rumeni kristali		<i>T_{tal}:</i> 167–169 °C [lit. 165–167 °C; (32)]
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,22		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 76 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 2,64 (t, <i>J</i> = 6,0 Hz, 4H, C(CH ₂) ₂), 3,83 (t, <i>J</i> = 6,0 Hz, 4H, N(CH ₂) ₂), 6,86 (d, <i>J</i> = 9,2 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 8,17 (d, <i>J</i> = 9,2 Hz, 2H, 2 × Ar-H)	

4.3. SPLOŠNI POSTOPEK SINTEZE 2-AMINOTIOFENOV 3a–d

Spojine 2b–c, 2e ali cikloheksanon (1,0 eq) ter malononitril (1,0 eq) smo pri sobni temperaturi raztopili v 15 mL etanola, dodali žveplo (1,1 eq) in morfolin (1,2 eq) in nato mešali pri 85 °C 1 do 3 ure. Reakcijsko zmes smo ohladili na ledu, pri čemer je izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in sprali z manjšo količino ohlajenega etanola (5–10 mL). Spojine 3b–c smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/2).

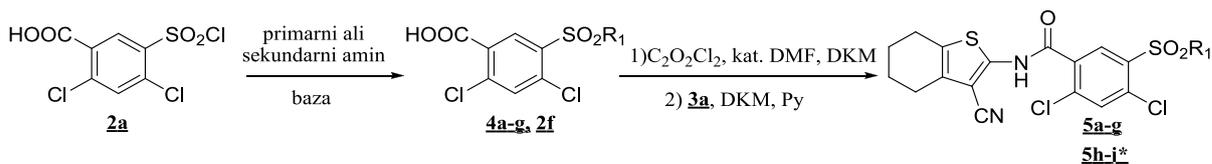
2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-karbonitril (<u>3a</u>)		M = 178,26 g/mol
<i>Izgled:</i> svetlo oranžni kristali		<i>T_{tal}:</i> 150–152 °C [lit. 144–146 °C; (33)]
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,60		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 80 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,76–1,86 (m, 4H, CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂), 2,50–2,53 (m, 4H, CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂), 4,64 (s, 2H, NH ₂)	

4-(2-amino-3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-6-il)fenil acetat (<u>3b</u>)		M = 312,39 g/mol
<i>Izgled:</i> beli igličasti kristali		<i>T_{tal}:</i> 195–197 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,23		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 82 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,91 (qd, <i>J</i> ₁ = 12,2, <i>J</i> ₂ = 5,6 Hz, 1H, CHCH _A H _B CH ₂), 2,08–2,14 (m, 1H, CHCH _A H _B CH ₂), 2,30 (s, 3H, CH ₃ CO), 2,56–2,69 (m, 3H, CCH _A H _B CHCH ₂ CH ₂), 2,69–2,82 (m, 1H, CCH _A H _B CHCH ₂ CH ₂), 2,95–3,08 (m, 1H, CH), 4,64 (bs, 2H, NH ₂), 7,04 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,24 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H, 2 × Ar-H)	
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 20,84; 24,39; 29,06; 31,39; 39,80; 82,95; 116,19; 116,34; 121,64; 127,81; 130,89; 143,11; 148,85; 163,14; 169,28	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₇ H ₁₇ N ₂ O ₂ S [M+(H)] ⁺ (m/z): 313,1011, izmerjena vrednost: 313,0999	
IR (KBr)	3214, 2917, 2207, 1741, 1637, 1585, 1508, 1406, 1375, 1340, 1234, 1020 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₇ H ₁₆ N ₂ O ₂ S	% C = 65,36; % H = 5,16; % N = 8,97
	Izmerjene vrednosti	% C = 65,44; % H = 4,95; % N = 8,86

2-amino-6-(4-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-karbonitril (3c)		M = 284,38 g/mol
<i>Izgled:</i> bledo rumeni kristali		<i>T_{tal}:</i> 209–211 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,33		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 91 %		
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 1,79–1,95 (m, 2H, CHCH ₂ CH ₂), 2,49–2,54 (m, 3H, CH _A H _B CHCH ₂ CH ₂ , pod signalom za topilo), 2,64 (dd, <i>J</i> ₁ = 15,2, <i>J</i> ₂ = 4,8 Hz, 1H, CH _A H _B CH(CH ₂)), 2,87–2,94 (m, 1H, CH), 3,73 (s, 3H, CH ₃ O), 6,87 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,02 (bs, 2H, NH ₂), 7,21 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H, 2 × Ar-H)	
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 24,39; 29,26; 31,57; 40,13; 54,94; 82,86; 113,70; 116,22; 116,45; 127,73; 130,85; 137,58; 157,64; 163,09	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₆ H ₁₇ N ₂ OS [M+(H)] ⁺ (m/z): 285,1062, izmerjena vrednost: 285,1059	
IR (KBr)	3421, 2203, 1628, 1608, 1509, 1463, 1403, 1339, 1304, 1264, 1237, 1178, 1128, 1109, 1036 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₆ H ₁₆ N ₂ OS	% C = 67,58; % H = 5,67; % N = 9,85
	Izmerjene vrednosti	% C = 67,71; % H = 5,32; % N = 9,83

2-amino-6-(4-nitrofenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-karbonitril (3d)		M = 300,34 g/mol
<i>Izgled:</i> rjavi kristali		<i>T_{tal}:</i> 236–238 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,15		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 95 %		
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 2,56 (t, <i>J</i> = 5,2 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ NCH ₂), 3,81 (t, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ NCH ₂), 4,42 (s, 2H, CH ₂ CH ₂ NCH ₂), 7,08 (d, <i>J</i> = 9,6 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,18 (bs, 2H, NH ₂), 8,07 (d, <i>J</i> = 9,6 Hz, 2H, 2 × Ar-H)	
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 23,55; 43,96; 45,42; 82,50; 112,76; 113,43; 115,74; 125,76; 130,41; 136,90; 154,06; 163,82	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₄ H ₁₃ N ₄ O ₂ S [M+(H)] ⁺ (m/z): 301,0759, izmerjena vrednost: 301,0748	
IR (KBr)	3389, 3308, 3212, 2834, 2200, 1631, 1596, 1526, 1506, 1477, 1453, 1482, 1395, 1365, 1300, 1244, 1200, 1140, 1114, 1056 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S x 0,25 H ₂ O	% C = 55,16; % H = 4,13; % N = 18,38
	Izmerjene vrednosti	% C = 55,25; % H = 3,93; % N = 18,31

4.4. SINTEZA SULFONAMIDNIH DERIVATOV



Slika 12: Sinteza sulfonamidnih derivatov (*-spojine sintetizirane iz spojin **4d-f**)

Tabela III: Spremembe na sulfonamidni strani molekule (*-spojine sintetizirane iz spojin **4d-f**)

Oznaka spojine	R ₁	Oznaka spojine	R ₁
4a 5a		4f 5f	
4b 5b		4g 5g	
4c 5c		5h*	
4d 5d		5i*	
4e 5e		5i*	
2f			

4.4.1. Splošni postopek sinteze spojin **4a-e** in **2f**

Spojino **2a** (1 eq) smo raztopili v 10–40 mL DKM ter jo ohladili na ledeni kopeli. Postopoma smo dodali amin (1 eq; glej tabelo III) in Et₃N (1,5 eq) ter mešali reakcijsko zmes pri sobni temperaturi od 2 do 16 ur. Reakcijsko zmes smo nato sprali z 1M HCl (20 mL), vodno fazo pa smo ekstrahirali z DKM (3 × 20 mL). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (50 mL), sušili z Na₂SO₄ ter uparili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo.

2,4-dikloro-5-(tiazolidin-3-ilsulfonyl)benzojska kislina (4a)

Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = 5 % MeOH v DKM + 0,3 % očetne kisline).

2,4-dikloro-5-(tiazolidin-3-ilsulfonyl)benzojska kislina (4a)		M = 342,22 g/mol
<i>Izgled:</i> beli igličasti kristali		<i>T_{lat}:</i> 167–169 °C
<i>TLC:</i> R _f (5 % MeOH v DKM + 0,3 % očetne kisline) = 0,18		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 41 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 3,05 (t, <i>J</i> = 6,0 Hz, 2H, NCH ₂ CH ₂ S), 3,78 (t, <i>J</i> = 6,0 Hz, 2H, NCH ₂ CH ₂ S), 4,59 (s, 2H, NCH ₂ S), 7,73 (s, 1H, Ar-H), 8,74 (s, 1H, Ar-H), COOH izmenljiv	
¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 31,56; 50,35; 51,36; 127,57; 134,96; 135,30; 135,96; 137,13; 140,30; 167,64	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₀ H ₈ Cl ₂ NO ₄ S ₂ [M-(H)] ⁻ (m/z): 339,9272, izmerjena vrednost: 339,9277	
IR (KBr)	3423, 2947, 1696, 1578, 1541, 1405, 1352, 1292, 1258, 1162, 1123, 1080, 1061 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₀ H ₈ Cl ₂ NO ₄ S ₂	% C = 35,10; % H = 2,65; % N = 4,09
	Izmerjene vrednosti	% C = 35,33; % H = 2,63; % N = 4,23

2,4-dikloro-5-(2-metilpiperidin-1-ilsulfonyl)benzojska kislina (4b)

Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo z MF = 5 % MeOH v DKM + 0,3 % očetne kisline.

2,4-dikloro-5-(2-metilpiperidin-1-ilsulfonyl)benzojska kislina (4b)		M = 352,23 g/mol
<i>Izgled:</i> beli kristali		<i>T_{lat}:</i> 171–173 °C
<i>TLC:</i> R _f (5 % MeOH v DKM + 0,3 % očetne kisline) = 0,13		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 12 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,24 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz, 3H, CH ₃), 1,45–1,75 (m, 6H, N-CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 3,18 (td, <i>J</i> ₁ = 13,7, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 1H, NCH _A H _B CH ₂), 3,70 (dd, <i>J</i> ₁ = 13,7, <i>J</i> ₂ = 3,2 Hz, 1H, NCH _A H _B CH ₂), 4,10–4,23 (m, 1H, CH), 7,69 (s, 1H, Ar-H), 8,74 (s, 1H, Ar-H), COOH izmenljiv	
¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 16,15; 18,11; 25,63; 30,35; 40,70; 48,86; 126,89; 134,52; 135,20; 136,85; 137,27; 139,33; 168,48	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₃ H ₁₆ Cl ₂ NO ₄ S [M+(H)] ⁺ (m/z): 352,0177, izmerjena vrednost: 352,0169	
IR (KBr)	3106, 2949, 2643, 1702, 1579, 1540, 1408, 1339, 1298, 1262, 1198, 1153, 1078, 1059, 1010 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₃ H ₁₅ Cl ₂ NO ₄ S	% C = 44,33; % H = 4,29; % N = 3,98
	Izmerjene vrednosti	% C = 44,24; % H = 4,25; % N = 3,92

2,4-dikloro-5-(tiomorfolinosulfonil)benzojska kislina (4c)

Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM/MeOH = 9/1 + 0,3 % očetne kisline).

2,4-dikloro-5-(tiomorfolinosulfonil)benzojska kislina (4c)		M = 356,25 g/mol
<i>Izgled:</i> beli kristali		<i>T_{tal}:</i> 176–178 °C
<i>TLC:</i> R _f (DKM/MeOH = 9/1 + 0,3 % očetne kisline) = 0,24		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 8 %		
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 2,68 (bs, 4H, CH ₂ SCH ₂), 3,58 (bs, 4H, CH ₂ NCH ₂), 7,62 (s, 1H, Ar-H), 8,59 (s, 1H, Ar-H), COOH izmenljiv	
¹³C-NMR (100 MHz, Py-d ₅)	δ (ppm) = 29,69; 50,00; 136,01; 136,42; 136,73, 137,37; 137,59; 140,43; 169,72	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₁ H ₁₀ Cl ₂ NO ₄ S ₂ [M-(H)] ⁻ (m/z): 353,9428, izmerjena vrednost: 353,9439	
IR (KBr)	3444, 2903, 1694, 1580, 1544, 1398, 1353, 1289, 1251, 1166, 1127, 1085, 1068, 1021 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₁ H ₁₁ Cl ₂ NO ₄ S ₂	% C = 37,09; % H = 3,11; % N = 3,93
	Izmerjene vrednosti	% C = 37,00; % H = 2,95; % N = 3,82

5-(N-(2-(*tert*-butoksikarbonilamino)etil)sulfamoil)-2,4-diklorobenzojska kislina (4d)

Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM/MeOH = 9/1 + 0,3 % očetne kisline). Združene frakcije smo ekstrahirali s 25 mL vode, ki smo jo naalkalili z 1M NaOH do pH = 6–7. Organsko fazo smo posušili z Na₂SO₄ ter uparili topilo in posušili nastali produkt. Alkalno vodno fazo smo nakisali z 1M HCl do pH = 1 ter nastalo oborino odnučali in sprali z vodo ter pustili v sušilniku pri 50 °C čez noč. Oba dela produkta smo združili in uporabili v nadaljnji sintezni stopnji.

5-(N-(2-(<i>tert</i>-butoksikarbonilamino)etil)sulfamoil)-2,4-diklorobenzojska kislina (4d)		M = 413,27 g/mol
<i>Izgle</i> d: beli igličasti kristali		<i>T</i> _{tal} : 192–193 °C
<i>TLC</i> : R _f (DKM/MeOH = 9/1 + 0,3 % očetne kisline) = 0,24		
<i>Izkoristek reakcije</i> : 6 %		
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 1,34 (s, 9H, 3 × CH ₃), 2,90 (p, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H, SO ₂ NHCH ₂), 2,96 (p, <i>J</i> = 6,4 Hz, 2H, CONHCH ₂), 6,72 (t, <i>J</i> = 5,6 Hz, 1H, SO ₂ NH), 8,01 (s, 1H, Ar-H), 8,17 (t, <i>J</i> = 6,4 Hz, 1H, OCONH), 8,34 (s, 1H, Ar-H), COOH izmenljiv	
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 27,90; 39,51; 41,95; 78,60; 130,08; 132,28; 133,60; 134,01; 136,22; 137,05; 155,97; 165,10	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₄ H ₁₇ Cl ₂ N ₂ O ₆ S [M-(H)] ⁺ (m/z): 411,0184, izmerjena vrednost: 411,0190	
IR (KBr)	3371, 3291, 2978, 2559, 1702, 1661, 1644, 1585, 1542, 1436, 1368, 1332, 1296, 1249, 1235, 1165, 1128, 1100, 1076 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₄ H ₁₈ Cl ₂ N ₂ O ₆ S	% C = 40,69; % H = 4,39; % N = 6,78
	Izmerjene vrednosti	% C = 40,69; % H = 4,10; % N = 6,70

2,4-dikloro-5-(4-(etoksikarbonil)piperidin-1-ilsulfonil)benzojska kislina (4e)

Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = 5 % MeOH v DKM + 0,3 % očetne kisline).

