

Univerza v Ljubljani
Fakulteta za farmacijo



NINA VAJDIČ

**SINTEZA CIANOTIOFENSKIH ZAVIRALCEV LIGAZE MurF S
POTENCIJALNIM PROTIMIKROBNIM DELOVANJEM**

**SYNTHESIS OF CYANOTHIOPHENE INHIBITORS OF MurF LIGASES
WITH POTENTIAL ANTIBACTERIAL ACTIVITY**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2013

Magistrsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo in Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Zahvala

Ob tej priložnosti bi se še posebno rada zahvalila mentorju izr. prof. dr. Marku Anderluhu, mag. farm. za pomoč, dragocene nasvete in potrežljivost ter spodbudne misli pri izdelavi magistrskega dela. Hvala za vso posredovano znanje in izkušnje, ki sem jih pridobila tekom dela v laboratoriju.

Najlepša hvala tudi vsem ostalim zaposlenim na Katedri za farmacevtsko kemijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri raziskovalnem delu, še posebno dr. Martini Hrast za opravljena biološka testiranja in strokovne nasvete.

Zahvalila bi se rada tudi družini, zlasti mami in očetu, ki sta mi ves čas študija potrežljivo stala ob strani, me podpirala ter mi s svojimi nasveti pomagala najti pravo pot v dobrih in slabih trenutkih.

Iskrena hvala tudi Petru za pomoč pri oblikovanju magistrske naloge, vse dobre misli, potrežljivost in moralno podporo tekom celotnega študija, ki mi je omogočila, da sem uspešno premagovala ovire in dosegala zastavljene cilje. Hvala za vse lepe in vesele trenutke, ki so mi polepšali študijske dni.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naložbo izdelala samostojno pod mentorstvom izr. prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm.

Ljubljana, 2013

Nina Vajdič

Komisija za zagovor

Predsednik komisije: izr. prof. dr. Iztok Grabnar, mag. farm.

Mentor: izr. prof. dr. Marko Anderluh, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Ilija Ilić, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

1 UVOD.....	1
1.1 PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE	1
1.2 BAKTERIJSKA REZISTENCA	2
1.2.1 Naravna odpornost.....	3
1.2.2 Pridobljena odpornost.....	3
1.2.3 Mechanizmi bakterijske odpornosti	4
1.3 BAKTERIJSKA CELICA.....	4
1.3.1 Bakterijska celična stena	4
1.3.1.1 <i>G+ bakterije</i>	5
1.3.1.2 <i>G- bakterije</i>	5
1.3.2 Peptidoglikan in njegova biosinteza.....	6
1.3.2.1 <i>Sinteza nukleotidnih prekurzorjev v citoplazmi</i>	8
1.3.2.2 <i>Vezava prekurzorjev na lipidni nosilec in prenos skozi celično membrano</i> ..	8
1.3.2.3 <i>Polimerizacija in vgrajevanje v že obstoječi peptidoglikan</i>	9
1.4 LIGAZE Mur	11
1.4.1 Ligaza MurF	11
1.4.1.1 <i>Zgradba MurF ligaze</i>	11
1.4.1.2 <i>Ligaza MurF kot tarča potencialnih inhibitorjev</i>	13
2 NAČRT DELA	15
2.1 MOLEKULSKO SIDRANJE	18
2.2 NAČRTOVANJE USTREZNIH FARMAKOKINETIČNIH LASTNOSTI.....	18
3 MATERIALI IN METODE.....	20
4 EKSPERIMENTALNO DELO.....	23
4.1 REAKCIJSKE SHEME	23
4.1.1 Sinteza aminotiofena (kondenzacija cikloheksanona in sledeča reakcija z žveplom).....	23
4.1.2 Zaščita hidroksilne skupine s pomočjo acetanhidrida (tvorba acetatnega estra).....	23
4.1.3 Tvorba amidne vezi preko aktivacije karboksilne skupine v kislinski klorid	23
4.1.4 Odščita hidroksilne skupine s K ₂ CO ₃ in katalitično količino NaOMe	23
4.1.5 Alkiliranje hidroksilne skupine z različnimi benzilnimi in alkilnimi halogenidi.....	24
4.1.6 Odščita Boc zaščite z acidolizo	24
4.1.7 Sinteza različnih z Boc zaščitenih gvanidinskih derivatov (nukleofilna substitucija med N,N'-di(<i>terc</i> butoksikarbonil)-S-metilizotiosečnino in aminom)	25

4.2	MOLEKULSKO SIDRANJE	25
4.3	PRAVILO PETIC – IZRAČUN PARAMETROV	25
4.4	SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ.....	27
4.4.1	Sinteza 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-karbonitrila (1)	27
4.4.2	Sinteza 5-acetoksi-2-klorobenzojske kisline (2).....	28
4.4.3	Sinteza 4-kloro-3-((3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)karbamoil) fenil acetata (3)	29
4.4.4	Sinteza 2-kloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-hidroksibenzamida (4)	30
4.4.5	Sinteza 5-(benziloksi)-2-kloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)benzamida (5).....	31
4.4.6	Sinteza 2-kloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-((4-cianobenzil)oksi)benzamida (6).....	32
4.4.7	Sinteza terc-butil 2-(4-kloro-3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamol)feniloksi)etilkarbamata (7).....	33
4.4.8	Sinteza 5-(2-aminoetoksi)-2-kloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)benzamida (8)	34
4.4.9	Sinteza terc-butil (terc-butoksikarbonilamino)(2-(4-kloro-3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoi)fenoksi)etilamino)metilenkarbamata (9).....	35
4.4.10	Sinteza amino(2(4-kloro-3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoi)fenoksi)etilamino)metaniminijevega klorida (10)	36
4.4.11	Sinteza terc-butil 3-(4-kloro-3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoi)fenoksi)propilkarbamata (11)	37
4.4.12	Sinteza 5-(3-aminopropoksi)-2-kloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)benazmida (12)	38
4.4.13	Sinteza terc-butil (terc-butoskikarbonilamino)(3-(4-kloro-3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoi)fenoksi)propilamino)metilenkarbamata (13)	39
4.4.14	Sinteza amino(3-(4-kloro-3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoi)fenoksi)propilamino)metaniminijevega klorida (14)	40
5	RAZPRAVA	42
5.1	PRAVILO PETIC	42
5.2	SINTEZNI POSTOPKI.....	42
5.3	BIOLOŠKO TESTIRANJE	48
5.3.1	Zaviralna aktivnost	48
5.3.2	Protibakterijska aktivnost	49
6	SKLEP	53
7	LITERATURA.....	55

KAZALO SLIK

Slika 1:	Razlike v zgradbi bakterijske in sesalske celice	1
Slika 2:	Načini horizontalnega prenosa genov pri bakterijah.....	3
Slika 3:	Razlike v zgradbi celične stene G+ in G- bakterij (TP – transmembranski protein, LP – lipoprotein, P – porin)	6
Slika 4:	Osnovna enota peptidoglikana v <i>E. Coli</i>	7
Slika 5:	Razlike med prečnimi povezavami v peptidoglikanu <i>E. Coli</i> (levo) in <i>S. aureus</i> (desno).....	7
Slika 6:	Shematski prikaz biosinteze peptidoglikana.....	10
Slika 7:	Katalitični mehanizem ligaz Mur.....	11
Slika 8:	Struktura encima MurF <i>E. Coli</i> v odprti obliki.....	12
Slika 9:	Struktura encima MurF <i>S. Pneumoniae</i> v kompleksu z inhibitorjem (spojina 1 v poglavju 1.4.1.2).....	12
Slika 10:	Do sedaj objavljeni inhibitorji encima MurF, ki nimajo protibakterijskega delovanja	14
Slika 11:	Prvi objavljeni inhibitorji encima MurF, ki imajo poleg zaviralne aktivnosti tudi protibakterijsko delovanje	14
Slika 12:	Preoblikovanje spojin vodnic	16
Slika 13:	Splošna sintezna shema pridobivanja potencialnih cianotiofenskih inhibitorjev encima MurF	17
Slika 14:	Končne spojine za testiranje inhibitorne aktivnosti in morebitnega protibakterijskega delovanja	17
Slika 15:	Mehanizem nukleofilne substitucije z vmesnim nestabilnim tetraedričnim intermediatom	43
Slika 16:	Mehanizem nukleofilne substitucije v peti stopnji sinteze	44
Slika 17:	Pričakovani mehanizem Mitsunobu reakcije	46
Slika 18:	Mehanizem sinteze z Boc zaščitenih gvanidinskih derivatov.....	47
Slika 19:	Cianotiofensi inhibitorji (a, b) sidrani v MurF encim <i>S. Pneumoniae</i> s kokristaliziranim inhibitorjem (zelenoobarvan).....	51

POVZETEK

Prekomerna in nepravilna uporaba protimikrobnih učinkovin je povzročila razvoj bakterijske rezistence, ki postaja zaradi vse večjega porasta vedno bolj zaskrbljujoč svetovni zdravstveni problem. Poleg vedno večjega ozaveščanja javnosti o pravilni in smotrni uporabi protimikrobnih učinkovin je vse bolj intenzivno tudi odkrivanje novih učinkovin, ki bi delovale na druge tarče, kot do zdaj odkriti antibiotiki. Bakterijska celična stena s svojo biosintezo predstavlja zaradi svojih edinstvenih lastnosti, ki zagotavljajo delovanje protibakterijskih učinkovin po principu selektivne toksičnosti, popolno tarčo za razvoj novih protimikrobnih zdravil.