2,4-dikloro-5-(4-(etoksikarbonil)piperidin-1-ilsulfonil)benzojska kislina (4e)		M = 410,27 g/mol
<i>Izgled:</i> beli kristali		<i>T_{tal}:</i> 154–156 °C
<i>TLC:</i> R _f (5 % MeOH v DKM + 0,3% očetne kisline) = 0,22		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 20 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,26 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 3H, CH ₃ CH ₂), 1,74–1,84 (m, 2H, CH _{2(a)} CHCH _{2(b)}), 1,98–2,02 (m, 2H, CH _{2(a)} CHCH _{2(b)}), 2,41–2,48 (m, 1H, CH), 2,94–3,00 (m, 2H, CH _{2(a)} NCH _{2(b)}), 3,77 (dt, <i>J</i> ₁ = 13,2, <i>J</i> ₂ = 4,0 Hz, 2H, CH _{2(a)} NCH _{2(b)}), 4,15 (q, <i>J</i> = 7,2 Hz, 2H, CH ₃ CH ₂), 7,68 (s, 1H, Ar-H), 8,67 (s, 1H, Ar-H), COOH izmenljiv	
¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 14,16; 27,82; 40,15; 45,02; 60,91; 127,22; 134,72; 135,35; 135,78; 136,90; 139,74; 167,90; 173,97	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₅ H ₁₈ Cl ₂ NO ₆ S [M+(H)] ⁺ (m/z): 410,0232, izmerjena vrednost: 410,0231	
IR (KBr)	2987, 2650, 1721, 1583, 1540, 1472, 1450, 1433, 1411, 1362, 1326, 1262, 1166, 1078, 1043, 1017 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₅ H ₁₇ Cl ₂ NO ₆ S	% C = 43,91; % H = 4,18; % N = 3,41
	Izmerjene vrednosti	% C = 44,09; % H = 3,97; % N = 3,56

2,4-dikloro-5-(morfolinosulfonil)benzojska kislina (2f)

Surovi produkt smo pred nadaljnjo uporabo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = 5 % MeOH v DKM + 0,3 % očetne kisline).

2,4-dikloro-5-(morfolinosulfonil)benzojska kislina (2f)		M = 340,18 g/mol
<i>Izgled:</i> beli kristali		<i>T_{tal}:</i> 213–215 °C [lit. (34)]
<i>TLC:</i> R _f (DKM/MeOH = 9/1 + 0,3 % očetne kisline) = 0,23		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 58 %		
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 3,19 (t, <i>J</i> = 3,7 Hz, 4H, (CH ₂) ₂ N), 3,61 (t, <i>J</i> = 4,7 Hz, 4H, (CH ₂) ₂ O), 8,07 (s, 1H, Ar-H), 8,33 (s, 1H, Ar-H), 14,02 (bs, 1H, COOH)	

4.4.2. Sinteza 2,4-dikloro-5-(4-oksopiperidin-1-ilsulfonil)benzojske kisline (**4f**)

Spojino **2a** (0,60 g, 2,07 mmol, 1 eq) in 4-oksopiperidinijev klorid monohidrat (0,35 g, 2,28 mmol, 1 eq) smo suspendirali v topilu (zmes acetona in vode v volumskem razmerju 1:1; 10 mL), ohladili na ledeni kopeli in dodali NaOH (0,21 g, 5,18 mmol, 2,5 eq) ter mešali pri postopnem segrevanju reakcijske zmesi do sobne temperature 1,5 ure. Zmesi smo nato uparili aceton, izpadlo oborino odfiltrirali s presesavanjem in jo sprali z vodo ter posušili v sušilniku do suhega.

2,4-dikloro-5-(4-oksopiperidin-1-ilsulfonil)benzojska kislina (4f)		M = 352,19 g/mol
<i>Izgled:</i> bela oborina		<i>T_{tal}:</i> 202–204 °C
<i>TLC:</i> R _f (DKM/MeOH = 4/1 + 0,3 % očetne kisline) = 0,31 <i>Izkoristek reakcije:</i> 29 %		
¹H-NMR (400 MHz, aceton- d ₆)	δ (ppm) = 2,52 (t, <i>J</i> = 6,3 Hz, 4H, <u>CH₂COCH₂</u>), 3,74 (t, <i>J</i> = 6,3 Hz, 4H, <u>CH₂NCH₂</u>), 7,90 (s, 1H, Ar-H), 8,60 (s, 1H, Ar-H), <u>COOH</u> izmenljiv	
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO- d ₆)	δ (ppm) = 40,56; 44,41; 130,04; 133,64; 134,25; 134,48; 134,91; 137,67; 164,60; 205,68	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₂ H ₁₂ Cl ₂ NO ₅ S [M+(H)] ⁺ (m/z): 351,9813, izmerjena vrednost: 351,9803	
IR (KBr)	3464, 2970, 2770, 2607, 1745, 1694, 1583, 1539, 1468, 1453, 1420, 1379, 1364, 1346, 1304, 1287, 1233, 1162, 1113, 1078, 1035 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₂ H ₁₁ Cl ₂ NO ₅ S	% C = 40,92; % H = 3,15; % N = 3,98
	Izmerjene vrednosti	% C = 40,92; % H = 2,92; % N = 3,96

4.4.3. Sinteza 2,4-dikloro-5-(3-oksopiperazin-1-ilsulfonil)benzojske kisline (**4g**)

2-oksopiperazin (0,91 g, 9,07 mmol, 1,05 eq) smo suspendirali v 5 mL acetona in ohladili na 0 °C. Posebej smo raztopili spojino **2a** (2,50 g, 8,64 mmol, 1 eq) v 10 mL vode ob dodatku Na₂CO₃ (1,37 g, 12,95 mmol, 1,5 eq). To zmes smo nato postopoma dodali suspenziji amina ter reakcijsko zmes mešali pri sobni temperaturi čez noč. Aceton smo uparili ter nakisali alkalno vodno fazo (pH = 10) s koncentrirano HCl do pH = 1. Izpadlo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in sprali z malo hladne vode ter jo nadalje očistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM/M = 4/1 + 0,3 % očetne kisline) in s prekrystalizacijo iz metanola.

2,4-dikloro-5-(3-oksopiperazin-1-ilsulfonil)benzojska kislina (4g)		M = 353,18 g/mol
<i>Izgled:</i> beli prizmatični kristali		<i>T_{tal}:</i> > 350 °C
<i>TLC:</i> R _f (DKM/MeOH = 4/1 + 0,3 % očetne kisline) = 0,09		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 49 %		
¹ H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 3,18 (bs, 2H, NCH ₂ CH ₂), 3,45 (t, J = 4,8 Hz, 2H, NCH ₂ CH ₂ NH), 3,76 (s, 2H, NCH ₂ CO), 7,80 (s, 1H, Ar-H), 8,12 (s, 1H, Ar-H), 8,15 (bs, 1H, NHCO), COOH izmenljiv	
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 40,26; 41,94; 47,62; 129,98; 132,38; 132,75; 133,31; 135,93; 139,61; 164,63; 166,40	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₁ H ₁₁ Cl ₂ N ₂ O ₅ S [M+(H)] ⁺ (m/z): 352,9766, izmerjena vrednost: 352,9757	
IR (KBr)	3252, 3067, 2937, 1662, 1597, 1495, 1402, 1357, 1326, 1251, 1173, 1156, 1122, 1098, 1071, 1039 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₁ H ₁₀ Cl ₂ N ₂ O ₅ S	% C = 37,41; % H = 2,85; % N = 7,93
	Izmerjene vrednosti	% C = 35,92; % H = 2,41; % N = 7,84

4.5. SPLOŠNI POSTOPEK SINTEZE SPOJIN **5a–g**

Spojine **4a–g** (1 eq) smo raztopili v DKM (10–30 mL), dodali katalitično količino DMF (0,15 eq) ter postopoma dokapali oksalil klorid (3 eq) ter mešali reakcijsko zmes pri sobni temperaturi 1 do 2 uri. K spojini **4d** smo pred dokapavanjem oksalil klorida dodali še piridin (3 eq). Topilo in prebitni oksalil klorid smo po pretečenem času uparili ter zaostanek po uparevanju raztopili v brezvodnem DKM (10–20 mL). Raztopini smo nato dodali spojino **3a** (0,90–0,95 eq) in piridin (3 eq) ter zmes mešali čez noč (16–24 ur). Reakcijsko zmes smo ekstrahirali z 1M HCl (2 × 20 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (1 × 20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 50 mL), sušili z Na₂SO₄ ter uparili topilo. Surovi produkt smo očistili po postopku, ki je naveden pri posamezni spojini.

2,4-dikloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-(tiazolidin-3-ilsulfonil)benzamid (5a)

Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/1).

2,4-dikloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-(tiazolidin-3-ilsulfonil)benzamid (5a)		M = 502,46 g/mol
<i>Izgled:</i> svetlo rumeni kristali		<i>T_{tal}:</i> 245–247 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,56		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 41 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,86–1,90 (m, 4H, CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂), 2,64 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 2,72 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 3,04 (t, <i>J</i> = 6,4 Hz, 2H, NCH ₂ CH ₂ S), 3,78 (t, <i>J</i> = 6,4 Hz, 2H, NCH ₂ CH ₂ S), 4,60 (s, 2H, NCH ₂ S), 7,73 (s, 1H, Ar-H), 8,63 (s, 1H, Ar-H), 9,60 (bs, 1H, NH)	
¹³ C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 21,69; 22,58, 23,43; 23,56; 30,71; 50,28; 50,85; 94,54; 113,97; 128,49; 131,37; 131,82; 132,86; 133,65; 133,75; 135,10; 136,19; 145,42; 162,13	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₉ H ₁₈ Cl ₂ N ₃ O ₃ S ₃ [M+(H)] ⁺ (m/z): 501,9887, izmerjena vrednost: 501,9891	
IR (KBr)	3446, 3177, 3073, 2948, 2228, 1682, 1579, 1563, 1448, 1362, 1331, 1287, 1262, 1237, 1166, 1117, 1078, 1033 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₉ H ₁₇ Cl ₂ N ₃ O ₃ S ₃	% C = 45,42; % H = 3,41; % N = 8,36
	Izmerjene vrednosti	% C = 45,49; % H = 3,22; % N = 8,22

2,4-dikloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiefen-2-il)-5-(2-metilpiperidin-1-ilsulfonil)benzamid (5b)

Surovi produkt smo očistili s prekrizalizacijo iz 30 mL absolutnega etanola. Izpadle kristale smo posušili v sušilniku pri 60 °C do suhega.

2,4-dikloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiefen-2-il)-5-(2-metilpiperidin-1-ilsulfonil)benzamid (5b)		M = 512,47 g/mol
<i>Izgled:</i> svetlo rjavi kristali		<i>T_{tal}:</i> 227–228 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,69 <i>Izkoristek reakcije:</i> 48 %		
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,23 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz, 3H, CH ₃), 1,52–1,69 (m, 6H, CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH ₂ CH), 1,85–1,90 (m, 4H, CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂), 2,62–2,65 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 2,70–2,72 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 3,17 (td, <i>J</i> ₁ = 13,2, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 1H, NCH _A H _B CH ₂), 3,70 (dd, <i>J</i> ₁ = 14,0, <i>J</i> ₂ = 1,2 Hz, 1H, NCH _A H _B CH ₂), 4,17–4,23 (m, 1H, CH), 7,69 (s, 1H, Ar-H), 8,63 (s, 1H, Ar-H), 9,58 (bs, 1H, NH)	
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 15,89; 17,60; 21,70; 22,59; 23,44; 23,57; 25,26; 29,89; 40,28 (pod signalom topila); 48,30; 94,61; 113,96; 128,51; 131,36; 131,75; 132,65; 133,25; 133,53; 135,56; 136,47; 145,40; 162,28	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₂ H ₂₄ Cl ₂ N ₃ O ₃ S ₂ [M+(H)] ⁺ (m/z): 512,0636, izmerjena vrednost: 512,0635	
IR (KBr)	3248, 3200, 3083, 2938, 2868, 2225, 1678, 1580, 1469, 1446, 1385, 1331, 1290, 1260, 1244, 1223, 1196, 1162, 1147, 1115, 1083, 1056, 1030, 1012 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₂₂ H ₂₃ Cl ₂ N ₃ O ₃ S ₂	% C = 51,56; % H = 4,52; % N = 8,20
	Izmerjene vrednosti	% C = 51,54; % H = 4,30; % N = 8,18

2,4-dikloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-(tiomorfolinosulfonil)benzamid (5c)

Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/2) ter nato še s prekrizalizacijo iz etanola.

2,4-dikloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-(tiomorfolinosulfonil)benzamid (5c)		M = 516,48 g/mol
Izgled: svetlo oranžni igličasti kristali		T_{tal}: 252–254 °C
TLC: R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,50		
Izkoristek reakcije: 25 %		
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,84–1,89 (m, 4H, CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂), 2,61 (t, J = 4,8 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 2,69–2,71 (m, 6H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b} + CH ₂ SCH ₂), 3,62 (t, J = 4,8 Hz, 4H, CH ₂ NCH ₂), 7,69 (s, 1H, Ar-H), 8,54 (s, 1H, Ar-H), 9,58 (s, 1H, NH)	
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 22,04; 23,01; 23,98; 24,03; 27,54; 47,78; 95,07; 114,05; 129,79; 130,98; 131,56; 133,74; 134,26; 135,64; 135,91; 136,56; 145,50; 160,09	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₀ H ₂₀ Cl ₂ N ₃ O ₃ S ₃ [M+(H)] ⁺ (m/z): 516,0044, izmerjena vrednost: 516,0050	
IR (KBr)	3448, 3303, 3094, 2944, 2914, 2860, 2214, 1694, 1573, 1549, 1449, 1357, 1342, 1329, 1292, 1281, 1264, 1153, 1118, 1083, 1068, 1024 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₂₀ H ₁₉ Cl ₂ N ₃ O ₃ S ₃	% C = 46,51; % H = 3,71; % N = 8,14
	Izmerjene vrednosti	% C = 46,71; % H = 3,58; % N = 8,23

***tert*-butil 2-(2,4-dikloro-5-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilkarbamoil)fenil sulfonamido)etilkarbammat (**5d**)**

Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/2).

<i>tert</i>-butil 2-(2,4-dikloro-5-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-ilkarbamoil)fenilsulfonamido)etilkarbammat (5d)		M = 573,51 g/mol
<i>Iz</i>gled: beli kristali		<i>T</i>_{tal}: 196–198 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,40		
<i>Iz</i>koristek reakcije: 24 %		
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,43 (s, 9H, 3 × CH ₃), 1,85–1,90 (m, 4H, CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂), 2,63 (t, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 2,70 (t, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 3,06 (q, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, SO ₂ NHCH ₂), 3,23 (q, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, CONHCH ₂), 4,95 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 1H, SO ₂ NH), 6,21 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 1H, OCONH), 7,61 (s, 1H, Ar-H), 8,31 (s, 1H, Ar-H), 10,04 (bs, 1H, NHCO-Ar)	
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 22,10; 23,05; 24,01; 24,06; 28,35; 40,24; 43,44; 79,99; 94,88; 114,59; 129,62; 131,57; 132,12; 132,61; 132,90; 134,42; 136,12; 136,57; 145,83; 156,34; 161,00	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₃ H ₂₅ Cl ₂ N ₄ O ₅ S ₂ [M-(H)] ⁻ (m/z): 571,0643, izmerjena vrednost: 571,0644	
IR (KBr)	3414, 3077, 2974, 2227, 1683, 1637, 1616, 1579, 1481, 1447, 1400, 1383, 1369, 1347, 1327, 1286, 1259, 1167, 1105, 1078 cm ⁻¹	

Etil 1-(2,4-dikloro-5-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenilsulfonyl)piperidin-4-karboksilat (5e)

Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/4) in s prekrizalizacijo iz etanola.

etil 1-(2,4-dikloro-5-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenilsulfonyl)piperidin-4-karboksilat (5e)		M = 570,51 g/mol
Izgled: rumeni prizmatični kristali		T_{tal}: 228–229 °C
TLC: R _f (EtOAc/Hex = 1/4) = 0,14		
Izkoristek reakcije: 83 %		
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,25 (t, J = 7,2 Hz, 3H, CH ₃ CH ₂), 1,73–1,80 (m, 2H, CHCH _{2(a)}), 1,82–1,88 (m, 4H, CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂), 1,96–2,00 (m, 2H, CH _{2(b)} CH), 2,38–2,45 (m, 1H, CH), 2,61 (t, J = 5,2 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 2,80 (t, J = 5,2 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 2,92–2,99 (m, 2H, CH _{2(a)} NCH _{2(b)}), 3,77 (dt, J ₁ = 13,2, J ₂ = 4,0 Hz, 2H, CH _{2(a)} NCH _{2(b)}), 4,14 (q, J = 7,2 Hz, 2H, CH ₃ CH ₂), 7,68 (s, 1H, Ar-H), 8,52 (s, 1H, Ar-H), 9,62 (bs, 1H, NH)	
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 14,17; 22,05; 23,02; 23,97; 24,03; 27,79; 40,09; 45,07; 60,79; 95,03; 114,04; 129,70; 131,05; 131,57; 133,69; 134,10; 135,77; 135,82; 136,38; 145,56; 160,29; 173,74	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₄ H ₂₆ Cl ₂ N ₃ O ₅ S ₂ [M+(H)] ⁺ (m/z): 570,0691, izmerjena vrednost: 570,0702	
IR (KBr)	3447, 3254, 3189, 3082, 2934, 2865, 2227, 1733, 1690, 1574, 1559, 1449, 1349, 1376, 1324, 1304, 1285, 1258, 1204, 1161, 1120, 1080, 1060, 1038 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₂₄ H ₂₅ Cl ₂ N ₃ O ₅ S ₂	% C = 50,53; % H = 4,42; % N = 7,37
	Izmerjene vrednosti	% C = 50,68; % H = 4,25; % N = 7,53

2,4-dikloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-(4-oksopiperidin-1-ilsulfonil)benzamid (5f**)**

Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/2) ter ga nato prekristalizirali še iz EtOH.

2,4-dikloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-(4-oksopiperidin-1-ilsulfonil)benzamid (5f)		M = 512,43 g/mol
Izgled: oranžni igličasti kristali		T_{tal}: 239–241 °C
TLC: R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,19		
Izkoristek reakcije: 39 %		
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,84–1,88 (m, 4H, CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂), 2,58 (t, J = 6,2 Hz, 4H, CH ₂ COCH ₂), 2,60–2,62 (t, J = 4,8 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 2,69 (t, J = 4,8 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 3,69 (t, J = 6,2 Hz, 4H, CH ₂ NCH ₂), 7,71 (s, 1H, Ar-H), 8,59 (s, 1H, Ar-H), 9,63 (s, 1H, NH)	
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 22,03; 23,01; 23,98; 24,04; 41,48; 45,49; 95,18; 114,05; 129,88; 131,08; 131,58; 133,86; 134,19; 135,81; 136,19; 136,44; 145,41; 159,95; 205,38	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ N ₃ O ₄ S ₂ [M+(H)] ⁺ (m/z): 512,0272, izmerjena vrednost: 512,0288	
IR (KBr)	3432, 3247, 3197, 3084, 2997, 2937, 2843, 2225, 1726, 1676, 1575, 1465, 1447, 1408, 1366, 1337, 1305, 1285, 1260, 1247, 1224, 1170, 1120, 1078, 1038 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₂₁ H ₁₉ Cl ₂ N ₃ O ₄ S ₂ x 0,5 H ₂ O	% C = 48,37; % H = 3,87; % N = 8,06
	Izmerjene vrednosti	% C = 48,46; % H = 3,53; % N = 7,94

2,4-dikloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-(3-oksopiperazin-1-ilsulfonil)benzamid (5g)

Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = 4 % MeOH v DKM) ter s prekrystalizacijo iz EtOH.

2,4-dikloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-(3-oksopiperazin-1-ilsulfonil)benzamid (5g)		M = 513,42 g/mol
Izgled: svetlo rumeni kristali		T_{tal}: 211–213 °C
TLC: R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,50 Izkoristek reakcije: 30 %		
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,82–1,90 (m, 4H, CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂), 2,62 (bs, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 2,69 (bs, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 3,43–3,47 (m, 2H, NCH ₂ CH ₂), 3,62–3,64 (m, 2H, NCH ₂ CH ₂ NH), 3,97 (s, 2H, NCH ₂ CO), 6,25 (bs, 1H, CH ₂ NHCO), 7,71 (s, 1H, Ar-H), 8,55 (s, 1H, Ar-H), 9,86 (bs, 1H, NH)	
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 21,67; 22,57; 23,42; 23,55; 40,37; 42,01; 47,59; 94,59; 113,94; 128,50; 131,35; 131,95; 132,82; 133,40; 133,78; 134,51; 136,19; 145,42; 162,14; 164,61	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₀ H ₁₉ Cl ₂ N ₄ O ₄ S ₂ [M+(H)] ⁺ (m/z): 513,0225, izmerjena vrednost: 513,0225	
IR (KBr)	3253, 3196, 3085, 2934, 2226, 1682, 1575, 1560, 1493, 1448, 1339, 1286, 1260, 1166, 1132, 1116, 1096, 1078, 1037 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₂₀ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ O ₄ S ₂	% C = 46,79; % H = 3,53; % N = 10,91
	Izmerjene vrednosti	% C = 46,97; % H = 3,55; % N = 10,53

4.5.1. Sinteza 2,4-dikloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-(4-hidroksi piperidin-1-ilsulfonil)benzamida (**5h**)

Spojino **5f** (0,18 g, 0,35 mmol, 1 eq) smo raztopili v mešanici DKM in EtOH (volumsko razmerje 1/1, 20 mL) ter raztopino ohladili na ledeni kopeli. Nato smo ji dodali NaBH₄ (0,027 g, 0,70 mmol, 2 eq) ter zmes mešali pri sobni temperaturi 3 ure. Topilo smo po tem času uparili in raztopili suh preostanek v 20 mL EtOAc. Organsko fazo smo sprali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (1 × 20 mL), nasičeno raztopino NaCl (1 × 20 mL), posušili z Na₂SO₄ in uparili topilo. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/1).

2,4-dikloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-(4-hidroksipiperidin-1-ilsulfonil)benzamid (5h)		M = 514,45 g/mol
<i>Izgled:</i> blede rumeni kristali		<i>T_{tal}:</i> 217–219 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,20		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 67 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,54 (d, <i>J</i> = 3,4 Hz, 1H, CH-OH), 1,60–1,66 (m, 2H, CH _{2a} CHCH ₂), 1,83–1,88 (m, 4H, CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂), 1,90–1,97 (m, 2H, CH _{2a} CHCH _{2b}), 2,61 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 2,68–2,70 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 3,16–3,22 (m, 2H, CH _{2a} NCH _{2b}), 3,56–3,61 (m, 2H, CH _{2a} NCH _{2b}), 3,88–3,92 (m, 1H, CH), 7,68 (s, 1H, Ar-H), 8,52 (s, 1H, Ar-H), 9,62 (s, 1H, NHCO)	
¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 22,04; 23,02; 23,99; 24,04; 33,64; 42,88; 66,95; 95,16; 114,08; 129,79; 130,69; 131,56; 133,80; 134,32; 135,55; 136,03; 136,64; 145,41; 160,04	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₁ H ₂₂ Cl ₂ N ₃ O ₄ S ₂ [M+(H)] ⁺ (m/z): 514,0429, izmerjena vrednost: 514,0416	
IR (KBr)	3260, 3085, 2931, 2215, 1678, 1572, 1447, 1406, 1329, 1286, 1259, 1157, 1077, 1039 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₂₁ H ₂₁ Cl ₂ N ₃ O ₄ S ₂	% C = 49,03; % H = 4,11; % N = 8,17
	Izmerjene vrednosti	% C = 48,79; % H = 4,14; % N = 7,78

4.5.2. Sinteza 2-(2,4-dikloro-5-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenilsulfonamido)etanamonijevega klorida (**5i**)

Raztopini spojine **5d** (0,095 g, 0,17 mmol, 1 eq) v 10 mL DKM smo dodali trifluoroacetno kislino (0,6 mL, 8,08 mmol, 49 eq) in zmes mešali pri sobni temperaturi eno uro. Topilo smo uparili in dodali 1M HCl v EtOAc (3 mL). Nastalo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem, jo sprali z EtOAc in posušili v eksikatorju.

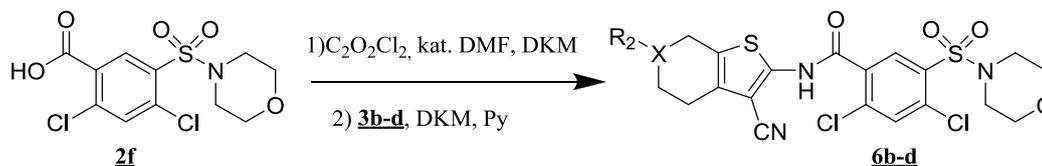
2-(2,4-dikloro-5-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenilsulfonamido)etanamonijev klorid (5i)		M = 509,86 g/mol
<i>Izgled:</i> svetlo rjavi kristali		<i>T_{tal}:</i> 204–206 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,00		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 100 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CD ₃ OD)	δ (ppm) = 1,85–1,93 (m, 4H, CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂), 2,62 (t, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 2,72 (t, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 3,10 (t, <i>J</i> = 6,0 Hz, 2H, SO ₂ NHCH ₂), 3,22 (t, <i>J</i> = 6,0 Hz, 2H, CH ₂ NH ₂), 7,94 (s, 1H, Ar-H), 8,28 (s, 1H, Ar-H), CONH in NH ₃ ⁺ izmenljivi	
¹³ C-NMR (100 MHz, CD ₃ OD)	δ (ppm) = 23,31; 24,23; 24,91; 25,09; 40,77; 41,13; 97,21; 114,61; 131,01; 133,05; 133,15; 134,25; 134,82; 135,66; 137,55; 137,99; 146,59; 164,12	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₈ H ₁₈ Cl ₂ N ₄ O ₃ S ₂ [M+(H)] ⁺ (m/z): 473,0276, izmerjena vrednost: 473,0268	
IR (KBr)	3437, 2928, 2361, 2228, 1671, 1582, 1448, 1334, 1295, 1174, 1084, 1034 cm ⁻¹	
HPLC	t _R = 11,977 min (100 % pri 220 nm; 100 % pri 254 nm)	

4.5.3. Sinteza 1-(2,4-dikloro-5-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenilsulfonyl)piperidin-4-karboksilne kisline (**5j**)

Raztopini spojine **5e** (0,250 g, 0,44 mmol, 1 eq) v mešanici topil dioksan/voda v volumskem razmerju 1/1 (4 mL) smo dodali trden KOH (0,098 g, 1,75 mmol, 4 eq) in raztopino mešali pri sobni temperaturi 2 uri. Dioksan smo uparili ter nakisali preostalo vodno fazo z 32 % HCl do pH = 1. Izpadlo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in jo prekrizalizirali iz etanola.

1-(2,4-dikloro-5-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenilsulfonyl)piperidin-4-karboksilna kislina (5j)		M = 542,46 g/mol
<i>Izgled:</i> blede rumeni kristali		<i>T_{tal}:</i> 246–248 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/MeOH = 1/1 + 0,3 % očetne kisline) = 0,63		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 77 %		
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 1,46–1,56 (m, 2H, CHCH _{2a}), 1,75–1,83 (m, 4H, CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂), 1,87–1,91 (m, 2H, CH _{2b} CH), 2,39–2,46 (m, 1H, CH), 2,53 (bs, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b} , pod signalom topila), 2,64 (bs, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 2,89–2,95 (m, 2H, CH ₂ NCH _{2a}), 3,64–3,67 (m, 2H, CH ₂ NCH ₂), 8,11 (s, 1H, Ar-H), 8,15 (s, 1H, Ar-H), 12,36 (bs, 1H, NH), COOH izmenljiv	
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 21,69; 22,58; 23,43; 23,56; 27,67; signal pod signalom za topilo, 44,67; 94,66; 113,95; 128,54; 131,38; 131,78; 132,78; 133,40; 133,75; 134,94; 135,78; 145,40; 162,24; 175,26	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₂ H ₂₂ Cl ₂ N ₃ O ₅ S ₂ [M+(H)] ⁺ (m/z): 542,0378, izmerjena vrednost: 542,0390	
IR (KBr)	3550, 3434, 3189, 3082, 2932, 2229, 1723, 1677, 1626, 1574, 1448, 1403, 1381, 1331, 1285, 1257, 1220, 1168, 1120, 1080, 1063, 1034, 1015 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₂₂ H ₂₁ Cl ₂ N ₃ O ₅ S ₂	% C = 48,71; % H = 3,90; % N = 7,75
	Izmerjene vrednosti	% C = 47,66; % H = 3,90; % N = 6,95

4.6. SINTEZA SULFONAMIDNIH ZAVIRALCEV S SUBSTITUCIJO NA MESTU 6 NASIČENEGA OBROČA AMINOTIOFENA (**6b-d**)



Slika 13: Sinteza zaviralcev s spremembami na mestu 6 aminotiofenov (za substituenti R^2 in X glej tabelo II)

4-(3-ciano-2-(2,4-dikloro-5-(morfolinosulfonil)benzamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-6-il)fenil acetat (**6b**)

Spojino **6b** smo sintetizirali po splošnem postopku, ki je opisan v poglavju »Splošni postopek sinteze spojin **5a-g**«, pri čemer smo namesto spojine **3a** uporabili spojino **3b**. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/2) in s prekrizalizacijo iz etanola.