V okviru magistrske naloge smo se usmerili v iskanje inhibitorjev encima MurF, ki je poleg ostalih encimov iz družine ligaz Mur odgovoren za znotrajcelično biosintezo peptidoglikana, glavnega gradnika bakterijske celične stene. Ligaza MurF je encim, ki katalizira zadnjo stopnjo biosinteze peptidnega dela peptidoglikana in je kot takšen esencialnega pomena za preživetje bakterijske celice. Na podlagi nedavno objavljenih inhibitorjev encima MurF s cianotiofenskim skeletom smo sintetizirali spojine, ki imajo na omenjeni skelet pripete različne substituente, s čimer smo želeli doseči potencialno večjo zaviralno kot tudi protibakterijsko aktivnost. Pri načrtovanju smo se osredotočili na čim boljše prileganje inhibitorja v aktivno mesto encima ter na zagotavljanje ustreznih interakcij, ki so ključnega pomena za doseganje želenega učinka. Ob tem je bilo izredno pomembno tudi ohranjanje ustreznih farmakokinetičnih lastnosti načrtovanih derivatov, ki so ključne za prehod skozi celično membrano v notranjost celice, kjer se tarčni encim nahaja. Sintetizirane spojine smo s pomočjo različnih metod (NMR, IR, MS...) ustrezeno ovrednotili in jim nato izmerili morebitno inhibitorno aktivnost na izoliranih encimih MurF *E. Coli* in *S. Pneumoniae*, najbolj aktivnim pa je bil določen tudi zaviralni učinek na rast bakterijskih sevov *E. Coli*, *S. Aureus* in *S. Pneumoniae*. Na podlagi dobljenih rezultatov smo ugotovili, da nekatere spojine izkazujejo precej dobre inhibitorne lastnosti. Pri tem izstopajo predvsem gvanidinski derivati, ki poleg tega, da encim inhibirajo v dokaj nizkem mikromolarnem območju, izkazujejo tudi protibakterijsko aktivnost, kar dokazujejo spodbudne MIC vrednosti. S tem nam je uspelo sintetizirati spojine in tako doseči rezultate, ki so se glede na do sedaj objavljene raziskave izkazali za zelo uspešne. Sintetizirani derivati predstavljajo zelo dobro izhodišče za nadaljnjo optimizacijo in morebiten razvoj novega razreda protibakterijskih učinkovin.

ABSTRACT

Excessive and inappropriate use of antimicrobial agents has led to the development of bacterial resistance, which is becoming an increasingly alarming global health problem. In addition to raising public awareness of the correct and rational use of antimicrobial agents, also the development of new drugs, that act on other targets than known antibiotics, has become more intensive. Because of its unique biosynthesis, which ensures the functioning of antibacterial substances by the principle of selective toxicity, bacterial cell wall is a perfect target for the development of new antimicrobial agents.

In this thesis we have focused on the search of new inhibitors of MurF enzyme, which is together with other enzymes of the family of Mur ligases responsible for the intracellular biosynthesis of peptidoglycan, the main building block of the bacterial cell wall. MurF enzyme catalyzes the last step of biosynthesis of peptide part of peptidoglycan and is therefore essential for the survival of the bacterial cell. Based on the recently published cyanothiophene inhibitors of MurF enzyme, we synthesized structurally related compounds, having a variety of substituents attached to the above-mentioned main structure, in order to achieve potentially greater inhibitory as well as antibacterial activity. In planning we focused on optimizing the fit of the inhibitor within the active site of the enzyme and the provision of relevant interactions that are essential for achieving the desired effect. At the same time it was extremely important to maintain appropriate pharmacokinetic properties of planned compounds, which enable their passage through the cell membrane into the cell interior, where the target enzyme is located. The synthesized compounds were characterized using various methods (NMR, IR, MS...). Later the potential inhibitory activity on isolated enzymes MurF from *E. Coli* and *S. Pneumoniae* was measured. For the most active compounds an inhibitory effect on the growth of bacterial strains *E. Coli*, *S. Aureus* and *S. Pneumoniae* was also determined. Based on the results obtained we concluded that some compounds have quite good inhibitory properties. Guanidine derivatives, which inhibit the isolated enzyme in a relatively low micromolar range and also show antibacterial activity, as evidenced by encouraging MIC values, show the most potential. In this way we were able to synthesize compounds that achieve results, which according to previous published researches proved to be very successful. Synthesized derivatives represent a very good starting point for further optimization and the potential development of a new class of antibacterial agents.

SEZNAM OKRAJŠAV

AcCoA	acetilkoencim A
ATP	adenozintrifosfat
B	baza
Boc	t-butiloksikarbamoilna skupina
C₅₅-P	polizoprenoidni nosilec undekaprenil fosfat
CDCl₃	devteriran kloroform
Ddl	D-alanil-D-alanin ligaza
d	dublet
DIAD	diizopropil azodikarboksilat
D-Ala	D-alanin
dd	dublet dubleta
D-Glu	D-glutaminska kislina
DKM	diklorometan
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DMSO-d₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. Coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ekv.	ekvivalent
ESI	ionizacija z razprševanjem v električnem polju
G +	po Grammu pozitivne bakterije
G -	po Grammu negativne bakterije
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
GlmS	glukozamin 6-fosfat sintaza
GlmM	fosfoglukozamin mutaza
GlmU	bifunkcionalen encim glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza in glukozamin-1-fosfat uridiltransferaza
HMM PBP	visokomolekularni penicilin vezavni proteini
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti
Hz	Hertz
IC₅₀	koncentracija inhibitorja, ki zmanjša aktivnost encima za polovico

IR	infrardeča spektroskopija
J	sklопитвена константа
K_i	константа инхибиције
Lipid I	ундекапренил-пирофосфорил-MurNAc-пентапептид
Lipid II	ундекапренил-пирофосфорил-MurNAc-(пентапептид)-GlcNAc
m	multiplet
M	молярност (mol/L)
Me	метилна скупина
MeOD	devteriran метанол
mezo-A₂pm	<i>mezo</i> -дiamинопимелинска киселина
MIC	минимална инхибиторна концентрација
Mpl	муроепептидна лигаза
MRSA	на метицилин одпорен <i>Staphylococcus aureus</i>
MraY	UDP-N-acetilmuramoil-пентапептид фосфотрансфераза
MS	масна спектрометрија
MurA	UDP-N-acetylglukozamin enolpiruviltransferaza
MurB	UDP-N-acetilenolpiruvilglukozamin reduktаза
MurC	UDP-N-acetilmuramat L-alanin лигаза
MurD	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat лигаза
MurE	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-meso-diamинопимелат лигаза
MurF	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-meso-diamинопимелат-D-alanin-D-alanin лигаза
MurG	N-acetylglukozamin transferаза
MurNAc	N-acetilmuraminska киселина
nm	нанометр
NMR	нукlearna magnetna resonanca
P_i	аногрански фосфат
PBP	пеницилин vezавни протеини
PEP	фосфоенолпируват
RA	реzидуална активност енцима
R_f	ретенцијски фактор
s	singlet

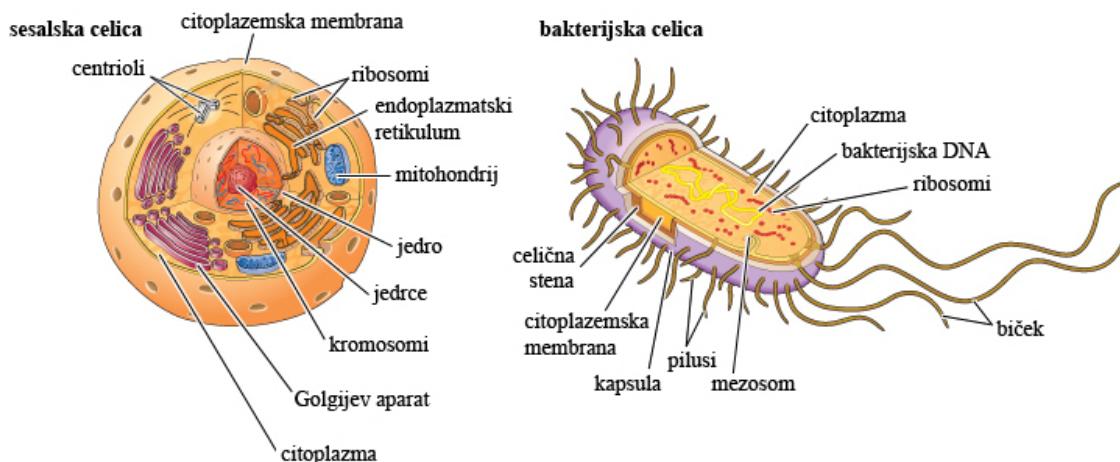
S. aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
S. pneumoniae	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
t	triplet
T_{tal}	temperatura tališča
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
UMP	uridin monofosfat
UDP	uridin difosfat
UTP	uridin trifosfat
VRE	na vankomicin odporni enterokoki
δ	kemijski premik
λ	valovna dolžina
η	izkoristek

1 UVOD

1.1 PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE

Protibakterijske učinkovine so učinkovine, ki preko različnih mehanizmov delujejo proti patogenim mikroorganizmom. Učinkujejo tako, da uničujejo (baktericidno delovanje) ali pa zavirajo rast in razvoj mikroorganizmov (bakteriostatično delovanje). Mednje štejemo antibiotike, ki so lahko popolnoma naravnega izvora (proizvajajo jih različne vrste mikroorganizmov) ali pa je naravno pridobljena komponenta delno modificirana (polsintežni izvor) in kemoterapevtike, katerih izvor je izključno sintezen.

Delovanje tovrstnih učinkovin temelji na principu selektivne toksičnosti, kar pomeni, da delujejo le na povzročitelja bolezenskega stanja, na gostitelja (človek, žival) pa nimajo škodljivega učinka – to omogočajo številne razlike med bakterijsko in sesalsko celico (1).



Slika 1: Razlike v zgradbi bakterijske in sesalske celice (povzeto po 2)

Po svoji kemijski zgradbi so protibakterijske učinkovine zelo raznolike in jih lahko glede na mehanizem delovanja razdelimo v več skupin (3, 4):

- zaviralci sinteze celične stene (β -laktami, glikopeptidi),
- zaviralci sinteze proteinov (makrolidi, aminoglikozidi, tetraciklini, kloramfenikol, linezolid),
- zaviralci sinteze nukleinskih kislin (florokinoloni, rifampicin),
- protibakterijske učinkovine, ki motijo celični metabolizem - antimetaboliti (sulfonamidi, analogi folne kisline),

- protibakterijske učinkovine, ki vplivajo na prepustnost celične membrane (polimiksini, daptomicin).