4-(3-ciano-2-(2,4-dikloro-5-(morfolinosulfonil)benzamido)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-6-il)fenil acetat (6b)		M = 634,55 g/mol
<i>Izgled:</i> beli igličasti kristali		<i>T_{tal}:</i> 259–262 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,44		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 57 %		
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,99 (qd, $J_1 = 10,8$, $J_2 = 5,6$ Hz, 1H, CHCH _A H _B CH ₂), 2,17–2,25 (m, 1H, CHCH _A H _B CH ₂), 2,33 (s, 3H, CH ₃), 2,70–2,85 (m, 3H, CHCH ₂ CH ₂), 2,98–3,12 (m, 2H, CH ₂ CH), 3,34 (t, $J = 4,8$ Hz, 4H, (CH ₂) ₂ N-morfolin), 3,76 (t, $J = 4,8$ Hz, 4H, (CH ₂) ₂ -morfolin), 7,08 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,28 (d, $J = 8,4$ Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,74 (s, 1H, Ar-H), 8,54 (s, 1H, Ar-H), 9,70 (bs, 1H, NH)	
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 21,18; 24,29; 29,36; 31,85; 40,22; 45,89; 66,45; 94,73; 113,95; 121,71; 127,85; 129,06; 131,23; 131,32; 133,82; 134,19; 135,52; 135,82; 136,26; 142,45; 146,10; 149,29; 160,39; 169,68	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₈ H ₂₆ Cl ₂ N ₃ O ₆ S ₂ [M+(H)] ⁺ (m/z): 634,0640, izmerjena vrednost: 634,0657	
IR (KBr)	3448, 3249, 3189, 3080, 2985, 2924, 2860, 2224, 1763, 1687, 1575, 1558, 1508, 1447, 1365, 1329, 1282, 1262, 1198, 1167, 1114, 1085, 1069, 1018, 1006 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₂₈ H ₂₅ Cl ₂ N ₃ O ₆ S ₂	% C = 53,00; % H = 3,97; % N = 6,62
	Izmerjene vrednosti	% C = 53,35; % H = 3,69; % N = 6,54

2,4-dikloro-N-(3-ciano-6-(4-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-(morfolinosulfonil)benzamid (6c)

Spojino **6c** smo sintetizirali po splošnem postopku, ki je opisan v poglavju »**Splošni postopek sinteze spojin 5a–g**«, pri čemer smo namesto spojine **3a** uporabili spojino **3c**. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/2) in s prekrystalizacijo iz etanola.

2,4-dikloro-N-(3-ciano-6-(4-metoksifenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-(morfolinosulfonil)benzamid (6c)		M = 606,54 g/mol
<i>Izgled:</i> beli kristali		<i>T_{tal}:</i> 245–247 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,20		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 17 %		
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,95 (qd, <i>J</i> ₁ = 12,0, <i>J</i> ₂ = 5,6 Hz, 1H, CHCH _A H _B CH ₂), 2,13–2,20 (m, 1H, CHCH _A H _B CH ₂), 2,67–2,83 (m, 2H, CHCH ₂), 2,94–3,01 (m, 3H, CHCH ₂ CH ₂), 3,32 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 4H, (CH ₂) ₂ N-morfolin), 3,73 (t, <i>J</i> = 5,2 Hz, 4H, (CH ₂) ₂ -morfolin), 3,81 (s, 3H, CH ₃), 6,88 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,18 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,72 (s, 1H, Ar-H), 8,54 (s, 1H, Ar-H), 9,64 (bs, 1H, NH)	
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 24,36; 29,56; 32,02; 39,91; 45,89; 55,32; 66,46; 94,85; 114,02; 127,77; 129,42; 131,02; 131,34; 133,88; 134,38; 134,62; 135,67; 135,96; 130,10; 137,06; 145,92; 158,31; 160,18	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₇ H ₂₆ Cl ₂ N ₃ O ₅ S ₂ [M+(H)] ⁺ (m/z): 606,0691, izmerjena vrednost: 606,0691	
IR (KBr)	3186, 3080, 2969, 2226, 1672, 1579, 1514, 1448, 1362, 1334, 1284, 1246, 1174, 1128, 1112, 1084, 1070, 1034 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₂₇ H ₂₅ Cl ₂ N ₃ O ₅ S ₂	% C = 53,47; % H = 4,15; % N = 6,93
	Izmerjene vrednosti	% C = 53,56; % H = 3,82; % N = 6,88

2,4-dikloro-N-(3-ciano-6-(4-nitrofenil)-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridin-2-il)-5-(morfolinosulfonyl)benzamid (6d**)**

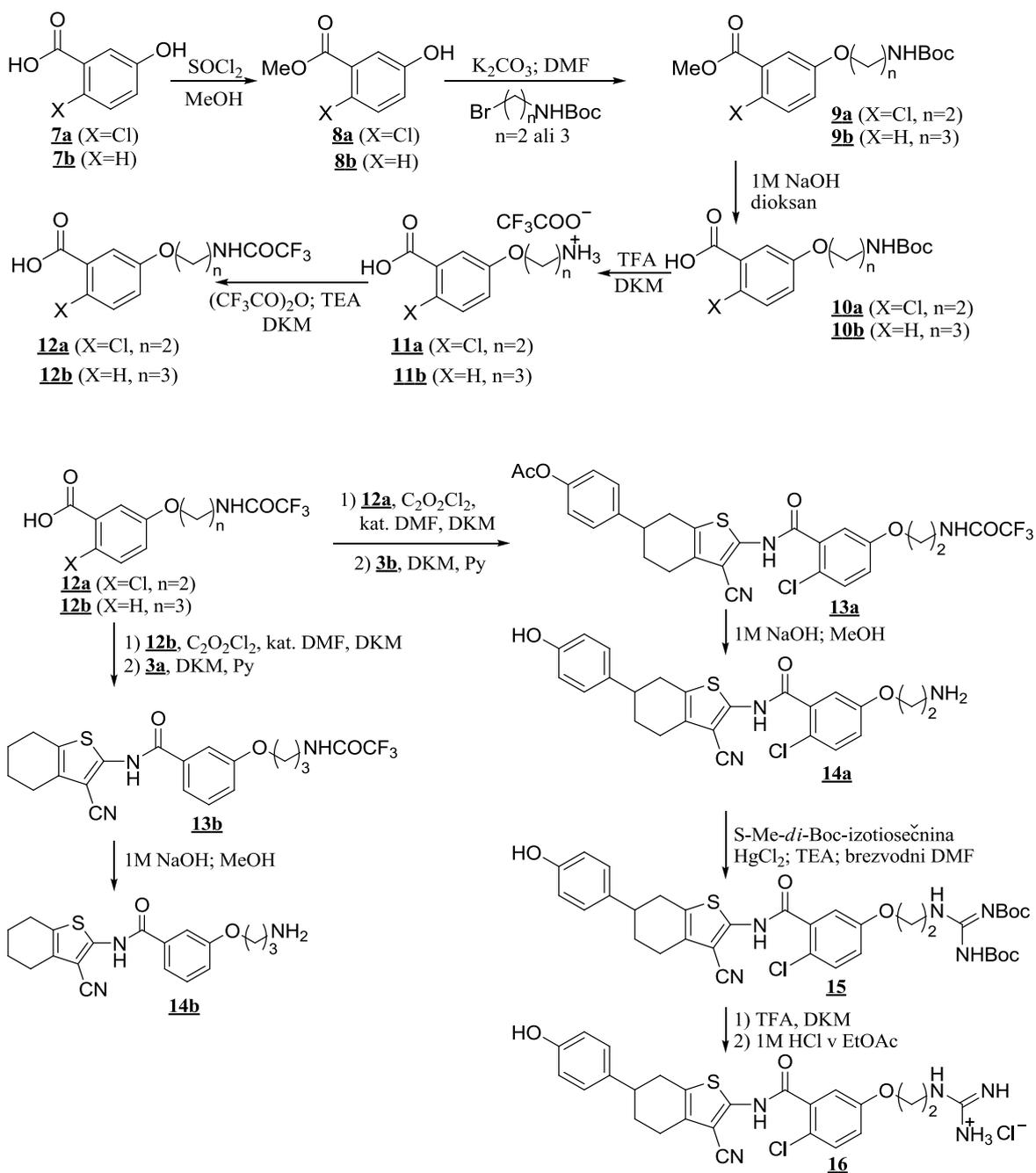
Spojino **6d** smo sintetizirali po splošnem postopku, ki je opisan v poglavju »Splošni postopek sinteze spojin **5a–g**«, pri čemer smo namesto spojine **3a** uporabili spojino **3d**, pred dodatkom aminotiofena pa smo zmes tudi ohladili na ledeni kopeli. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/2) in s prekrystalizacijo iz etanola.

2,4-dikloro-N-(3-ciano-6-(4-nitrofenil)-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridin-2-il)-5-(morfolinosulfonyl)benzamid (6d)		M = 622,50 g/mol
<i>Izgled:</i> oranžni kristali		<i>T_{tal}:</i> 253–255 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,30		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 3 %		
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 2,76 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ N), 3,22 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 4H, (CH ₂) ₂ N-morfolin), 3,63 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 4H, (CH ₂) ₂ -morfolin), 3,89 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ N), 4,70 (s, 2H, NCH ₂ C), 7,15 (d, <i>J</i> = 9,5 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 8,09 (d, <i>J</i> = 9,5 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 8,15 (s, 1H, Ar-H), 8,18 (s, 1H, Ar-H), 12,53 (s, 1H, NH)	
¹³C-NMR (100 MHz, Py-d ₅)	δ (ppm) = 25,83; 46,73; 48,03; 48,11; 68,44; 97,44; 115,23; 116,14; 127,73; 128,28; 133,25; 135,19; 135,64; 136,29; 136,89; 137,09; 138,96; 140,65; 150,00; 156,36; 165,29	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₅ H ₂₂ Cl ₂ N ₅ O ₆ S ₂ [M+(H)] ⁺ (m/z): 622,0389, izmerjena vrednost: 622,0416	
IR (KBr)	3438, 3191, 3080, 2917, 2857, 2225, 1680, 1628, 1590, 1509, 1450, 1407, 1317, 1262, 1225, 1164, 1114, 1068 cm ⁻¹	
HPLC	t _R = 14,872 min (96,19 % pri 220 nm; 100 % pri 254 nm)	

4.6.1. Sinteza 2,4-dikloro-N-(3-ciano-6-(4-hidroksifenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiefen-2-il)-5-(morfolinosulfonil)benzamida (**1c**)

Spojino **6c** (175 mg, 0,29 mmol, 1 eq) smo raztopili v 8 ml brezvodnega DKM, bučko prepihali z argonom, raztopino ohladili na zmesi acetona, zdrobljenega ledu in NaCl na $-23\text{ }^{\circ}\text{C}$ ter postopoma dokapali 870 μL 1M BBr_3 v DKM, pri čemer je prišlo do oranžnega obarvanja raztopine. Po dodatku reagenta smo zmes mešali 20 ur ob postopnem spontanem segrevanju zmesi do $12\text{ }^{\circ}\text{C}$ v argonovi atmosferi. Nato smo zmes ohladili na $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$, dodali 3 mL MeOH, mešali 0,5 ure ter uparili topilo. Zaostanek smo raztopili v EtOAc (20 mL) ter ga sprali s 30 mL nasičene raztopine NaHCO_3 , sušili z Na_2SO_4 ter uparili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/1).

2,4-dikloro-N-(3-ciano-6-(4-hidroksifenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiefen-2-il)-5-(morfolinosulfonil)benzamid (1c)		M = 592,51 g/mol
<i>Izgled:</i> svetlo rumeni kristali		<i>T_{tal}:</i> 297–299 $^{\circ}\text{C}$
<i>TLC:</i> Rf (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,32		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 24 %		
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 1,83–1,93 (m, 1H, $\text{CHCH}_A\text{H}_B\text{CH}_2$), 1,99–2,03 (m, 1H, $\text{CHCH}_A\text{H}_B\text{CH}_2$), 2,65–2,73 (m, 3H, CHCH_2CH_2), 2,87–2,94 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CHCH}_2\text{CH}_2$), 3,23 (t, $J = 4,7$ Hz, 4H, $(\text{CH}_2)_2\text{N}$ -morfolin), 3,64 (t, $J = 4,7$ Hz, 4H, $(\text{CH}_2)_2$ -morfolin), 6,72 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, 2 x Ar-H), 7,12 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, 2 x Ar-H), 8,15 (s, 1H, Ar-H), 8,16 (s, 1H, Ar-H), 9,24 (s, 1H, OH), 12,39 (bs, 1H, NHCO)	
¹³C-NMR (100 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 24,00; 29,27; 31,42; 45,48; 65,69; 94,18; 113,98; 115,09; 127,68; 128,33; 131,05; 131,94; 132,86; 133,53; 133,80; 133,91; 135,47; 136,01; 145,71; 155,74; 162,20	
ESI-HRMS	Izračunano za $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{S}_2$ $[\text{M}-(\text{H})]^-$ (m/z): 590,0378, izmerjena vrednost: 590,0394	
IR (KBr)	3328, 3182, 3078, 2994, 2925, 2228, 1672, 1579, 1515, 1450, 1357, 1339, 1287, 1262, 1223, 1169, 1132, 1100, 1085, 1069, 1011 cm^{-1}	
Elementna analiza	Izračunano za $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{Cl}_2\text{N}_3\text{O}_5\text{S}_2$	% C = 52,70; % H = 3,91; % N = 7,09
	Izmerjene vrednosti	% C = 52,48; % H = 3,89; % N = 6,84

4.7. SINTEZA ETRSKIH DERIVATOV CIANOTIOFENOV (**13a–b**, **14a–b**, **15–16**)

Slika 14: Shema sinteze etrskih derivatov

4.7.1. Sinteza metil 2-kloro-5-hidroksibenzoata (**8a**) in metil 3-hidroksi benzoata (**8b**)

2-Kloro-5-hidroksibenzojsko kislino (**7a**, 1 eq) oziroma 3-hidroksibenzojsko kislino (**7b**, 1 eq) smo raztopili v metanolu, ohladili na ledeni kopeli in s kapalnikom postopoma dodali tionil klorid (2 eq). Zmes smo najprej mešali 1 uro pri sobni temperaturi ter nato 1 uro pri 75 °C. Zmesi smo uparili topilo, trdnemu zaostanku dodali 50 mL EtOAc, nevtralizirali kislino s 50 mL nasičene raztopine NaHCO₃ ter vodno fazo še enkrat sprali z EtOAc. Združeni organski fazi smo sprali z nasičeno raztopino NaCl, sušili z Na₂SO₄ in uparili topilo.