1.2 BAKTERIJSKA REZISTENCA

Bakterijska rezistenca postaja zaradi prekomerne in nepravilne rabe protimikrobnih učinkovin vse večji zdravstveni problem. V zadnjih desetletjih je prišlo do razvoja odpornosti celo do te mere, da danes skoraj ne poznamo več nobene terapevtsko učinkovite in klinično uporabne protibakterijske učinkovine, proti kateri določeni bakterijski sevi še niso razvili mehanizmov, ki povzročajo njeno neučinkovitost (5). Dejstvo je, da razvoj tovrstnih učinkovin ne dohiteva vse hitrejšega porasta odpornosti, kar je vedno bolj zaskrbljujoče, hkrati pa služi v opomin k bolj racionalni in upravičeni rabi tako antibiotikov kot ostalih sinteznih protibakterijskih učinkovin. Vedno več je tudi raziskav, usmerjenih v iskanje novih tarč in mehanizmov, ki bi omogočili razvoj novih učinkovin. Pri tovrstnih procesih je potrebno upoštevati nekatera dejstva, ki so ključnega pomena za učinkovitost in uporabnost protibakterijskega zdravila:

- izbrana tarča mora biti za škodljiv organizem esencialna, kar pomeni, da bo njena inhibicija povzročila upočasnjeno rast ali celo smrt bakterije,
- ohranitev strukture tarče pri več vrstah bakterij, s čimer vplivamo na širino spektra učinkovine,
- upoštevanje načela selektivne toksičnosti – učinkovina deluje le na patogeni organizem,
- sposobnost učinkovine, da se z visoko afiniteto veže v tarčno mesto, kjer povzroči biološki učinek – »druggability« (6).

Povzročitelji, ki danes zaradi razvoja rezistence predstavljajo največji problem, so med drugim tudi najpogostejši vzrok bolnišničnih okužb. Mednje štejemo proti meticilinu odporen *Staphylococcus aureus* (MRSA), proti vankomicinu odporen *Enterococcus faecium* in *faecalis* (VRE), na karbapeneme odporni *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* ter mnoge druge (7). Zdravljenje okužb s tovrstnimi patogeni zahteva posebno pozornost in je precej bolj zapleteno (posledično tudi daljše in dražje), saj so antibiotiki, ki še ostanejo na razpolago, manj učinkoviti (8).

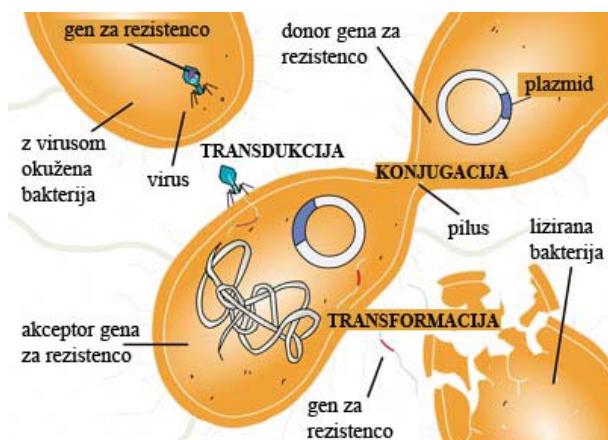
V takšnih primerih je ključnega pomena tudi ustrezeno preprečevanje širjenja rezistentnih bakterijskih sevov. Poleg omejene in upravičene rabe antibiotikov so pomembni tudi ukrepi, ki vključujejo ustrezne higienske standarde (uporaba zaščitnih sredstev, razkuževanje, umivanje rok itd.), izolacije okuženih bolnikov, sledenje in nadzor okužb (9).

1.1.1 Naravna odpornost

Naravno odpornost imenujemo tudi prirojena oziroma intrinzična in je vedno značilna za določen rod oziroma vrsto bakterij, saj temelji na bioloških in strukturnih značilnostih patogena (10). Gre za rezistenco, ki jo lahko pri izbiri ustreznega zdravila že vnaprej predvidevamo, saj nekatere vrste bakterij ne vsebujejo določenih tarčnih mest (npr. rod *Mycoplasma* ne vsebuje celične stene) ali pa je njihova zgradba takšna, da je dostop učinkovine v celico otežen. Tako je na primer splošno znano, da so vse po Gramu negativne bakterije naravno odporne proti vankomicinu, kar je potrebno upoštevati pred vpeljavo ustrezne terapije (11).

1.2.1 Pridobljena odpornost

Mutacije v bakterijskem genomu lahko vodijo v drugačno strukturo in funkcijo proteinov, kar lahko med drugim privede tudi do pridobljene odpornosti, ki je značilna samo za določene seve bakterijskega rodu oziroma vrste (12). Ta se lahko nadalje prenaša vertikalno (z delitvijo bakterije) ali horizontalno s prenosom genoma na tri različne načine: s transdukциjo (preko bakteriofagov in integronov), konjugacijo (preko plazmidov) ali transformacijo (prosta DNA se vgradi v dedni material gostiteljske celice) (10, 13).



Slika 2: Načini horizontalnega prenosa genov pri bakterijah (14)

1.2.2 Mehanizmi bakterijske odpornosti

Znanih je pet osnovnih mehanizmov odpornosti, s katerimi bakterije pomembno zmanjšajo ali celo izničijo učinek antibiotika oziroma kemoterapevtika (10, 14):

- sprememba prijemališča (tarčnega mesta) učinkovine,
- produkcija encimov, ki učinkovino inaktivirajo oziroma razgradijo,
- zmanjšana prepustnost celične membrane za prehod učinkovine v celico,
- aktivno črpanje učinkovine iz celice preko posebnih membranskih črpalk,
- sprememba metabolne poti, preko katere učinkovina deluje.

1.3 BAKTERIJSKA CELICA

Bakterijske celice se med različni vrstami lahko razlikujejo tako po obliki kot velikosti. Premer večine bakterij se giblje okoli 1 μm , po obliki pa so lahko kroglaste (kokci), paličaste (bacili), ukrivljene (spirili) ali spiralne (spirohete). Notranjost celice zapoljuje citoplazma, kjer poleg bakterijske DNA (nukleoid) najdemo še ribosome, plazmide in različne citoplazemske vključke. Vse skupaj je obdano s selektivno prepustno celično membrano, na katero je iz zunanje strani pripeto še trdno ogrodje celične stene. Glede na vrsto lahko pri tovrstnih organizmih najdemo tudi bičke, ki omogočajo gibanje, ter piluse, s pomočjo katerih se bakterija pripne na izbrano površino ali pa preko njih pride do izmenjave dednega materiala med dvema celicama (konjugacija) (15).

1.3.1 Bakterijska celična stena

Bakterijska celična stena je toga struktura, ki iz zunanje strani obdaja citoplazemske membrane. Za bakterijsko celico je esencialnega pomena, saj je nujna za vzdrževanje notranjega osmotskega tlaka, s čimer preprečuje lizo in s tem gotovo smrt celice, kar predstavlja odlično tarčo za protibakterijske učinkovine. Poleg tega pomembno prispeva tudi k ohranitvi strukture celice, ščiti bakterijo pred zunanjimi vplivi ter sodeluje pri različnih funkcijah (celična delitev, ekstracelularna lokalizacija adhezivnih proteinov ...). Kljub svoji rigidnosti je dovolj elastična oziroma spremenljiva, da omogoča rast in širitev celice, hkrati pa tudi porozna, da lahko določene snovi selektivno prehajajo iz okolja v celico ali obratno (16, 17).

Glavna sestavina bakterijske celične stene je makromolekula, imenovana peptidoglikan, ki je sestavljen iz ponavlajočih se verig dveh aminosladkorjev, ki so med seboj prečno povezane s kratkimi elastičnimi peptidi. Leta 1884 je Christianu Gramu uspelo razviti tehniko barvanja, ki je na osnovi razlik v zgradbi celične stene bakterije razdelila na dve osnovni skupini – Gram pozitivne in Gram negativne bakterije (17).

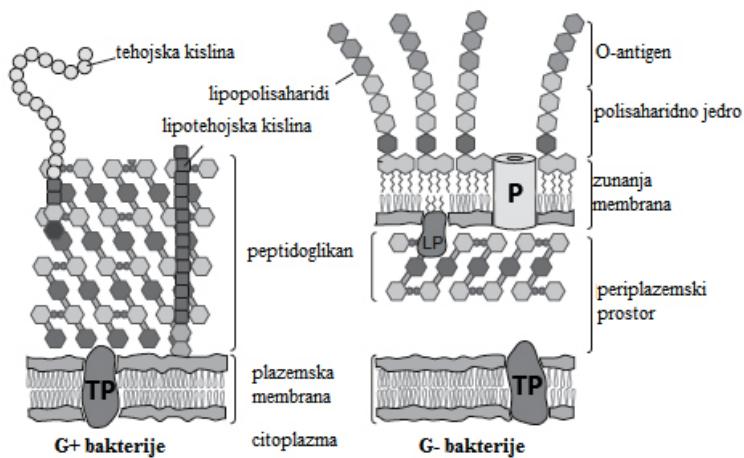
1.3.1.1 G+ bakterije

Celično steno G+ bakterij sestavlja več plasti peptidoglikana v skupni debelini 30-100 nm. Poleg glavnega gradnika so v steno vrinjeni tudi dolgi anionski polimeri - tehojske, lipotehojske in teihuronske kisline, ki lahko skupaj predstavljajo več kot 60 % mase celične stene ter tako pomembno prispevajo k zgradbi in funkciji strukture. Tehojske kisline so lahko kovalentno vezane na peptidoglikan in so večinoma sestavljene iz glicerol fosfata, glikozil fosfata ali ribitol fosfata, lahko pa so zasidrane v celično membrano in z repi segajo v peptidoglikanski sloj. Slednje imenujemo lipotehojske kisline (17, 18). Fiziološka vloga omenjenih molekul je ionska izmenjava in uravnavanje ustreznih koncentracij ionov v celici. Negativno nabite tehojske kisline so namreč sposobne prenašati dvovalutne katione (18), ki so potrebni za normalno delovanje nekaterih celičnih komponent – še posebej pomembno naj bi bilo zagotavljanje Mg^{2+} ionov, ki so ključni za zagotavljanje stabilnosti membrane in normalno delovanje nekaterih encimov (19, 20).