Metil 2-kloro-5-hidroksibenzoat (8a)		M = 186,59 g/mol
<i>Izgled:</i> beli kristali		<i>T_{tal}:</i> 96–97 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,54		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 99 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 3,91 (s, 3H, OCH ₃), 6,91 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,7, <i>J</i> ₂ = 3,1 Hz, Ar-H), 7,27 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 1H, Ar-H), 7,31 (d, <i>J</i> = 3,1 Hz, 1H, Ar-H)	
¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 52,79; 118,15; 120,33; 124,67; 130,25; 132,14; 154,51; 166,77	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₈ H ₈ ClO ₃ [M+(H)] ⁺ (m/z): 187,0162, izmerjena vrednost: 187,0155	
IR (KBr)	3411, 3312, 3066, 2948, 1699, 1598, 1489, 1440, 1314, 1259, 1239, 1117, 1046 cm ⁻¹	
HPLC	t _R = 10,618 min (100 % pri 220 nm; 100 % pri 254 nm)	

Metil 3-hidroksibenzoat (8b)		M = 152,15 g/mol
<i>Izgled:</i> beli kristali		<i>T_{tal}:</i> 70–72 °C [lit. (35)]
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,54		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 99 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 3,95 (s, 3H, CH ₃), 5,83 (s, 1H, OH), 7,10 (ddd, <i>J</i> ₁ = 8,4, <i>J</i> ₂ = 2,8, <i>J</i> ₃ = 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,34 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,35 (d, <i>J</i> = 3,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,61 (t, <i>J</i> = 1,2 Hz, 1H, Ar-H)	

4.7.2. Sinteza metil 3-(2-(*tert*-butoksikarbonilamino)propoksi)benzoata (**9b**) in metil 5-(2-(*tert*-butoksikarbonilamino)etoksi)-2-klorobenzoata (**9a**)

Pri sintezi smo izhajali iz spojin **8a** in **8b** (1 eq), kateri smo raztopili v brezvodnem DMF (10 mL), dodali K₂CO₃ (2 eq), zmes mešali 15 minut pri sobni temperaturi, nato dodali ustrezen predhodno sintetiziran Boc-zaščiten aminoalkil bromid (1,1 eq) ter mešali čez noč pri 80 °C. Zmesi smo uparili DMF, zaostanek raztopili v 50 mL EtOAc, raztopino sprali z vodo (2 × 50 mL), 0,1M NaOH (1 × 50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 50 mL), sušili z Na₂SO₄ ter uparili topilo. Spojini smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/3).

Metil 5-(2-(<i>tert</i>-butoksikarbonilamino)etoksi)-2-klorobenzoat (9a)		M = 329,78 g/mol
<i>Izgled:</i> brezbarvno olje		<i>T_{tal}:</i> /
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/3) = 0,58		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 73 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,47 (s, 9H, 3 × CH ₃), 3,56 (q, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H, OCH ₂ CH ₂ NH), 3,95 (s, 3H, CH ₃), 4,05 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, OCH ₂ CH ₂ NH), 4,98 (bs, 1H, NHCO), 6,98 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,8, <i>J</i> ₂ = 2,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,36 (s, 1H, Ar-H), 7,37 (d, <i>J</i> = 6,0 Hz, 1H, Ar-H)	
¹³ C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 28,38; 39,95; 52,53; 67,71; 79,72; 116,72; 119,22; 125,39; 130,56; 131,95; 155,83; 156,88; 165,87	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₅ H ₂₁ ClNO ₅ [M+(H)] ⁺ (m/z): 330,1108, izmerjena vrednost: 330,1103	
IR (NaCl)	3384, 3075, 2977, 2952, 2881, 1714, 1598, 1570, 1517, 1481, 1437, 1394, 1366, 1319, 1296, 1251, 1121, 1040, 1009 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₅ H ₂₀ ClNO ₅	% C = 54,63; % H = 6,11; % N = 4,25
	Izmerjene vrednosti	% C = 54,52; % H = 6,24; % N = 4,24

Metil 3-(2-(<i>tert</i>-butoksikarbonilamino)propoksi)benzoat (9b)		M = 309,16 g/mol
<i>Izgled:</i> brezbarvno olje		<i>T_{tal}:</i> / [lit. olje; (36)]
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/3) = 0,28		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 95 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,46 (s, 9H, 3 × CH ₃), 2,02 (p, <i>J</i> = 6,4 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 3,36 (q, <i>J</i> = 6,4 Hz, 2H, CH ₂ NHCO), 3,93 (s, 3H, CH ₃), 4,09 (t, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ O), 4,77 (bs, 1H, NHCO), 6,88 (ddd, <i>J</i> ₁ = 8,0, <i>J</i> ₂ = 2,4, <i>J</i> ₃ = 0,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,36 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,02 (dd, <i>J</i> ₁ = 2,4, <i>J</i> ₂ = 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,66 (ddd, <i>J</i> ₁ = 7,6, <i>J</i> ₂ = 1,2, <i>J</i> ₃ = 0,8 Hz, 1H, Ar-H)	

4.7.3. Sinteza 5-(2-(*tert*-butoksikarbonilamino)etoksi)-2-klorobenzojske kisline (**10a**) in 3-(2-(*tert*-butoksikarbonilamino)propoksi)benzojske kisline (**10b**)

Metilna estra **9a–b** (1 eq) smo raztopili v dioksanu (10 mL), dodali 1M NaOH (3 eq) ter mešali zmesi čez noč pri sobni temperaturi. Dioksan smo uparili, vodno fazo nakisali z 1M HCl do pH = 1, vodno fazo nadalje ekstrahirali z EtOAc (3 × 30 mL), združene organske faze sprali z 1M HCl (30 mL) in nasičeno raztopino NaCl, sušili z Na₂SO₄ ter uparili topilo.

5-(2-(<i>tert</i>-butoksikarbonilamino)etoksi)-2-klorobenzojska kislina (10a)		M = 315,75 g/mol
<i>Izgled</i> : beli kristali		<i>T_{tal}</i> : 117–119 °C
<i>TLC</i> : R _f (DKM/MeOH = 9/1 + 0,3 % očetne kisline) = 0,41		
<i>Izkoristek reakcije</i> : 98 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,48 (s, 9H, 3 × CH ₃), 3,58 (q, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H, CH ₂ NH), 4,07 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, OCH ₂), 5,03 (bs, 1H, NHCO), 7,03 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,0, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,40 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,52 (d, <i>J</i> = 2,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,64 (bs, 1H, COOH)	
¹³ C-NMR (100 MHz, aceton-d ₆)	δ (ppm) = 28,63; 40,51; 68,35; 78,98; 117,93; 119,83; 124,93; 132,34; 132,64; 156,77; 158,37; 166,56	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₄ H ₁₇ ClNO ₅ [M-(H)] ⁻ (m/z): 314,0795, izmerjena vrednost: 314,0800	
IR (KBr)	3403, 2981, 2576, 1717, 1669, 1605, 1572, 1527, 1478, 1464, 1430, 1394, 1366, 1275, 1252, 1207, 1162, 1110, 1077, 1053, 1037 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₁₄ H ₁₈ ClNO ₅	% C = 53,25; % H = 5,75; % N = 4,44
	Izmerjene vrednosti	% C = 53,20; % H = 5,67; % N = 4,42

3-(2-(<i>tert</i>-butoksikarbonilamino)propoksi)benzojska kislina (10b)		M = 295,33 g/mol
<i>Izgled</i> : beli igličasti kristali [lit. (36)]		<i>T_{tal}</i> : 144–146 °C
<i>TLC</i> : R _f (DKM/MeOH = 9/1 + 0,3 % očetne kisline) = 0,41		
<i>Izkoristek reakcije</i> : 97 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CD ₃ OD)	δ (ppm) = 1,45 (s, 9H, 3 × CH ₃), 1,97 (p, <i>J</i> = 6,4 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 3,26 (q, <i>J</i> = 6,8 Hz, 2H, CH ₂ NHCO), 4,08 (t, <i>J</i> = 6,4 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ O), 7,17 (ddd, <i>J</i> ₁ = 8,0, <i>J</i> ₂ = 2,8, <i>J</i> ₃ = 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,38 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,56 (dd, <i>J</i> ₁ = 2,4, <i>J</i> ₂ = 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,62 (ddd, <i>J</i> ₁ = 7,6, <i>J</i> ₂ = 1,6, <i>J</i> ₃ = 1,2 Hz, 1H, Ar-H), COOH in CONH izmenljiva	

4.7.4. Sinteza 2-(3-karboksi-4-klorofenoksi)etanamonijevega trifluoroacetata (**11a**) in 3-(3-karboksifenoksi)propan-1-amonijevega trifluoroacetata (**11b**)

Spojini **10a–b** (1 eq) smo raztopili v 30 mL DKM, dodali TFA (45 eq) in mešali pri sobni temperaturi 2 uri. Reakcijski zmesi smo uparili topilo in produkt brez predhodnega čiščenja uporabili v naslednji stopnji sinteze.

2-(3-karboksi-4-klorofenoksi)etanamonijev trifluoroacetat (11a)		M = 329,66 g/mol
<i>Izgled:</i> beli kristali		<i>T_{tal}:</i> 147–149 °C
<i>TLC:</i> R _f (DKM/MeOH = 9/1 + 0,3 % oetne kisline) = 0,12		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 97 %		
¹ H-NMR (400 MHz, aceton-d ₆)	δ (ppm) = 4,29 (t, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H, CH ₂ NH ₂), 4,51 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, OCH ₂), 7,17 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,8, <i>J</i> ₂ = 3,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,42 (d, <i>J</i> = 3,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,43 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H, Ar-H), COOH in NH ₃ ⁺ izmenljivi	

3-(3-karboksifenoksi)propan-1-amonijev trifluoroacetat (11b)		M = 309,24 g/mol
<i>Izgled:</i> brezbarvno olje		<i>T_{tal}:</i> /
<i>TLC:</i> R _f (DKM/MeOH = 9/1 + 0,3 % oetne kisline) = 0,12		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 100 %		
¹ H-NMR (400 MHz, CD ₃ OD)	δ (ppm) = 2,19 (p, <i>J</i> = 6,4 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 3,19 (t, <i>J</i> = 7,2 Hz, 2H, CH ₂ NH ₂), 4,19 (t, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H, CH ₂ O), 7,21 (ddd, <i>J</i> ₁ = 8,0, <i>J</i> ₂ = 2,8, <i>J</i> ₃ = 0,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,41 (t, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,62 (dd, <i>J</i> ₁ = 2,8, <i>J</i> ₂ = 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,62 (ddd, <i>J</i> ₁ = 7,6, <i>J</i> ₂ = 1,2, <i>J</i> ₃ = 0,8 Hz, 1H, Ar-H), COOH in NH ₃ ⁺ izmenljivi	

4.7.5. Sinteza 2-kloro-5-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)etoksi)benzojske kisline (**12a**) in 3-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)propoksi)benzojske kisline (**12b**)

Benzojski kislini **11a–b** (1 eq) smo suspendirali v brezvodnem DKM (20 mL), ohladili z ledeno kopeljo na 0 °C, dodali Et₃N (4 eq) ter postopoma s kapalnikom trifluoroacetanhidrid (2 eq) ter zmes mešali med postopnim segrevanjem do sobne temperature 3 ure. Reakcijski zmesi smo nato dodali 30 mL DKM, jo sprali z 1M HCl (60 mL), vodo (30 mL) in nasičeno raztopino NaHCO₃ (60 mL). Alkalno vodno fazo smo nakisali s koncentrirano HCl do pH = 1 ter jo nato ekstrahirali z DKM (2 × 40 mL). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl, posušili z Na₂SO₄ in uparili topilo. Spojini smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/1 + 0,3 % oetne kisline).

2-kloro-5-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)etoksi)benzojska kislina (12a)		M = 311,64 g/mol
<i>Izgled:</i> beli kristali		<i>T_{tal}:</i> 141–143 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex= 1/1 + 0,3 % očetne kisline) = 0,15		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 59 %		
¹H-NMR (400 MHz, aceton-d ₆)	δ (ppm) = 3,79 (q, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H, CH ₂ NH), 4,28 (t, <i>J</i> = 5,2 Hz, 2H, OCH ₂), 7,15 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 3,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,43 (d, <i>J</i> = 2,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,45 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H, Ar-H), 8,79 (bs, 1H, NH-CO), COOH izmenljiv	
¹³C-NMR (100 MHz, aceton-d ₆)	δ (ppm) = 39,98 (d, ⁴ <i>J</i> _{F,C} = 12 Hz, CH ₂ NH); 67,01; 117,08 (q, ¹ <i>J</i> _{F,C} = 285,8 Hz, CF ₃); 117,89; 119,86; 125,21; 132,46; 132,70; 157,93 (qd, ² <i>J</i> _{F,C} = 36,5 Hz, ² <i>J</i> _{F,C} = 8 Hz, COCF ₃); 158,07; 166,52	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₁ H ₉ ClF ₃ NO ₄ [M+(H)] ⁺ (m/z): 310,0094, izmerjena vrednost: 310,0088	
IR (KBr)	3414, 3316, 3110, 2927, 2633, 1710, 1597, 1560, 1486, 1469, 1432, 1414, 1384, 1374, 1349, 1321, 1277, 1260, 1235, 1206, 1182, 1116, 1061, 1052, 1039 cm ⁻¹	
HPLC	t _R = 10,996 min (100 % pri 220 nm; 100 % pri 254 nm)	

3-(3-(2,2,2-trifluoroacetamido)propoksi)benzojska kislina (12b)		M = 291,22 g/mol
<i>Izgled:</i> beli kristali		<i>T_{tal}:</i> 144–146 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex= 1/1 + 0,3 % očetne kisline) = 0,27		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 60 %		
¹H-NMR (400 MHz, aceton-d ₆)	δ (ppm) = 2,13 (p, <i>J</i> = 6,4 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 3,59 (t, <i>J</i> = 6,4 Hz, 2H, CH ₂ NH), 4,17 (t, <i>J</i> = 6,0 Hz, 2H, CH ₂ O), 7,20 (ddd, <i>J</i> ₁ = 8,4, <i>J</i> ₂ = 2,8, <i>J</i> ₃ = 0,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,44 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,56 (dd, <i>J</i> ₁ = 2,4, <i>J</i> ₂ = 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,64 (ddd, <i>J</i> ₁ = 7,6, <i>J</i> ₂ = 1,2, <i>J</i> ₃ = 0,8 Hz, 1H, Ar-H), 8,64 (bs, 1H, NHCO), COOH izmenljiv	
¹³C-NMR (100 MHz, aceton-d ₆)	δ (ppm) = signal za CH ₂ CH ₂ CH ₂ pod signalom topila; 37,63 (d, ⁴ <i>J</i> _{F,C} = 12,4 Hz, CH ₂ NH); 66,28; 115,77; 117,15 (q, ¹ <i>J</i> _{F,C} = 285,8 Hz, CF ₃); 120,28; 122,83; 130,46; 132,83; 157,70 (q, ² <i>J</i> _{F,C} = 35,8 Hz, COCF ₃); 159,89; 167,52	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₂ H ₁₁ F ₃ NO ₄ [M-(H)] ⁻ (m/z): 290,0640, izmerjena vrednost: 290,0645	
IR (KBr)	3318, 3115, 2952, 2928, 2877, 2838, 2684, 2574, 1796, 1706, 1676, 1603, 1591, 1569, 1490, 1458, 1448, 1440, 1395, 1384, 1350, 1321, 1296, 1264, 1247, 1218, 1206, 1182, 1167, 1120, 1078, 1061, 1035 cm ⁻¹	
HPLC	t _R = 10,971 min (98,9 % pri 220 nm; 100 % pri 254 nm)	

4.7.6. Sinteza 4-(2-(2-kloro-5-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)etoksi)benzamido)-3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-6-il)fenil acetata (13a) in N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-3-(3-(2,2,2-trifluoroacetamido)-propoksi)benzamida (13b)

Spojini **13a–b** smo sintetizirali po splošnem postopku, ki je opisan v poglavju »Splošni postopek sinteze spojin **5a–g**«. Kot amin smo pripeli na spojino **13a** cianotiofen **3b**, kot amin uveden na spojino **13b** pa **3a**. Spojini smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/2) ter z nadaljnjo prekrizalzacijo iz EtOH.