1.3.1.2 G- bakterije

Celična stena G- bakterij je v primerjavi z G+ bakterijami precej bolj zapletena. Poleg peptidoglikana, ki je pri tovrstnih organizmih prisoten le v nekaj plasteh (1-3 plasti) (21), vsebuje še dodatno zunanjou membrano, ki je preko lipoproteinov pripeta na spodaj ležeči sloj peptidoglikana. Gre za lipidni dvosloj, ki ga sestavljajo predvsem lipopolisaharidi, ki so ključni pri preprečevanju prostega prehoda nekaterih snovi v celico in pri človeku sprožijo biološki odziv oziroma aktivacijo imunskega sistema. Sestavljajo jih disaharidi glukozamina s šestimi ali sedmimi acilnimi verigami, polisaharidno jedro in polisaharidna veriga, imenovana O-antigen. Poleg tega se v zunanji membrani nahajajo tudi nekateri encimi (fosfolipaze, proteaze) in pa proteini, ki jih lahko razdelimo na dve glavni skupini. To so lipoproteini in proteini, ki so gradniki porinov, ki omogočajo pasivno difuzijo manjših molekul (mono-, disaharidov, aminokslin). Med zunanjo in notranjo membrano se

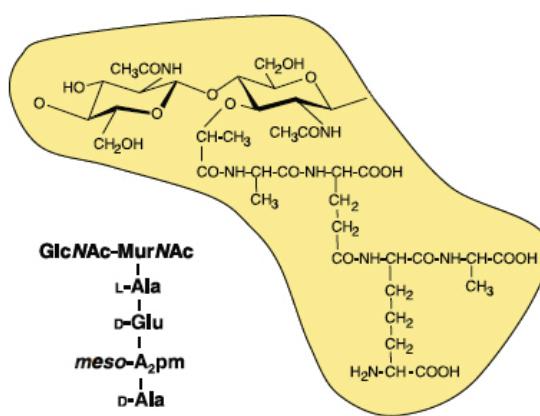
nahaja periplazemski prostor, kjer poleg peptidoglikana najdemo tudi proteine in pribavnne encime. Tovrstna sestava celične stene G- bakterij pomeni manjšo prepustnost, ki precej bolj otežuje prehod protibakterijskih učinkovin v celico kot pri G+ bakterijah, kar je tudi poglaviten razlog večjega pojava rezistence pri bakterijah, ki vsebujejo zunanjo membrano (17).



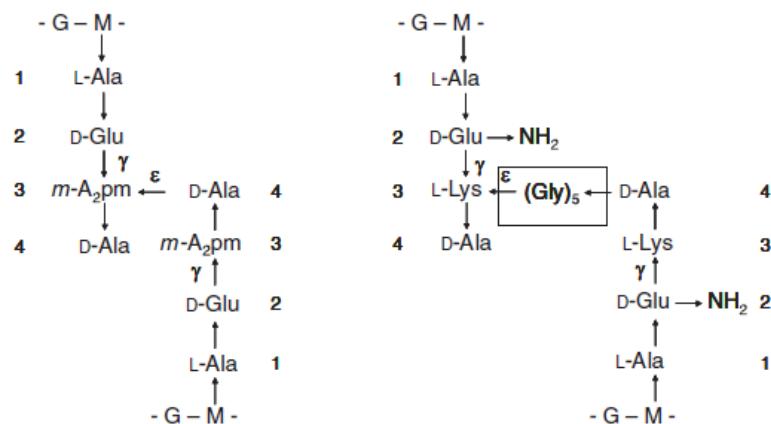
Slika 3: Razlike v zgradbi celične stene G+ in G- bakterij (TP – transmembranski protein, LP – lipoprotein, P – porin)
(povzeto po 17)

1.3.2 Peptidoglikan in njegova biosinteza

Peptidoglikan je glavni gradnik celične stene. Sestavlja ga linearne glikanske verige, kjer se izmenjujeta *N*-acetilmuraminska kislina (MurNAc) in *N*-acetilglukozamin (GlcNAc), ki sta med seboj povezana z β 1,4 vezjo. Verige omenjenih aminosladkorjev so prečno premrežene s kratkimi peptidi. Na laktoilno skupino MurNAc je pripet pentapeptid L-alanin (L-Ala), D-glutaminska kislina (D-Glu), *mezo*-diaminopimelinska kislina (*mezo*-A₂pm) oziroma L-lizin (L-Lys) in D-alanil-D-alanin (D-Ala-D-Ala). V zrelem peptidoglikanu zadnjega D-ala ne najdemo več, saj se ta pri vgrajevanju v obstoječi peptidoglikan odstrani, ko pride do povezave med karboksilno skupino D-Ala na mestu 4 ene peptidne verige in aminoskupino kisline na mestu 3 druge peptidne verige. Povezava je lahko neposredna ali pa poteka preko kratkega peptidnega mostička (22).

Slika 4: Osnovna enota peptidoglikana v *E. Coli* (povzeto po 22)

Zgradba peptidoglikana je odvisna tako od vrste bakterije kot tudi od pogojev rasti, kar prinaša razlike v prečnih povezavah, sestavi penta- oziroma tetrapeptida in strukturi glikanske verige. Najbolj očitne so razlike med G+ in G- bakterijami. Pri G+ bakterijah najdemo na tretjem mestu peptida običajno L-Lys, medtem ko se pri G- bakterijah tam nahaja *mezo*-A₂pm. V večini G+ bakterij prečne povezave med peptidnimi verigami potekajo preko intrapeptidnih mostičkov, ki so običajno sestavljeni iz 1-7 aminokislin. V bakteriji *Staphylococcus aureus* na tem mestu najdemo pentaglicinski mostiček, medtem ko je pri G- bakterijah povezava med tretjo aminokislino prve verige in četrto aminoksilino druge verige običajno neposredna (22). Razlike v glikanskih verigah so posledica sekundarnih modifikacij, kot so N-deacetilacija, O-acetilacija in N-glikolizacija. Posledično najdemo v bakterijah različne stopnje deacetiliranosti glukozaminskih ostankov oziroma ostankov muraminske kisline ali pa prihaja do prisotnosti dodatnih acetilnih skupin na MurNAc, namesto acetatnih ostankov pa lahko najdemo tudi glikolatne (23).

Slika 5: Razlike med prečnimi povezavami v peptidoglikanu *E. Coli* (levo) in *S. aureus* (desno) (22)

Biosinteza peptidoglikana je zapleten proces, ki poteka v dveh delih celice. Začne se v citoplazmi bakterijske celice in se nato iz notranje strani citoplazemske membrane premakne na zunanj, kjer se zaključi.

Proces skupaj sestavlja okoli 20 reakcij, ki potečejo v treh korakih (24):

- sinteza nukleotidnih prekurzorjev v citoplazmi,
- vezava prekurzorjev na lipidni nosilec, ki omogoči prenos skozi celično membrano,
- polimerizacija in vgrajevanje v že obstoječi peptidoglikan.

1.3.2.1 Sinteza nukleotidnih prekurzorjev v citoplazmi

Prva stopnja obsega sintezo UDP-N-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) iz fruktoze-6-fosfata, ki poteče s pomočjo treh encimov. V prvem koraku encim glukozamin-6-fosfat sintaza (GlmS) katalizira pretvorbo D-fruktoze-6-fosfat v D-glukozamin-6-fosfat, pri čemer kot vir dušika uporabi aminokislino L-glutamin. Nastali intermediat nato s pomočjo fosfoglukozamin mutaze (GlmM) izomerizira do glukozamin-1-fosfata, kamor se nato preneseta še acetilna skupina iz acetil koencima A (AcCoA) in uridilna skupina iz uridin trifosfata (UTP) - nastane UDP-GlcNAc. Zadnji dve stopnji katalizira bifunkcionalen encim glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza in glukozamin-1-fosfat uridiltransferaza (GlmU).

V drugi stopnji iz UDP-GlcNAc nastane UDP-N-acetilmuraminska kislina (UDP-MurNAc). Encim MurA prenese enolpiruvat iz fosfoenolpiruvata (PEP) na 3'-hidroksilno skupino UDP-GlcNAc, pri čemer se sprosti anorganski fosfat. V nastalem UDP-GlcNAc-enolpiruvatu pride nato do redukcije enolne skupine do laktata s pomočjo encima MurB.

Sledi prpenjanje peptidov na D-laktoilno skupino UDP-MurNAc, ki ga katalizira skupina od ATP odvisnih encimov, imenovana Mur ligaze. Najprej encim MurC pripne L-Ala, nato MurD D-Glu, MurE L-Lys oziroma *mezo*-A₂pm, nazadnje pa MurF doda še dipeptid D-Ala-D-Ala, ki ga predhodno sintetizira D-alanil: D-alanin ligaza (Ddl) (24).