4-(2-(2-kloro-5-(2-(2,2,2-trifluoroacetamido)etoksi)benzamido)-3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-6-il)fenil acetat (13a)		M = 606,01 g/mol
<i>Izgled:</i> rumeni kristali		<i>T_{tal}:</i> 194–196 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,13		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 70 %		
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 1,99 (qd, <i>J</i> ₁ = 11,2, <i>J</i> ₂ = 5,6 Hz, 1H, CHCH _A H _B CH ₂), 2,18–2,24 (m, 1H, CHCH _A H _B CH ₂), 2,33 (s, 3H, CH ₃), 2,72–2,89 (m, 3H, CH ₂ CHCH ₂ CH ₂), 2,98–3,12 (m, 2H, CH ₂ CH), 3,85 (q, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H, CH ₂ NH), 4,19 (t, <i>J</i> = 5,2 Hz, 2H, OCH ₂), 6,77 (bs, 1H, NHCOCF ₃), 7,07 (dd, <i>J</i> ₁ = 8,8, <i>J</i> ₂ = 3,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,08 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,30 (d, <i>J</i> = 8,0 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,45 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,58 (d, <i>J</i> = 3,2 Hz, 1H, Ar-H), 9,77 (bs, 1H, NHCO)	
¹³C-NMR (100 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 21,18; 24,28; 29,38; 31,83; 39,18; 40,22; 66,27; 94,41; 114,12; 115,73 (<i>q</i> , ¹ <i>J</i> _{C,F} = 285,8 Hz, CF ₃), 116,95; 120,01; 121,70; 123,02; 127,85; 128,63; 131,10; 131,68; 132,06; 142,53; 146,41; 149,26; 157,20; 157,52 (<i>q</i> , ² <i>J</i> _{C,F} = 37,1 Hz, COCF ₃); 161,57; 169,75	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₈ H ₂₄ ClF ₃ N ₃ O ₅ S [M+(H)] ⁺ (m/z): 606,1077, izmerjena vrednost: 606,1081	
IR (KBr)	3414, 3198, 3078, 2927, 2222, 1730, 1685, 1560, 1507, 1461, 1384, 1297, 1242, 1204, 1186, 1155, 1039, 1020 cm ⁻¹	
HPLC	t _R = 16,721 min (96,3 % pri 220 nm; 100 % pri 254 nm)	

<i>N</i>-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-il)-3-(3-(2,2,2-trifluoroacetamido)propoksi)benzamid (13b)		M = 451,46 g/mol
Izglede : blede rumeni igličasti kristali		T_{tal} : 171–173 °C
TLC : R _f (EtOAc/Hex= 1/2) = 0,20		
Izkoristek reakcije : 41 %		
¹H-NMR (400 MHz, aceton- d ₆)	δ (ppm) = 1,86–1,93 (m, 4H, CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂), 2,14 (p, <i>J</i> = 6,8 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2,59 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂), 2,70 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 3,60 (q, <i>J</i> = 6,4 Hz, 2H, CH ₂ NH), 4,20 (t, <i>J</i> = 6,0 Hz, 2H, CH ₂ O), 7,21 (ddd, <i>J</i> ₁ = 8,4, <i>J</i> ₂ = 2,8, <i>J</i> ₃ = 0,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,49 (t, <i>J</i> = 8,0 Hz, 1H, Ar-H), 7,59 (dd, <i>J</i> ₁ = 2,4, <i>J</i> ₂ = 1,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,64 (ddd, <i>J</i> ₁ = 7,6, <i>J</i> ₂ = 1,6, <i>J</i> ₃ = 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 8,64 (bs, 1H, NHCO), 10,63 (bs, 1H, NHCOCF ₃)	
¹³C-NMR (100 MHz, aceton- d ₆)	δ (ppm) = 22,92; 23,84; 24,48; 24,69; signal za CH ₂ CH ₂ CH ₂ pod signalom za topilo; 37,63 (d, ⁴ <i>J</i> _{C,F} = 13,1 Hz, CH ₂ NH); 66,36; 96,36; 114,52; 114,72; 117,15 (q, ¹ <i>J</i> _{C,F} = 285,8 Hz, CF ₃); 119,65; 121,06; 129,60; 130,65; 132,26; 134,91; 147,23; 157,70 (q, ² <i>J</i> _{C,F} = 35,7 Hz, COCF ₃); 159,99; 165,36	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₁ H ₂₁ F ₃ N ₃ O ₃ S [M+(H)] ⁺ (m/z): 452,1256, izmerjena vrednost: 452,1253	
IR (KBr)	3417, 2928, 2219, 1700, 1669, 1605, 1576, 1551, 1490, 1465, 1442, 1384, 1363, 1329, 1293, 1280, 1224, 1209, 1164, 1109, 1057, 1000 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₂₁ H ₂₀ F ₃ N ₃ O ₃ S	% C = 55,87; % H = 4,47; % N = 9,31
	Izmerjene vrednosti	% C = 55,67; % H = 4,35; % N = 9,34

4.7.7. Sinteza 5-(2-aminoetoksi)-2-kloro-*N*-(3-ciano-6-(4-hidroksifenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)benzamida (**14a**) in 3-(3-aminopropoksi)-*N*-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-il)benzamida (**14b**)

Spojini **13a–b** (1 eq) smo suspendirali v 10 mL MeOH, dodali 1M NaOH (3 eq) in mešali čez noč pri sobni temperaturi. Metanol smo nato uparili, dodali 20 mL vode in vodno fazo ekstrahirali z DKM (3 × 20 mL). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl (30 mL), posušili z Na₂SO₄ ter uparili topilo. Spojino **14b** smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM/MeOH = 9/1 + 0,3 % Et₃N).

5-(2-aminoetoksi)-2-kloro-N-(3-ciano-6-(4-hidroksifenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)benzamid (14a)		M = 467,97 g/mol
<i>Izgled:</i> beli kristali		<i>T_{tal}:</i> 159–162 °C
<i>TLC:</i> R _f (DKM/MeOH = 9/1 + 0,3 % Et ₃ N) = 0,18 <i>Izkoristek reakcije:</i> 100 %		
¹H-NMR (400 MHz, DMSO-d ₆)	δ (ppm) = 1,81–1,90 (m, 1H, CHCH _A H _B CH ₂), 1,97–2,02 (m, 1H, CHCH _A H _B CH ₂), 2,61–2,68 (m, 3H, CH ₂ CHCHCH ₂), 2,80–2,92 (m, 2H, CH ₂ CH), 3,85 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, CH ₂ NH ₂), 4,22 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, OCH ₂), 6,72 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,09 (dd, <i>J</i> ₁ = 6,4, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,11 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,24 (d, <i>J</i> = 3,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,45 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H, Ar-H), 9,26 (bs, 1H, NH-CO), OH in NH ₂ izmenljivi	
¹³C-NMR (100 MHz, Py-d ₅)	δ (ppm) = 26,76; 32,06; 34,27; 41,92; 42,18; 69,31; 97,49; 116,97; 117,96; 118,38; 120,29; 125,17; 130,44; 130,72; 133,03; 133,68; 138,26; 138,39; 149,53; 159,40; 159,57; 167,05	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₄ H ₂₃ ClN ₃ O ₃ S [M+(H)] ⁺ (m/z): 468,1149, izmerjena vrednost: 468,1143	
IR (KBr)	3549, 3475, 3413, 3237, 3084, 3012, 2922, 2224, 2032, 1677, 1656, 1638, 1617, 1574, 1556, 1514, 1460, 1408, 1384, 1317, 1296, 1234, 1201, 1178, 1156, 1139, 1074, 1017 cm ⁻¹	
HPLC	t _R = 11,363 min (100 % pri 220 nm; 100 % pri 254 nm)	

3-(3-aminopropoksi)-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)benzamid (14b)		M = 355,45 g/mol
<i>Izgled:</i> svetlo rjavi kristali		<i>T_{tal}:</i> 194–196 °C
<i>TLC:</i> R _f (DKM/MeOH = 9/1 + 0,3 % Et ₃ N) = 0,11 <i>Izkoristek reakcije:</i> 73 %		
¹H-NMR (400 MHz, CD ₃ OD)	δ (ppm) = 1,86–1,93 (m, 4H, CH ₂ (CH ₂) ₂ CH ₂), 2,21 (p, <i>J</i> = 6,8 Hz, 2H, CH ₂ CH ₂ CH ₂), 2,64 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 2,72 (t, <i>J</i> = 5,2 Hz, 2H, CH _{2a} (CH ₂) ₂ CH _{2b}), 3,22 (p, <i>J</i> = 7,6 Hz, 2H, CH ₂ NH ₂), 4,23 (t, <i>J</i> = 5,6 Hz, 2H, CH ₂ O), 7,25 (ddd, <i>J</i> ₁ = 8,4, <i>J</i> ₂ = 2,8, <i>J</i> ₃ = 1,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,50 (t, <i>J</i> = 8,4 Hz, 1H, Ar-H), 7,55 (dd, <i>J</i> ₁ = 2,4, <i>J</i> ₂ = 1,6 Hz, 1H, Ar-H), 7,64 (ddd, <i>J</i> ₁ = 7,6, <i>J</i> ₂ = 1,6, <i>J</i> ₃ = 1,2 Hz, 1H, Ar-H), NH ₂ in NHCO izmenljivi	
¹³C-NMR (100 MHz, Py-d ₅)	δ (ppm) = 24,26; 25,20; 26,03; 26,22; 29,77; 39,19; 67,74; 99,12; 117,02; 117,25; 121,03; 123,34; 131,25; 131,87; 133,98; 136,89; 149,51; 160,97; 168,03	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₁₉ H ₂₂ N ₃ O ₂ S [M+(H)] ⁺ (m/z): 356,1433, izmerjena vrednost: 356,1424	
IR (KBr)	3549, 3472, 3412, 3233, 2925, 2215, 2028, 1616, 1544, 1464, 1383, 1271, 1148 cm ⁻¹	
HPLC	t _R = 11,563 min (97,1 % pri 220 nm; 96,9 % pri 254 nm)	

4.7.8. Sinteza *tert*-butil (*tert*-butoksikarbonilamino)(2-(4-kloro-3-(3-ciano-6-(4-hidroksi fenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[*b*]tiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)etilamino)metilen karbamata (15)

Spojino **14a** (0,275 g, 0,37 mmol, 1 eq) smo raztopili v 4 mL brezvodnega DMF, zaporedoma dodali S-metil-diBoc-izotiosečnino (0,108 g, 0,37 mmol, 1 eq), Et₃N (0,105 mL, 0,74 mmol, 2 eq) in živosrebrov(II) klorid (0,10 g, 0,37 mmol, 1 eq) ter mešali pri sobni temperaturi 3 ure. Ker reakcija po tem času še ni potekla do konca, smo dodali še 0,6 množinskega ekvivalenta S-metil-diBoc-izotiosečnine in enak množinski ekvivalent HgCl₂, ter mešali čez noč. DMF smo uparili, zaostanku dodali 20 mL EtOAc, nastalo oborino odfiltrirali s presesavanjem ter nato organsko fazo sprali z vodo (2 × 20 mL), nasičeno raztopino NaCl (20 mL), posušili z Na₂SO₄ in uparili topilo. Surovi produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/2).

<i>tert</i>-butil (<i>tert</i>-butoksikarbonilamino)(2-(4-kloro-3-(3-ciano-6-(4-hidroksifenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[<i>b</i>]tiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)etilamino)metilenkarbamata (15)		M = 710,24 g/mol
Izgled: rumeni kristali		T_{tal}: 133–135 °C
TLC: R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,19		
Izkoristek reakcije: 63 %		
¹H-NMR (400 MHz, CD₃OD)	δ (ppm) = 1,49 (s, 9H, 3 × CH ₃), 1,53 (s, 9H, 3 × CH ₃), 1,97 (qd, J ₁ = 10,8, J ₂ = 5,6 Hz, 1H, CHCH _A H _B CH ₂), 2,10–2,16 (m, 1H, CHCH _A H _B CH ₂), 2,67–2,80 (m, 3H, CH ₂ CHCH ₂ CH ₂), 2,91–3,03 (m, 2H, CH ₂ CH), 3,79 (t, J = 5,2 Hz, 2H, CH ₂ NH), 4,20 (t, J = 5,2 Hz, 2H, OCH ₂), 6,76 (d, J = 8,8 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,14 (d, J = 8,4 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,17 (dd, J ₁ = 8,8, J ₂ = 3,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,24 (d, J = 2,8 Hz, 1H, Ar-H), 7,44 (d, J = 8,8 Hz, 1H, Ar-H), OH, 3 × NHCO izmenljivi	
¹³C-NMR (100 MHz, aceton-d₆)	δ (ppm) = 25,14; 28,15; 28,49; 30,61; 31,63; 32,61; 40,83; 67,56; 79,09; 83,87; 95,40; 114,31; 116,16; 116,55; 119,26; 123,24; 128,69; 129,33; 131,83; 132,02; 136,01; 137,21; 147,09; 153,72; 156,85; 157,15; 158,34; 164,46; 164,53	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₃₅ H ₄₁ ClN ₅ O ₇ S [M+(H)] ⁺ (m/z): 710,2415, izmerjena vrednost: 710,2419	
IR (KBr)	3549, 3412, 2976, 2930, 2213, 1786, 1724, 1636, 1617, 1575, 1549, 1516, 1456, 1411, 1384, 1368, 1324, 1285, 1230, 1140, 1051, 1024 cm ⁻¹	
Elementna analiza	Izračunano za C ₃₅ H ₄₀ ClN ₅ O ₇ S x 0,4 H ₂ O	% C = 58,59; % H = 5,73; % N = 9,76
	Izmerjene vrednosti	% C = 58,29; % H = 5,32; % N = 10,11

4.7.9. Sinteza 1-(2-(4-kloro-3-(3-ciano-6-(4-hidroksifenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamio)fenoksi)etil)gvanidinijevega klorida (**16**)

Spojino **15** (0,095 g, 0,134 mmol, 1 eq) smo raztopili v 4 mL DKM dodali TFA (0,5 mL, 6,73 mmol, 50 eq) in mešali pri sobni temperaturi 2 uri. Topilo smo uparili ter oljnatemu zaostanku dodali 1,5 mL 1M HCl v EtOAc. Nastalo suspenzijo smo odfiltrirali s presesavanjem in oborino sprali z EtOAc ter jo posušili v sušilniku do suhega. Spojino smo očistili z reverzno-fazno kolonsko kromatografijo na sistemu Biotage Isolera One System. Združili smo frakcije, pri katerih je bila čistost spojine **16** vsaj 95 %, uparili mobilno fazo in pretvorili sol iz trifluoroacetatne oblike v obliko klorida z 1M HCl v EtOAc.

1-(2-(4-kloro-3-(3-ciano-6-(4-hidroksifenil)-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamio)fenoksi)etil)gvanidinijev klorid (16)		M = 546,47 g/mol
<i>Izgled:</i> svetlo rjavi kristali		<i>T_{tal}:</i> 205–206 °C
<i>TLC:</i> R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,00		
<i>Izkoristek reakcije:</i> 79 %		
¹H-NMR (400 MHz, CD ₃ OD)	δ (ppm) = 1,98 (qd, <i>J</i> ₁ = 12,0, <i>J</i> ₂ = 6,4 Hz, 1H, CHCH _A H _B CH ₂), 2,11–2,17 (m, 1H, CHCH _A H _B CH ₂), 2,69–2,82 (m, 3H, CHCH ₂ CH ₂), 2,93–3,02 (m, 2H, CH ₂ CHCH ₂ CH ₂), 3,65 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, CH ₂ NHC), 4,20 (t, <i>J</i> = 4,8 Hz, 2H, CH ₂ O), 6,77 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,14 (d, <i>J</i> = 8,4 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,16 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,6, <i>J</i> ₂ = 3,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,24 (d, <i>J</i> = 3,2 Hz, 1H, Ar-H), 7,48 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 1H, Ar-H), OH, 6 × NH izmenljivi	
¹³C-NMR (100 MHz, CD ₃ OD)	δ (ppm) = 25,59; 31,06; 33,06; 41,43; 42,07; 68,10; 96,56; 114,89; 116,34; 116,52; 119,62; 124,29; 128,88; 130,55; 132,35; 132,77; 136,33; 137,65; 147,35; 156,99; 158,60; 159,05; 166,15	
ESI-HRMS	Izračunano za C ₂₅ H ₂₅ ClN ₅ O ₃ S [M+(H)] ⁺ (m/z): 510,1367, izmerjena vrednost: 510,1361	
IR (KBr)	3414, 2224, 1652, 1616, 1575, 1511, 1458, 1387, 1305, 1239, 1123, 1061, 1040 cm ⁻¹	
HPLC	t _R = 11,881 min (98,1 % pri 220 nm; 97,2 % pri 254 nm)	

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

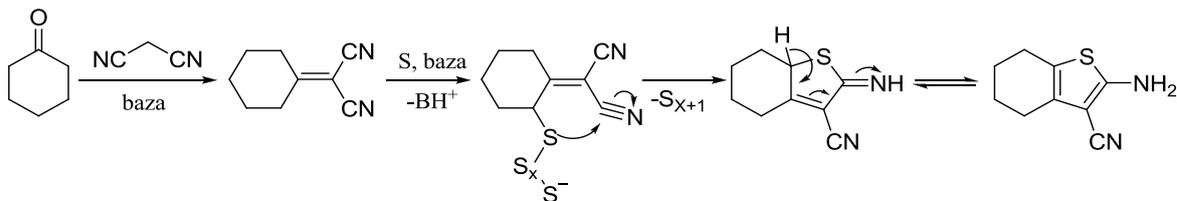
5.1. KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

Za pripravo 2-amino-3-cianotiofenov smo uporabili različne komercialno dostopne (cikloheksanon) ali predhodno sintetizirane ciklične ketone (spojine **2b–c**, **2e**). Pri sintezi spojine **2b** smo na hidroksilno skupino 4-(4-hidroksifenil)cikloheksanona uvedli acetilni del z uporabo acetanhidrida v piridinu kot topilu, ki deluje tudi kot katalizator reakcije. Hidroksilno skupino smo pretvorili v metoksi skupino z MeI ob prisotnosti baze z Williamsonovo sintezo etrov in tako dobili spojino **2c** (37).

Spojino **4e** smo pripravili z reakcijo med aktiviranim 4-nitrofluorobenzenom in 4-piperidonom, zaščitnim v obliki etilen ketal. Reakcija poteka po mehanizmu nukleofilne aromatske substitucije, kjer je fluor dobro izstopajoča skupina aktivirana z elektron privlačno nitro skupino na para mestu glede na fluor, kar omogoča resonančno stabilizacijo Meisenheimerjevega kompleksa, ki nastane kot intermediat reakcije. Odstranitev ketalne zaščitne skupine je potekla v blago kislih pogojih (10 % H₂SO₄ v THF).

5.1.1. Gewaldova sinteza spojin **3a–d**

2-amino-3-cianotiofene smo pripravili s kondenzacijo med ketonom, malononitrilom in elementarnim žveplom ob prisotnosti morfolina kot baze z Gewaldovo sintezo tiofenov. V prvi stopnji poteče Knoevenagelova kondenzacija med malononitrilom in ketonom, v nadaljnjih stopnjah pa pride do adicije žvepla na α,β -nenasičen nitril in ciklizacije ter s tem do tvorbe 2-aminotiofenskega produkta (slika 15). Celoten mehanizem adicije žvepla in ciklizacije še ni v celotni pojasnjen. Kot topilo za izvedbo reakcije smo uporabili etanol, saj po znanih podatkih polarna topila (etanol, metanol, DMF) pospešijo kondenzacijo žvepla na nitrilni intermediat in tudi stopnjo ciklizacije. Pomembna je tudi prisotnost baze, ki aktivira elementarno žveplo in odcepi proton v stopnji Knoevenagelove kondenzacije (38).



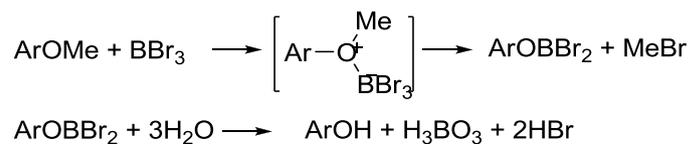
Slika 15: Mehanizem Gewaldove sinteze 2-aminotiofenov

5.1.2. Sinteza sulfonamidnih zaviralcev **5a–j**

Za sintezo sulfonamidnih derivatov smo najprej pripravili sulfonil klorid **2a** z reakcijo klorosulfoniranja. Gre za elektrofilno aromatsko substitucijo, kjer oba klora ter karboksilna skupina usmerjajo vstopajočo skupino na mesto 5 2,4-diklorobenzojske kisline, hkrati pa vse te skupine tudi deaktivirajo sistem, zato smo reakcijsko zmes segrevali pri 135 °C, da je reakcija sploh potekla. Nadaljnje pripajanje dodatnega sulfonil klorida je omejeno zaradi sterične oviranosti in zaradi dodatne deaktivacije aromatskega sistema zaradi že uvedene sulfonil kloridne skupine, zato smo izolirali izključno naš željen produkt.

Na sulfonil klorid **2a** smo nato pripenjali amine, pri čemer so kot produkti nastali različni sekundarni ali primarni sulfonamidi. Potekla je nukleofilna substitucija, pri kateri je izstopil kloridni anion in reagiral s prisotno organsko (Et₃N) ali anorgansko bazo (NaOH ali Na₂CO₃). Nastale produkte smo očistili in jih uporabili v nadaljnji sintezi, kjer smo v dveh stopnjah tvorili amidno vez s spojinami **3a–d**. Najprej smo karboksilno skupino v prisotnosti prebitnega oksalil klorida (3 molarne ekvivalente glede na kislino) in katalitične količine DMF pretvorili v kislinski klorid, ki smo ga nato brez čiščenja uporabili za tvorbo amida z 2-amino-3-cianotiofeni **3a–d** v prisotnosti piridina, ki je kot baza nevtraliziral pri reakciji sproščen HCl. Keto skupino spojine **5f** smo reducirali do hidroksilne skupine z blagim reducentom – natrijevim tetraborhidridom (NaBH₄). Pri spojini **5d** smo odstranili *tert*-butoksikarbonilno zaščitno skupino (Boc) z acidolizo in dobili amin v obliki soli s trifluoroacetno kislino, ki smo ga z dodatkom 1 M HCl v EtOAc pretvorili v sol s kloridom. Etilni ester spojine **5e** smo cepili z alkalno hidrolizo in dobili spojino **5i** s prosto karboksilno skupino na para mestu piperidina.

Spojino **1c** smo pripravili z demetilacijo aril metil etra spojine **6c** z BBr₃ pri –23 °C. Borov tribromid kot močna Lewisova kislina tvori kompleks s kisikom aril alkil etra, ki v prisotnosti vode ali metanola v končni stopnji razpade do metilbromida in fenola (slika 16) (39).



Slika 16: Demetilacija aril metil etra

5.1.3. Sinteza etrskih derivatov 14a–b in 16

Tvorba etrskih zaviralcev je obsegala uvedbo in odstranitev večih zaščitnih skupin, ki so omogočile vpeljavo alkilamino verig na željene položaje 3-hidroksibenzojske ali 2-kloro-5-hidroksibenzojske kisline. Najprej smo kislino zaščitili v obliki metilnega estra, kar smo dosegli z dokapavanjem tionil klorida v metanolno raztopino kisline. Pod vplivom tionil klorida je nastal kislinski klorid, ki je nato reagiral z metanolom. Sledila je odstranitev metilne zaščite z alkalno hidrolizo v dioksanu in odstranitev Boc zaščitne skupine z acidolizo s trifluoroaceto kislino. Amino skupino smo zaščitili v obliki trifluoroacetamida, ki je obstojen v kisljih brezvodnih pogojih uporabljenih pri tvorbi amidne vezi z 2-amino-3-cianotiofenoma 3a–b. Zaradi večje selektivnosti smo reakcijo izvajali pri 0 °C in s postopnim dokapavanjem trifluoroacet anhidrida, saj je bil sicer obseg poteklih stranskih reakcij precejšen (nastalo tudi do 50 % po strukturi neznanega stranskega produkta). Amidno vez smo tvorili po že predhodno opisanem postopku z uporabo oksalil klorida. Nazadnje smo odstranili trifluoroacetamidno zaščito z bazično hidrolizo. Pri spojini 13a je pri uporabljenih pogojih prišlo tudi do hidrolize estra.

5.1.4. Sinteza gvanidina (15, 16)

Sinteza gvanidina je potekala iz primarnega amina 14a, ki je kot nukleofil napadel centralni ogljik S-metil-diBoc-izotiosečnine. Pri tem smo uporabili katalizator živosrebrov(II) klorid, ki pospeši potek reakcije (40, 41). Reakcija po literaturnih podatkih poteče že po dodatku enega množinskega ekvivalenta S-metil-diBoc-izotiosečnine (glede na amin), vendar je v našem primeru lahko razlog za neuspešno reakcijo star reagent, zato smo kasneje dodali še 0,6 molarne ekvivalenta sveže pripravljene reagenta. Dodatek reagenta in katalizatorja je nato omogočil potek reakcije v zadostnem obsegu. V zadnji stopnji sinteze je sledila še odstranitev Boc zaščitne skupine z acidolizo s TFA, čiščenje z reverznofazno kromatografijo ter zamenjava trifluoroacetatnega aniona s kloridnim.

5.2. REZULTATI IN KOMENTAR BIOKEMIJSKEGA VREDNOTENJA

Iz rezultatov testiranj na izoliranih encimih MurF lahko vidimo, da so močno zaviralno aktivnost na encim iz bakterije *S. pneumoniae* pokazale spojine **5b**, **5f**, **5h** in **5i** (IC_{50} od 3,37 μ M do 17,9 μ M, tabela IV) in to v podobnem velikostnem razredu kot pri Abbottovi spojini **1b** (IC_{50} = 4 μ M). Te spojine imajo morfolin iz spojine **1b** zamenjan z različnimi amini. Vidimo lahko, da kisik iz morfolina nima bistvenega vpliva na zaviralno aktivnost, saj je le-ta zelo podobna tudi pri spojini **5b** (IC_{50} = 3,75 μ M), ki je brez kisika in ima metilni substituent na mestu orto ob dušiku. Podobno aktivnost je pokazala tudi spojina s 4-oksopiperidinskim fragmentom **5f** (IC_{50} = 3,37 μ M). Redukcija te okso skupine je zmanjšala aktivnost za 3-krat (**5h**, IC_{50} = 10,45 μ M). Spojina **5e** ni pokazala zaviralne aktivnosti pri testirani koncentraciji, njen derivat s prosto karboksilno skupino **5i** pa je zaviral MurF v nizkem mikromolarnem območju (IC_{50} = 17,9 μ M). Večji etilni ester se težje umesti v vezavno mesto encima, zato je njegovo delovanje šibkejše v primerjavi z volumsko manjšo karboksilno skupino derivata **5i**.

Spojine **5a**, **5c**, in **5g** so pokazale le zanemarljivo zaviralno aktivnost, kar je lahko posledica večje rigidnosti obroča pri spojini **5g** zaradi laktamske skupine ter volumsko večjega žveplovega atoma pri derivatih s tiazolidinom in tiomorfolinom. Tudi uvedba bolj gibljivega aminoetilnega substituenta je zmanjšala aktivnost, kar je lahko posledica uvedbe bazičnega strukturnega elementa. Spojine s sulfonamidnim fragmentom žal niso zavirale delovanja MurF iz *E. coli*.

Protibakterijsko aktivnost sulfonamidov smo določili na sevu bakterije *S. pneumoniae*. Spojine **1b**, **5h** in **5i** so pokazale šibko protibakterijsko delovanje (MIK = 64 μ g/mL), ostali derivati pa so bili neaktivni (MIK > 128 μ g/mL).

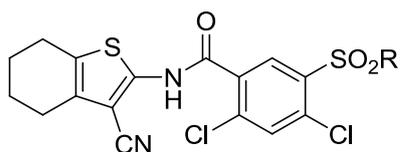


Tabela IV: Rezultati biokemijskega vrednotenja sulfonamidnih derivatov 1 (n.d.–ni določeno)

Oznaka spojine	R	RA (%) ali IC ₅₀ (μM) MurF _{SP}	RA (%) ali IC ₅₀ (μM) MurF _{EC}	MIK (μg/mL) <i>S. pneumoniae</i>
1b		4 μM	100 %	64
5a		66 %	104 %	>128
5b		3,75 μM	107 %	>128
5c		42 %	95 %	>128
5e		100 %	95 %	n.d.
5f		3,37 μM	102 %	>128
5g		89 %	91 %	n.d.
5h		10,45 μM	104 %	64
5i		219 μM	418 μM	n.d.
5j		17,9 μM	102 %	64

Kot najboljša zaviralca *S. pneumoniae* MurF smo sintetizirali derivata spojine **1c**, ki imata namesto hidroksilne funkcionalne skupine metoksi in acetoksi skupino ($IC_{50} = 0,17$ oziroma $0,12 \mu M$, tabela V). Derivat **6d** ima zanemarljivo aktivnost, kar pa je najbrž posledica spremembe konformacije zaradi uvedenega dušika v nasičen 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofenski del molekule. Ponovno smo sintetizirali tudi zaviralec, ki se je v literaturi izkazal kot najboljši (**1c**) ter s tem pokazali ujemanje rezultatov naših testiranj s testiranjem opisanimi v literaturi. Majhna razlika v rezultatu ($IC_{50} = 22 \text{ nM}$ in 63 nM) je posledica različnih pogojev pri testiranju, upoštevati pa je potrebno tudi morebitno eksperimentalno napako.