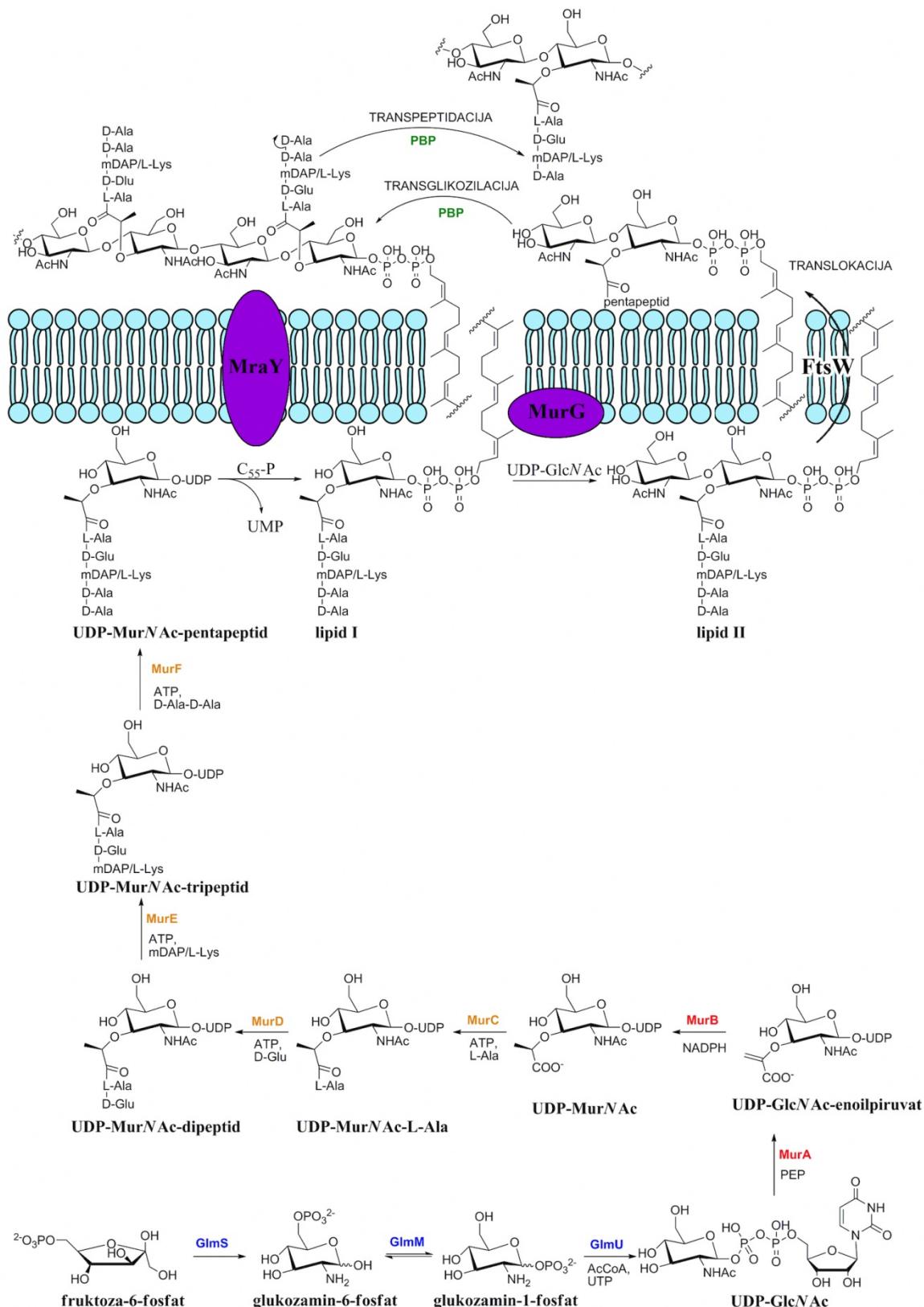
1.3.2.2 Vezava prekurzorjev na lipidni nosilec in prenos skozi celično membrano

Drugi korak biosinteze peptidoglikana poteče v dveh stopnjah. Najprej pride do vezave UDP-MurAc-pentapeptida na poliizoprenoidni nosilec undekaprenil fosfat (C₅₅-P). Reakcijo katalizira encim MraY, pri čemer nastaneta UMP in undekaprenil pirofosforil-MurNAc-pentapeptid oziroma lipid I. V naslednji stopnji glikozil trasnferaza (encim

MurG) na C4 hidroksilno skupino lipida I prenese GlcNAc iz UDP-GlcNAc, kar pripelje do nastanka lipida II (undekaprenil pirofosforil-MurNAc-pentapeptid-GlcNAc) (25, 26). Lipid II se nato prenese na zunanj stran celične membrane. Točen mehanizem prenosa in encim, ki je odgovoren zanj, še nista povsem znana. Zadnje raziskave kažejo, da gre najverjetnej za flipazo imenovano FtsW (27, 28).

1.3.2.3 Polimerizacija in vgrajevanje v že obstoječi peptidoglikan

V zadnji stopnji potekata dva poglavitna procesa, ki ju katalizirajo membranski proteini, imenovani penicilin-vezavni proteini (PBP). Znanih je več različnih skupin PBP, ki se razlikujejo po svoji velikosti in funkciji posameznih delov. Visokomolekularni penicilin vezavni proteini razreda A (HMM PBP) imajo v svoji zgradbi prisotno tako transglikozilazno kot transpeptidazno domeno, kar temu bifunkcionalnemu encimu omogoča povezovanje slatkornih verig in njihovo prečno premreženje s peptidnimi verigami. Po prenosu lipida II na zunanj stran membrane pride najprej do transglikozilacije, kjer se prej sintetizirane sladkorne enote med seboj povezujejo v daljša glikanska vlakna. Ta se nato tekom transpeptidacije med seboj prečno povežejo s pomočjo transpeptidazne domene (29). Transpeptidaza s serinom v aktivnem mestu napade karbonilni ogljik peptidne vezi med D-Ala in D-Ala v pentapeptidni verigi, pri tem nastane acilni intermediat, terminalni D-Ala pa se odcepi. Aktiviran acilni intermediat nato reagira s prosto amino skupino L-Lys ozioroma *mezo*-A₂pm na mestu 3 sosednje peptidne verige, s čimer se pripenjanje novo nastalih komponent v obstoječi peptidoglikanski sloj zaključi (30).



Slika 6: Shematski prikaz biosinteze peptidoglikana

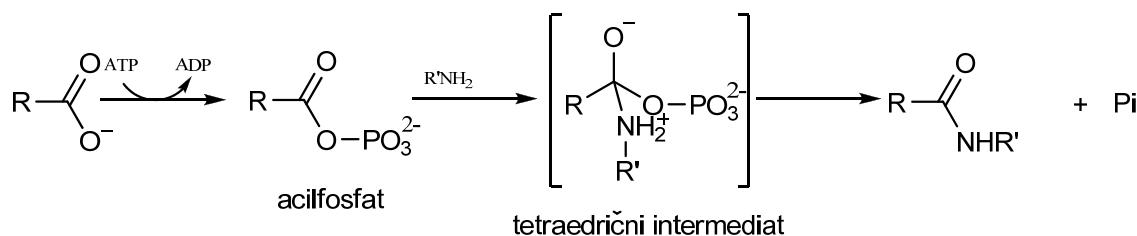
1.4 LIGAZE Mur

Ligaze Mur (MurC, MurD, MurE in MurF) so skupina od ATP odvisnih aminokislinskih ligaz, ki s postopnim dodajanjem aminokislinskih ostankov na D-laktatoilno skupino UDP-MurNAc omogočijo nastanek UDP-MurNAc-pentapeptida. Tovrstni encimi tako pomembno prispevajo k izgradnji celične stene, zato so esencialnega pomena za preživetje celice, kar pomeni, da predstavljajo privlačne tarče za razvoj novih inhibitorjev. V okviru magistrskega dela smo načrtovali in razvijali inhibitorje encima MurF, zato je v nadaljevanju večji poudarek ravno na tem encimu.

1.4.1 Ligaza MurF

Ligaza MurF oziroma UDP-N-acetilmuramoil-tripeptid:D-alanil-D-alanin ligaza katalizira zadnjo stopnjo v sintezi pentapeptida, ko na rastoči tripeptid pripne dipeptid D-alanil-D-alanin, s čimer zaključi pripajanje aminokislin na monomerni prekurzor pri tvorbi peptidoglikana.

Predpostavljeni mehanizem katalize vključuje aktivacijo karboksilata nukleotidnega substrata (UDP-N-acetilmuramoil-tripeptid) do acilfosfata ob prisotnosti ATP. Temu sledi nukleofilni napad aminoskupine dipeptida D-Ala-D-Ala, kar pripelje do nastanka nestabilnega tetraedričnega intermediata, ki nato razpade na anorganski fosfat in novo nastali pentapeptid (31).

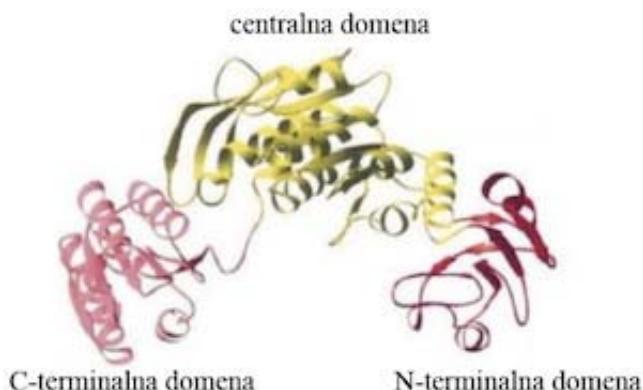


Slika 7: Katalitični mehanizem ligaz Mur

1.4.1.1 Zgradba MurF ligaze

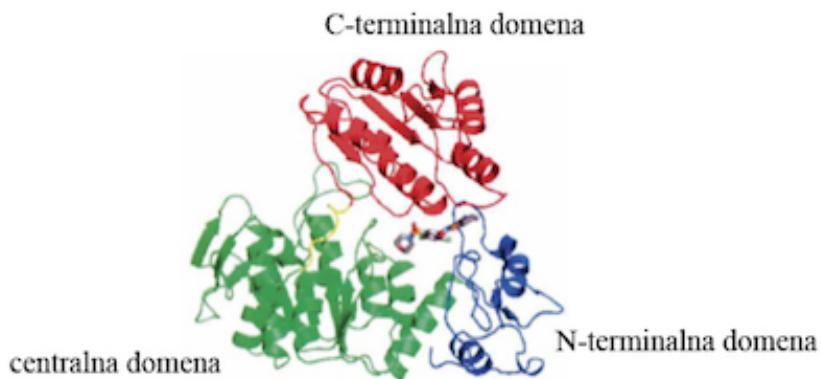
Študije kristalne strukture MurF ligaze *E. Coli* v odprti konformaciji so pokazale, da encim sestavlja tri domene, ki so skupaj povezane v obliko polmeseca. V primerjavi s strukturo MurD ligaze ima tovrsten encim podobno sestavo centralne in C-terminalne domene, medtem ko je zgradba N-terminalne domene povsem drugačna in značilna samo za MurF. Predstavlja vezavno mesto za substrat, sestavlja pa jo petkrat prepognjena plošča β ('β-

sheet'), obdana s tremi vijačnicami α , ki je preko zelo kratkega vmesnika (dvakrat prepognjena plošča β z antiparalelno postavitvijo trakov) povezana s centralno domeno. Ta sestoji iz šestkrat prepognjene plošče β , ki jo obkroža osem vijačnic α in predstavlja vezavno mesto za mononukleotid (ATP). Podobno zgradbo takšnih vezavnih mest najdemo tudi v nekaterih drugih ATP-vezavnih proteinih. Med centralno in C-terminalno domeno zopet stoji manjši vmesnik (trikrat prepognjena plošča β z antiparalelno postavitvijo trakov), ki mu sledi šestkrat prepognjena plošča β s petimi vijačnicami α , kjer se nahaja vezavno mesto za dinukleotide, drugače imenovano tudi Rossmannovo zvitje (32).



Slika 8: Struktura encima MurF *E. Coli* v odprti obliki (32)

Kasnejše preučevanje zaprte oblike MurF ligaze *Streptococcus pneumoniae* v kompleksu z inhibitorjem je pokazalo podobno strukturno sestavo vseh treh domen v primerjavi z MurF iz *E. Coli*, medtem ko se njihova prostorska ureditev bistveno razlikuje. Pri vezavi inhibitorja v aktivno mesto pride namreč do konformacijskih sprememb, pri čemer se C-terminalna domena zasuka proti ostalima domenama, s čimer vezan inhibitor zapre v notranjost encima (33).



Slika 9: Struktura encima MurF *S. Pneumoniae* v kompleksu z inhibitorjem (spojina 1 v poglavju 1.4.1.2) (33)

1.4.1.2 Ligaza MurF kot tarča potencialnih inhibitorjev

MurF encim s svojimi lastnostmi predstavlja zanimivo in hkrati zelo privlačno tarčo za razvoj novih protimikrobnih učinkovin. Poleg tega, da ga v sesalski celici ne najdemo, kar zagotavlja selektivno toksičnost, ima med drugim tudi ključno vlogo v sintezi peptidoglikana. V primeru nefunkcionalnosti tega encima je torej bakterijska celica obsojena na propad. V prid razvoju tovrstnih inhibitorjev govori tudi dejstvo, da se v genomu tako G+ kot G- bakterij nahaja le ena kopija gena za tovrsten encim, aminokislinsko zaporedje le-tega pa je med različnimi vrstami precej ohranjeno, s čimer se razširi spekter potencialnih zaviralcev encima. Med drugim je bilo dokazano, da je normalno delovanje MurF encima potrebno za zagotavljanje odpornosti proti β-laktamskim antibiotikom pri na meticilin odpornemu *Staphylococcus aureus* (34).

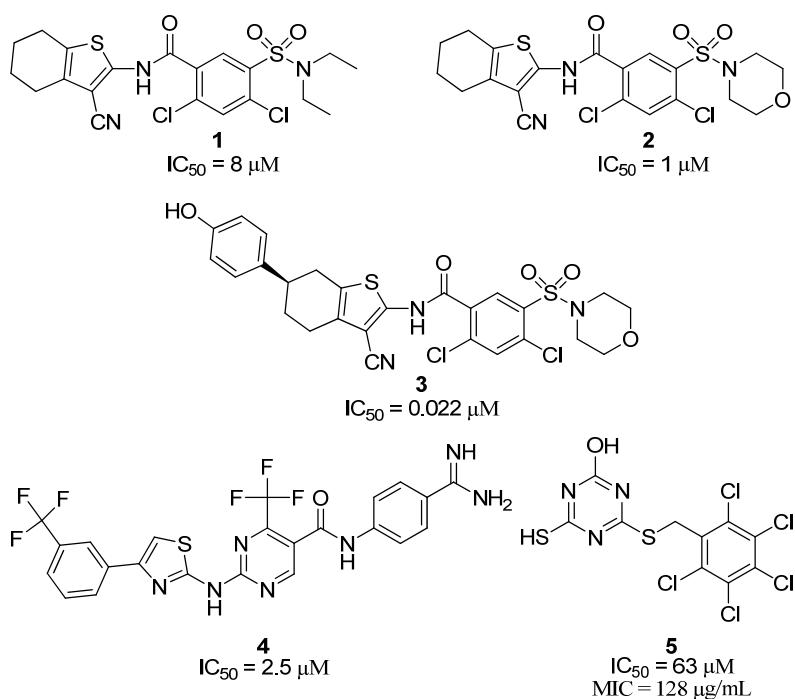
Trenutno je znanih le nekaj razredov inhibitorjev encima MurF. Prve objavljene so bile psevdo-tripeptidne in psevdo-tetrapeptidne aminoalkilfosfinske kisline s splošno strukturo X-Lys-Ψ(PO₂H)-Gly-Ala, ki posnemajo prehodno stanje (tetraedrični acilfosfat). Delujejo kot reverzibilni kompetitivni inhibitorji encima MurF s konstanto inhibicije (K_i) 200-700 μM. Žal se je izkazalo, da spojine nimajo želene protibakterijske aktivnosti (31, 35).

Sledilo je odkritje sulfonamidnih inhibitorjev v Abbott Laboratories. S pomočjo virtualnega rešetanja knjižnice spojin so prišli do dveh molekul (slika 10: **1** in **2**), ki sta bili kasneje predstavljeni tudi kot strukturi v kompleksu z MurF *S. pneumoniae*. Izkazalo se je, da se spojini vežeta v vezavno mesto encima in povzročita spremembo položaja domen in posledično zaprto obliko encima (33). Kasnejša strukturna optimizacija teh dveh molekul je pripeljala do spojin, med katerimi so nekatere izkazovale še boljše zaviralno delovanje na izoliranem encimu (slika 10: **3**), vendar žal nobena ni kazala bistvene antibakterijske aktivnosti kljub prisotnosti snovi, ki so izboljšale prepustnost celične stene (36, 37).

Znane so tudi serije spojin iz skupine tiazolilaminopirimidinov (slika 10: **4**), ki so jih ob uporabi substrata, pripravljenega s pomočjo encima muropeptidne ligaze (Mpl), odkrili raziskovalci pri Johnson & Johnson. Mpl je znana kot peti encim iz družine prej omenjenih ligaz in je odgovorna za pripenjanje tripeptida L-Ala-γ-D-Glu-*mezo*-A₂pm direktno na UDP-MurNAc, raziskovalci pa so se z njeno uporabo izognili problemu zagotavljanja zadostnih količin substrata encima MurF za potrebe testiranja (34).

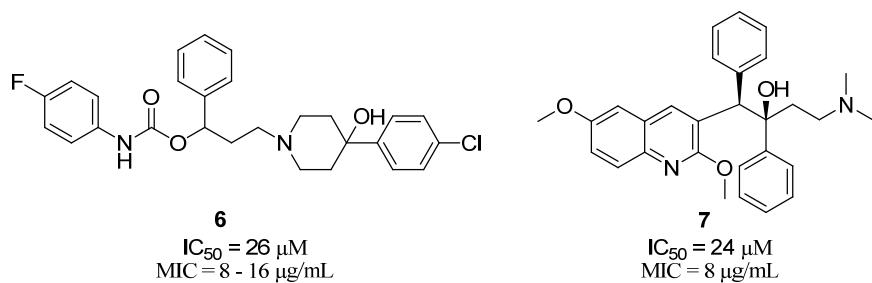
S pomočjo strukturno podprtga virtualnega rešetanja visoke zmogljivosti, ki vključuje analize velikih zbirk spojin, njihovo računalniško sidranje v receptor (»docking«) ter

kasnejše vrednotenje in prepoznavanje potencialnih zadetkov, je bil kasneje odkrit tudi derivat 1,3,5-triazina (slika 10: **5**) (38).



Slika 10: Do sedaj objavljeni inhibitorji encima MurF, ki nimajo protibakterijskega delovanja. (34, 36, 37, 38)

Do danes so bili predstavljeni še 8-hidroksikinoloni, ki prav tako izkazujejo zaviralno delovanje na MurF encim *E. Coli*, hkrati pa so služili kot farmakoforni model, ki je pripeljal do razvoja derivata 4-fenilpiperidina (slika 11: **6**). Slednji ima za razliko od vseh prej omenjenih spojin tudi protibakterijsko aktivnost in je prvi objavljen inhibitor, ki zavira encim MurF v celicah *E. Coli* (39). Na podoben način, s farmakofornim modeliranjem, so bili odkriti tudi derivati diarilkinolonov (slika 11: **7**), za katere se je prav tako izkazalo, da delujejo zaviralno na rast bakterij (40).



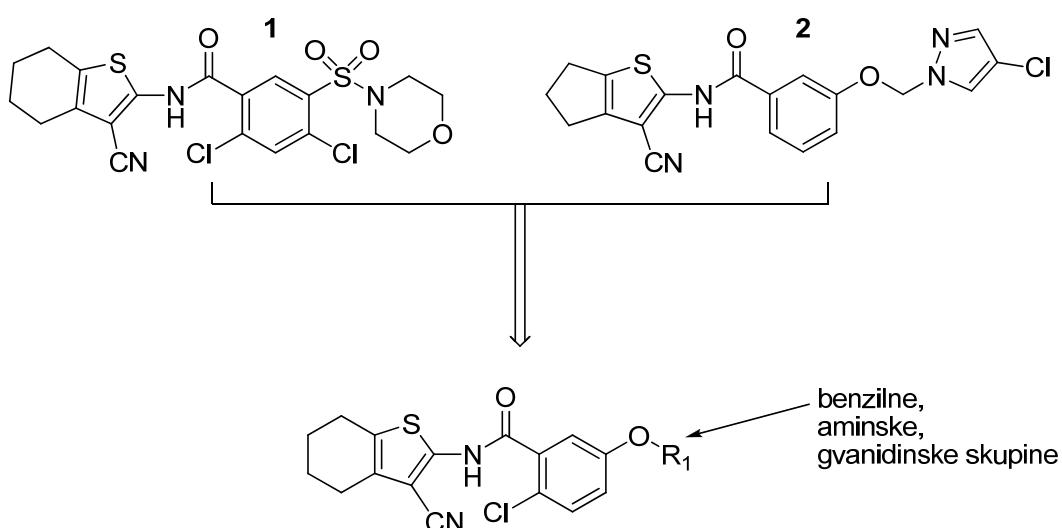
Slika 11: Prvi objavljeni inhibitorji encima MurF, ki imajo poleg zaviralne aktivnosti tudi protibakterijsko delovanje. (39, 40)

2 NAČRT DELA

Cilj magistrskega dela je usmerjen v iskanje novih inhibitorjev encima MurF in zajema načrtovanje, sintezo ter biološko vrednotenje potencialnega zaviralnega in protimikrobnega učinka. Izhajali smo iz članka Y. G. Gu in sodelavcev (36), ki so s pomočjo strukturne optimizacije spojin vodnic, predhodno pridobljenih s pomočjo virtualnega rešetanja, sintetizirali serijo zaviralcev encima MurF s cianotiofenskim skeletom (slika 12: 1). Tekom testiranja so ugotovili, da spojine inhibirajo delovanje izoliranega encima, žal pa nobena ne izkazuje želene protibakterijske aktivnosti. Na osnovi teh spojin je bilo na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani opravljeno virtualno rešetanje na osnovi liganda, kjer so identificirali zadetek v knjižnici spojin ZINC (41) (slika 12: 2), ki je izkazoval mikromolarno zaviralno aktivnost na MurF encimih *E. Coli* ($IC_{50} = 56 \mu M$) in *S. Pneumoniae* ($IC_{50} = 126 \mu M$), žal pa ni imel želenega protimikrobnega delovanja. Iz sledkih obeh člankov so nam služili kot osnova pri načrtovanju novih analogov s potencialnim večjim zaviralskim učinkom in prisotno antibakterijsko aktivnostjo.