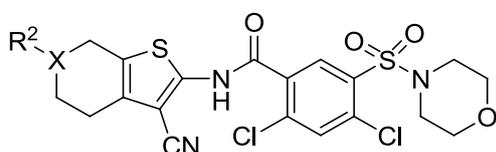
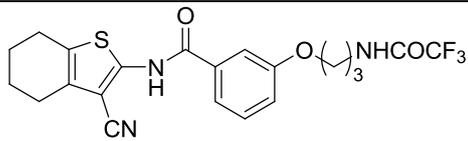
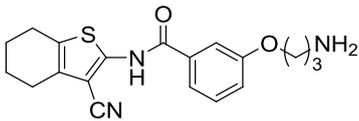
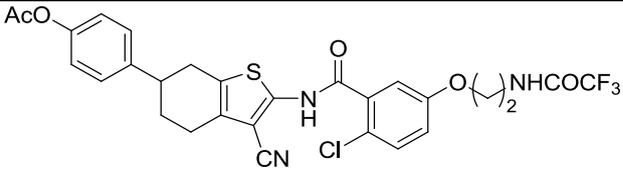
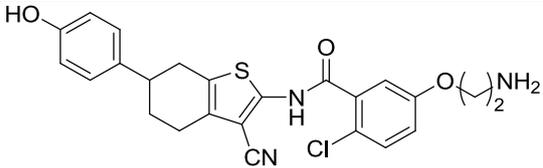
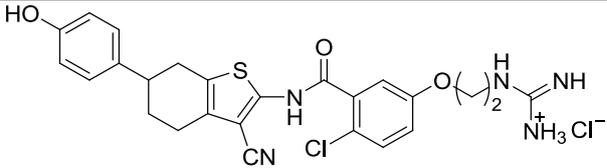


Tabela V: Rezultati biokemijskega vrednotenja sulfonamidnih derivatov 2.

Oznaka spojine	X	R ²	RA (%) ali IC ₅₀ (μM) MurF _{SP}	RA (%) ali IC ₅₀ (μM) MurF _{EC}	MIK (μg/mL) <i>S. pneumoniae</i>
6b	CH		0,12 μM	91 %	>128
6c	CH		0,17 μM	90 %	>128
6d	N		80 %	83 %	>128
1c	CH		0,063 μM	85 %	16

Ker nobeden izmed sulfonamidnih derivatov ni zaviral delovanja encima MurF iz bakterije *E. coli*, smo naredili etrske drivate z namenom razširiti spekter delovanja. Derivata **13b** in **14b** z aminopropoksi substituentom nista izkazovala dobre aktivnosti na MurF_{SP} in MurF_{EC}, kar je najverjetneje posledica odsotnosti klora na orto mestu benzena glede na karbonilno skupino ter izgube ene vodikove vezi, ki jo tvori sulfonamid. Klor tvori hidrofobne interakcije z encimom, hkrati pa je pomemben tudi za ustrezno konformacijo benzenovega obroča in 3-cianotiofenskega dela molekule (21). Nobene aktivnosti ni pokazala tudi spojina **13a**, njen derivat s prosto amino skupino pa je pokazal aktivnost na encimu iz obeh bakterij. 3-krat močnejše kot amin je deloval gvanidinski derivat **16** (IC₅₀ za MurF_{SP} je 20 μM). Zaviralne aktivnosti so podane v tabeli VI.

Tabela VI: Rezultati biokemijskega vrednotenja etrskih derivatov (*-RA določena pri 250μM zaviralca)

Oznaka spojine	Struktura	RA (%) ali IC ₅₀ (μM) MurF _{SP}	RA (%) ali IC ₅₀ (μM) MurF _{EC}
13b		96 %*	91 %*
14b		53 %*	75 %*
13a		98 %*	101 %*
14a		58 μM	81 μM
16		20 μM	25 μM

Etrska derivata **14a** in **16** sta pokazala dobro protibakterijsko delovanje na različnih sevih bakterije *E. coli* in na sevu *S. aureus* (tabela VII). Boljše delovanje je pokazal gvanidinski derivat. S primerjavo rezultatov določanja MIK na bakteriji *E. coli* brez in s prisotnim polimiksin B nonapeptidom, ki v nizkih koncentracijah zveča prepustnost zunanje celične membrane, lahko vidimo, da je bilo protibakterijsko delovanje močnejše, če je bila membrana bolj prepustna (42). Protibakterijska aktivnost na *E. coli* je bila večja tudi, če je imela bakterija prisotno delecijo gena za črpalke, ki črpajo učinkovine iz celice v njeno okolje. Na podlagi teh rezultatov lahko sklepamo, da je razlog za šibkejšo protibakterijsko delovanje zaviralcev na G⁻ bakterije (*E. coli*) njihov premajhen dostop do citoplazemske tarče.

Tabela VII: Protibakterijska aktivnost spojin **14a** in **16**

Spojina	MIK (µg/ml)						
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>					
	SH1000	1411 ^a	1411+ PMBN ^b	AB734 ^a	AB734+ PMBN ^b	SM1411	ES100
14a	<256	<256	16	<256	16	32	8
16	4	64	16	64	16	16	4

Opombe: ^aSeva 1411 in AB734 sta starševska seva za SM1411 in ES100; ^bPolimiksin B nonapeptid; SM1411 je enak sevu 1411, vsebuje le dodatno delecijo *acrAB*^c; sev ES100 je enak sevu AB734, dodatna je delecija *tolC*^c (^cgen za efluks črpalke)

ZAKLJUČEK

Načrtovali in sintetizirali smo več sulfonamidnih zaviralcev encima MurF iz bakterije *S. pneumoniae*. Spojine **5b**, **5f**, **5h**, **5i** ($IC_{50} = 3,37\text{--}17,9 \mu\text{M}$) so pokazale dobro zaviralno delovanje v nizkem mikromolarnem območju, ki je primerljiva z zaviralno aktivnostjo Abbottove spojine **1b** ($IC_{50} = 4 \mu\text{M}$). Kot najmočnejša zaviralca sta se izkazali spojini s spremenjenim fragmentom na 2-amino-3-cianotiofenskem delu **6b** in **6c**, ki zavirata encim v nanomolarnem območju (IC_{50} za **6b** je $0,12 \mu\text{M}$ in za **6c** $0,17 \mu\text{M}$). Dve sulfonamidni spojini s spremenjenim morfolinskim delom **5h** in **5i** sta šibko zavirali rast seva bakterije *S. pneumoniae* (MIK = $64 \mu\text{g/mL}$).

Ker sulfonamidni derivati niso zavirali encimov MurF iz drugih bakterij, smo načrtovali in sintetizirali derivate, ki so namesto sulfonamidne skupine vsebovali etrsko skupino. Derivata **14a** in **16** sta zavirala delovanje tako MurF iz bakterije *S. pneumoniae* kot tudi MurF iz *E.coli*, pri čemer je bil derivat z gvanidinsko skupino (**16**, $IC_{50} = 20 \mu\text{M}$, MurF_{SP}) 3-krat močnejši zaviralec kot amin (**14a**, $IC_{50} = 58 \mu\text{M}$, MurF_{SP}). Izboljšali smo tudi protibakterijsko delovanje, saj je bila minimalna inhibitorna koncentracija za obe spojini na različnih sevih bakterij med 4 in $64 \mu\text{g/mL}$.

Del rezultatov smo objavili v članku *Structure-activity relationships of new cyanothiophene inhibitors of the essential peptidoglycan biosynthesis enzyme MurF* (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, European Journal of Medicinal Chemistry, 2013; 66: 32–45).

Etrski derivati predstavljajo dobro skupino spojin za nadaljnje načrtovanje in optimizacijo zaviralcev bakterijskega encima MurF, ki bodo imeli razširjen spekter delovanja za različne ortologe MurF ter bodo izkazovali boljše protibakterijsko delovanje.

LITERATURA

1. Foye WO, Lemke TL, Williams DA: Foye's principles of medicinal chemistry. 7th ed, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2013: 1073–124.
2. Dale MM, Haylett DG: Pharmacology condensed. 2nd ed, Churchill Livingstone, Edinburgh; New York, 2004: 106–12.
3. Clark MA: Lippincott's illustrated reviews. Pharmacology. 5th ed, Lippincott's illustrated reviews Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2012: 369–80.
4. Alanis AJ: Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? Arch Med Res, 2005; 36(6): 697–705.
5. Coates AR, Halls G, Hu Y: Novel classes of antibiotics or more of the same? Br J Pharmacol, 2011; 163(1): 184–94.
6. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA: Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiol Rev, 2008; 32(2): 149–67.
7. Madigan MT, Martinko JM, Parker J: Brock biology of microorganisms. 9th ed, Prentice Hall, Upper Saddle River, New Jersey, 2000: 68–75.
8. Kayser FH: Medical microbiology Georg Thieme Verlag, Stuttgart; New York, 2005: 145–59.
9. Barreteau H, Kovac A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. FEMS Microbiol Rev, 2008; 32(2): 168–207.
10. Bouhss A, Trunkfield AE, Bugg TD, Mengin-Lecreulx D: The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. FEMS Microbiol Rev, 2008; 32(2): 208–33.
11. Mohammadi T, van Dam V, Sijbrandi R, Vernet T, Zapun A, Bouhss A, Diepeveen-de Bruin M, Nguyen-Disteche M, de Kruijff B, Breukink E: Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane. EMBO J, 2011; 30(8): 1425–32.
12. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P: The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. FEMS Microbiol Rev, 2008; 32(2): 234–58.

13. El Zoeiby A, Sanschagrín F, Levesque RC: Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol Microbiol*, 2003; 47(1): 1–12.
14. 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 Å resolution. *J Mol Biol*, 2000; 304(3): 435–45.
15. Smith CA: Structure, function and dynamics in the mur family of bacterial cell wall ligases. *J Mol Biol*, 2006; 362(4): 640–55.
16. Healy VL, Lessard IA, Roper DI, Knox JR, Walsh CT: Vancomycin resistance in enterococci: reprogramming of the D-ala-D-Ala ligases in bacterial peptidoglycan biosynthesis. *Chem Biol*, 2000; 7(5): R109–19.
17. Longenecker KL, Stamper GF, et al.: Structure of MurF from *Streptococcus pneumoniae* co-crystallized with a small molecule inhibitor exhibits interdomain closure. *Protein Sci*, 2005; 14(12): 3039–47.
18. Longenecker KL. Sp protein ligand 1. 2005 [15.5.2013]; Dostopno na: <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=2AM1>.
19. J. Miller D, M. Hammond S, Anderluzzi D, D. H. Bugg T: Aminoalkylphosphinate inhibitors of D-Ala-D-Ala adding enzyme. *J Chem Soc, Perkin Transactions 1*, 1998; 0(1): 131–42.
20. Comess KM, Schurdak ME, et al.: An ultraefficient affinity-based high-throughout screening process: application to bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurF. *J Biomol Screen*, 2006; 11(7): 743–54.
21. Gu YG, Florjancic AS, et al.: Structure-activity relationships of novel potent MurF inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2004; 14(1): 267–70.
22. Stamper GF, Longenecker KL, et al.: Structure-based optimization of MurF inhibitors. *Chem Biol Drug Des*, 2006; 67(1): 58–65.
23. 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*. *Antimicrob Agents Chemother*, 2007; 51(12): 4420–6.
24. Kong D-X, Zhu W-L, Wu D-L, Shen X, Jiang H-L: Comparison of three 3D-QSAR methods using a novel class of MurF inhibitors. *J Chem Theory Comput*, 2007; 06(01): 63–80.

25. 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. *Antimicrob Agents Chemother*, 2006; 50(1): 230–6.
26. Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Foleno BD, Simon LD, Guillemont J, Macielag M, Bush K: MurF inhibitors with antibacterial activity: effect on muropeptide levels. *Antimicrob Agents Chemother*, 2009; 53(8): 3240–7.
27. Paradis-Bleau C, Lloyd A, Sanschagrín F, Clarke T, Blewett A, Bugg TD, Levesque RC: Phage display-derived inhibitor of the essential cell wall biosynthesis enzyme MurF. *BMC Biochem*, 2008; 9: 33.
28. Turk S, Kovac 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. *Bioorg Med Chem*, 2009; 17(5): 1884–9.
29. Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA: An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal Biochem*, 1979; 100(1): 95–7.
30. Loev B, Goodman MM, Snader MK, Tedeschi R, Macko E: "Hantzsch-type" dihydropyridine hypotensive agents. *J Med Chem*, 1974; 17(9): 956–65.
31. Friese A, Hell-Momeni K, Zundorf I, Winckler T, Dingermann T, Dannhardt G: Synthesis and biological evaluation of cycloalkylidene carboxylic acids as novel effectors of Ras/Raf interaction. *J Med Chem*, 2002; 45(7): 1535–42.
32. Taylor E, Skotnicki J: A Convenient Synthesis of 1-Aryl-4-piperidones. *Synthesis*, 1981(8): 606–8.
33. Sopbué Fondjo E, Döpp D, Henkel G: Reactions of some anellated 2-aminothiophenes with electron poor acetylenes. *Tetrahedron*, 2006; 62(29): 7121–31.
34. Hrast M, Turk S, et al.: Structure-activity relationships of new cyanothiophene inhibitors of the essential peptidoglycan biosynthesis enzyme MurF. *Eur J Med Chem*, 2013, 66: 32–45.
35. Winkle MR, Ronald RC: Regioselective metalation reactions of some substituted (methoxymethoxy)arenes. *J Org Chem*, 1982; 47(11): 2101–8.
36. Duggan ME, Hartman GD, Hoffman WF, C. IN: Pyridyl and naphthyridyl compounds for inhibiting osteoclast-mediated bone resorption. US 5741796 A, 1998-04-21

37. Bruckner R: *Advanced synthetic organic chemistry* / Reinhard Bruckner Springer, Berlin, 2010: XXXII, p 93.
38. Puterova Z, Krutošiková A, Végh D: *Gewald reaction: synthesis, properties and applications of substituted 2-aminothiophenes*. ARKIVOC, 2010; 2010(1): 209–46.
39. McOmie JFW, Watts ML, West DE: *Demethylation of aryl methyl ethers by boron tribromide*. Tetrahedron, 1968; 24(5): 2289–92.
40. O'Donovan DH, Rozas I: *A concise synthesis of asymmetrical N,N'-disubstituted guanidines*. Tetrahedron Lett, 2011; 52(32): 4117–9.
41. Kumar S, Singh L, Singh U: *A fast and new route to synthesis of guanidine derivatives using hgcl₂ as a promotor*. Orient J Chem, 2008; 24(1): 223–8.
42. Tsubery H, Ofek I, Cohen S, Eisenstein M, Fridkin M: *Modulation of the hydrophobic domain of polymyxin B nonapeptide: effect on outer-membrane permeabilization and lipopolysaccharide neutralization*. Mol Pharmacol, 2002; 62(5): 1036-42.