Pri preoblikovanju spojin vodnic bomo upoštevali naslednje ugotovitve (36):

- Ciano skupina na tiofenskem delu in amidna vez v centru derivata sta esencialnega pomenu za inhibitorno delovanje spojine. Obe skupini naj bi bili udeleženi pri tvorbi vodikovih vezi v aktivnem mestu encima.
- Derivati s kloridnim atomom na *ortho* mestu benzenovega obroča glede na amidno vez so se izkazali za signifikantno bolj učinkovite, zamenjava le-tega z amino in alkoksi skupinami pa je povzročila njihovo neaktivnost. Klor na omenjenem mestu naj bi zagotavljal ustrezno orientacijo spojine, ki drži amidno vez in fenilni obroč v antiplanarnem položaju, kar je ključnega pomenu pri zagotavljanju ustreznih interakcij inhibitorja z encimom.
- Derivati s cikloheksilnim obročem, pripetim na tiofensi del, so v primerjavi s cikopentilnimi in cikloheptilnimi derivati dosegli najnižje vrednosti IC_{50} , kar pomeni, da so močnejši.



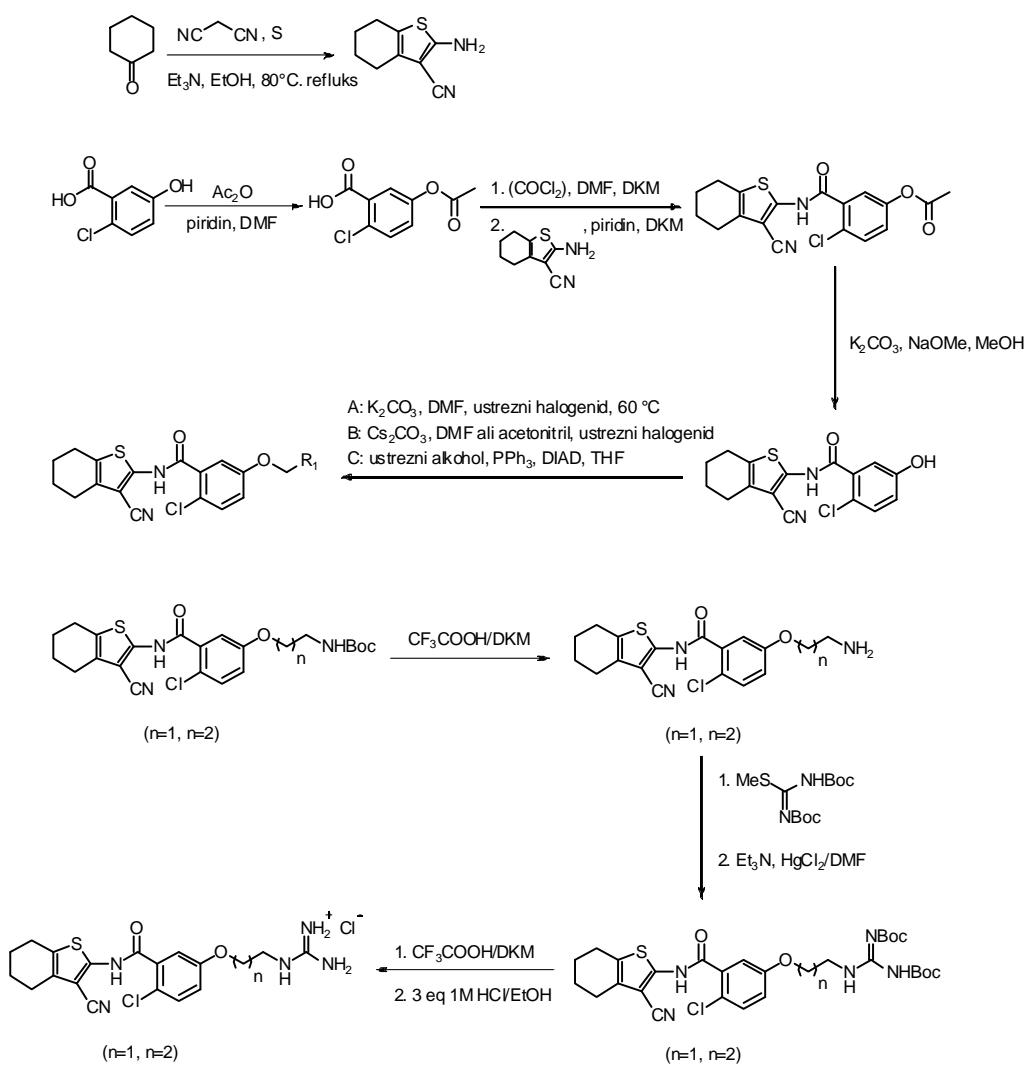
Slika 12: Preoblikovanje spojin vodnic

Podrobneje želimo preučiti vpliv substituent na aromatskem delu spojine, kjer bomo s pripenjanjem različnih komponent na fenolno –OH skupino spremljali spremembe v aktivnosti pridobljenih derivatov.

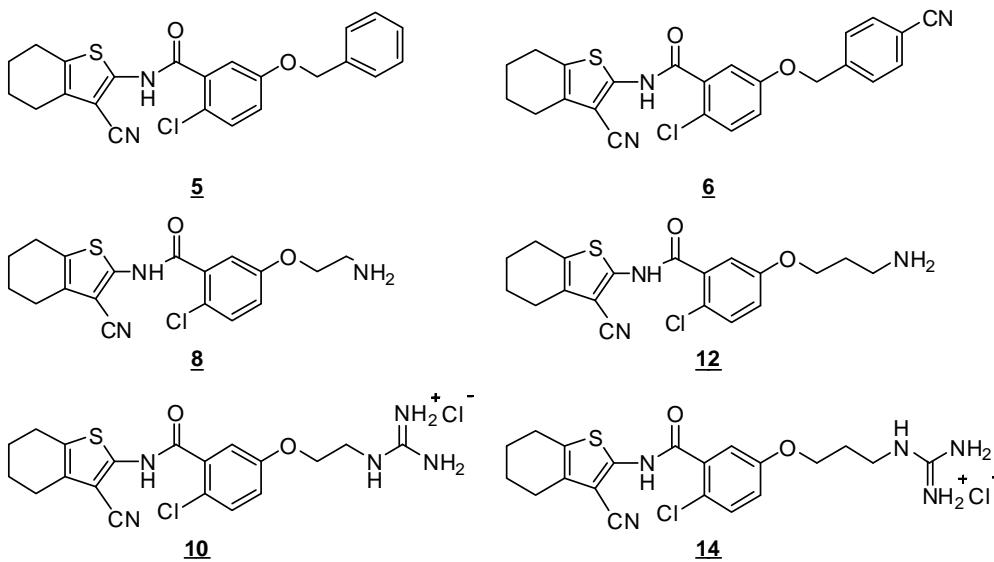
Pri načrtovanju se bomo s pomočjo molekulskega sidranja, ki je opisan v nadaljevanju poglavja, še dodatno osredotočili na čim boljše prileganje inhibitorjev v aktivno mesto encima, pri tem pa bomo upoštevali tudi dejstvo, da mora biti sintetizirana spojina sposobna prehajati skozi celično membrano v notranjost bakterijske celice, kjer se tarčni encim nahaja. V ta namen bomo izračunali parametre, ki so ključni pri napovedovanju permeabilnosti skozi membrano in topnosti spojin.

Kot je prikazano na sintezni shemi (slika 13), bomo v okviru magistrske naloge s pripenjanjem različnih skupin na osnovni skelet, sintetizirali 6 končnih spojin. Dve od teh bosta imeli na aromatski obroč pripeti arilne komponente, dva bosta aminska derivata, dva pa gvanidinska.

Sintetiziranim spojinam bo nato izmerjena zaviralna aktivnost na izoliranih in očiščenih encimih *E. Coli* in *S. pneumoniae*, najbolj aktivnim spojinam pa bo določena tudi minimalna inhibitorna koncentracija (MIC) na bakterijskih sevih *E. Coli*, *S. aureus* in *S. pneumoniae*.



Slika 13: Splošna sintezna shema pridobivanja potencialnih cianotiofenskih inhibitorjev encima MurF



Slika 14: Končne spojine za testiranje inhibitorne aktivnosti in morebitnega protibakterijskega delovanja

2.1 MOLEKULSKO SIDRANJE

S pomočjo metode molekulskega sidranja želimo pojasniti predvideno vezavo inhibitorja v aktivno mesto encima in tako modelirati ustreerne interakcije, ki so ključnega pomena za delovanje spojine. Uporabljene metode in postopki molekulskega sidarnja so podrobneje opisani v poglavju 3.

Pri študijah bo kot tarča uporabljena kristalna struktura encima MurF *S. Pneumoniae* v kompleksu z inhibitorjem (2,4-dikloro-N-[3-ciano-6-[(4-hidroksifenil)metil]-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridin-6-ijev-2-il]-5-morfolinosulfonil-benzamid, PDB koda: 3zm5). Pred samim sidranjem izbranih inhibitorjev bo napravljena validacija omenjenega postopka. Po ustrejni pripravi referenčnega liganda ((2,4-dikloro-N-[3-ciano-6-[(4-hidroksifenil)metil]-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridin-6-ijev-2-il]-5-morfolinosulfonil-benzamid) in virtualnega receptorja bo sledilo sidranje, kjer bomo preverili sposobnost reprodukcije vezavne konformacije inhibitorja eksperimentalno določene z rentgensko difrakcijo kristala encima MurF *S. Pneumoniae*. S pomočjo programske opreme FRED (OE Docking 3.0.1) bo izbranih 10 najustreznejših sidranih struktur, za katere bo na osnovi kvadratnega korena povprečja razdalj (RMSD) ugotovljena kakovost prileganja konformacije referenčnega liganda v primerjavi z eksperimentalno določeno kristalno strukturo encima MurF *S. Pneumoniae* v kompleksu z inhibitorjem (PDB koda: 3zm5). Sledilo bo sidranje načrtovanih spojin, vrednotenje pridobljenih struktur ter preučevanje interakcij inhibitorja z aktivnim mestom encima.

2.2 NAČRTOVANJE USTREZNIH FARMAKOKINETIČNIH LASTNOSTI

Veliko do sedaj objavljenih inhibitorjev je sicer izkazovalo zaviralni učinek, nadaljnja testiranja pa so žal pokazala, da nimajo ustrezne protibakterijske aktivnosti. Tarčni encim, kjer tovrstne spojine delujejo, se nahaja znotraj celice, kar pomeni, da moramo zagotoviti ustrezne lastnosti molekul, ki bodo omogočale prehod skozi celično membrano po principu pasivne difuzije. Ravno to je najverjetneje tudi razlog, zakaj nekatere že objavljene spojine antibakterijskega učinka ne dosegajo. Iz tako imenovanega pravila petic, ki so ga postavili Lipinski in sodelavci s pomočjo eksperimentalnih in računskih pristopov, je namreč znano, da sta slaba absorpcija in permeabilnost bolj verjetni, kadar ima spojina molekulska maso

nad 500, izračunani logP nad 5, več kot 5 donorjev vodikovih vezi in več kot 10 akceptorjev vodikovih vezi (42). V namen doseganja čim boljših farmakokinetičnih lastnosti spojin se bomo tekom načrtovanja držali omenjenega principa, kar bomo preverili tudi z izračunom omenjenih parametrov za sintetizirane spojine.

3 MATERIALI IN METODE

▪ reagenti in topila

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali kemikalije in topila proizvajalcev Sigma-Aldrich, Acros, Alfa Aesar, Fluka in Merck. Brezvodna topila smo pripravili s pomočjo destilacije in sušenja nad siti.

▪ kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC): reakcije smo spremljali s pomočjo tankoplastne kromatografije (TLC), kjer smo uporabljali plošče prozvajalca Merck - Silica gel 60 F₂₅₄ z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminjastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Lise smo detektirali s pomočjo UV lučke ($\lambda=254$ nm) in orositvenega reagenta ninhidrina.

Kolonska »flash« kromatografija: pri čiščenju produktov s pomočjo kolonske »flash« kromatografije smo uporabljali silikagel Kieselgel velikosti 0,040 – 0,063 mm proizvajalca Merck.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC): HPLC analize so bile opravljene na instrumentu Agilent Technologies HP 1100 z G1365 UV-VIS detektorjem (220 in 254 nm), pri čemer je bila uporabljena kolona Luna C18 (4.6 × 250 mm) pri pretoku 1 mL/min. Elucijsko topilo je predstavljala mešanica 0,1 % trifluoroacetne kisline v vodi (A) in acetonitrila (B). Gradient je bil 10 % do 90 % v 19 min.

Isolera One Biotage: Isolero smo uporabili pri čiščenju končnih polarnih spojin. Stacionarno fazo je predstavljal silikagel s C-18 lipofilnimi verigami, mobilno pa mešanica trifluorocetne kisline in acetonitrila v različnih razmerjih.

▪ programska oprema

Za risanje in poimenovanje struktur ter računanje stehiometrijskih razmerij in logaritma porazdelitvenih koeficientov smo uporabljali programski paket ChemBioOffice 12.0 ponudnika CambridgeSoft.

- **spektroskopske metode**

Jedrska magnetna resonanca: ^1H in ^{13}C spektri so bili posneti na spektrometru Bruker AVANCE III 400MHz s TMS kot internim standardom na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopljalji v CDCl_3 , DMSO-d_6 in MeOD . Pri procesiranju FID oblike spektrov smo uporabljali program MestReNova 8.1 proizvajalca Mestreclab Research S. L.

Masna spektrometrija: Masne spektre so posneli na VG-Analytical Autospec Q spektrometru z ESI metodo ionizacije na Centru za masno spektrometrijo, Inštitut Jožef Stefan, Ljubljana.

Infrardeča spektroskopija: IR spektri so bili posneti na spektrofotometru Perkin-Elmer FTIR 1600, na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

- **določanje tališča**

Tališča smo določali s pomočjo mikroskopa z Leica ogrevalno mizico in so nekorigirana.

- **molekulsko sidranje**

Postopek molekulskega sidranja: Za študije molekulskega sidranja je bila uporabljeni programska oprema FRED (OE Docking 3.0.1) s privzetimi nastavtvami. Spremenjena je bila le resolucija sidranja, in sicer na »visoko« ter število pozicij na 50. Glede na FRED je bilo ovrednotenih najboljših 10 sidranih struktur, kjer so bile s pomočjo kvadratnega korena povprečja razdalj (RMSD) preučevane strukturne razlike med različnimi vezavami. Grafične predstavitve struktur so bile izdelane z uporabo programa Accelrys Discovery Studio 2.5 ponudnika Accelrys Software Inc.

Priprava liganda: Molekule so bile narisane s pomočjo ChemBioDraw Ultra 12.0 in njihova geometrija optimizirana s pomočjo ChemBio 3D Ultra z metodo minimizacije energije (CambridgeSoft). Optimizirane strukture z minimizirano energijo so bile nato izpopolnjene še preko GAMESS vmesnika, pri čemer smo uporabili semiempirično metodo MNDO za minimizacijo energije. Aminski in gvanidinski ligandi so bili glede na pH=7.4 v ioniziranem stanju. Ker programska oprema FRED zahteva določeno število konformerov za vsak ligand, so bili ti izdelani s pomočjo OMEGA 2.4.6 z nastavljenim

maksimumom števila konformacij na 1000 in mejno vrednostjo srednjega kvadratnega odklona (RMS) na 0,3. Vse ostale nastavitev so bile privzete.

Priprava receptorja: Kot referenčna struktura je bila uporabljena kristalna struktura encima MurF *S. Pneumoniae* v kompleksu z ligandom (PDB code: 3zm5). Omenjeni ligand (2,4-dikloro-N-[3-ciano-6-[(4-hidroksifenil)metil]-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridin-6-ijev-2-il]-5-morfolinosulfonil-benzamide) je bil uporabljen z vsemi aktivnimi atomi (vključno z vodiki) ter sidran v mrežo (grid) volumna 32562 Å³, dimenzijs 36.22 Å x 36.33 Å x 24.67 Å in z zunanjim obrisom velikosti 2953 Å² (ustvarjena kot receptor s pomočjo programa Make Receptor 3.0.1).

▪ določanje zaviralne aktivnosti

Zaviralo aktivnost sintetiziranih derivatov je določila dr. Martina Hrast na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani s testom z malahitnim zelenilom na izoliranih encimih MurF *E. Coli* in *S. pneumoniae* po naslednjem postopku:

- 1) Priprava raztopin v skupnem volumnu 50 µL, ki vsebujejo:

Testiranje MurF_{Sp}: 50 mM Hepes, pH 8.0, 50 mM HgCl₂, 0.005 % Triton X-114, 100 µM D-Ala-D-Ala, 50 µM UMtri-L-Lys, 250 µM ATP, izoliran encim MurF_{Sp}, 100 µM testirane spojine v DMSO (končna koncentracija DMSO je 5 % v/v)

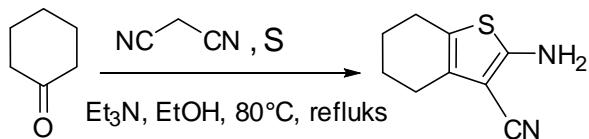
Testiranje MurF_{Ec}: 50 mM Hepes, pH 8.0, 50 mM HgCl₂, 0.005 % Triton X-114, 600 µM D-Ala-D-Ala, 100 µM UMtri-L-Lys, 500 µM ATP, izoliran encim MurF_{Sp}, 100 µM testirane spojine v DMSO (končna koncentracija DMSO je 5 % v/v)

- 2) 15-minutna inkubacija pri 37 °C.
- 3) Dodatek reagenta Biomol®.
- 4) Merjenje abosorbance pri 650 nm.

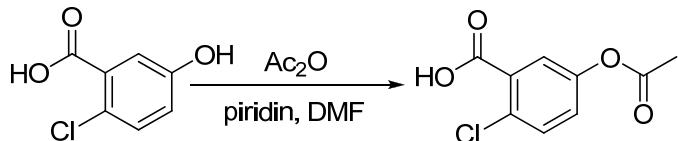
4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 REAKCIJSKE SHEME

4.1.1 Sinteza aminotiofena (kondenzacija cikloheksanona in sledeča reakcija z žveplom)



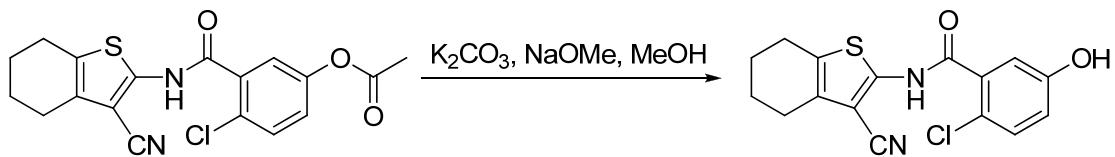
4.1.2 Zaščita hidroksilne skupine s pomočjo acetanhidrida (tvorba acetatnega estra)



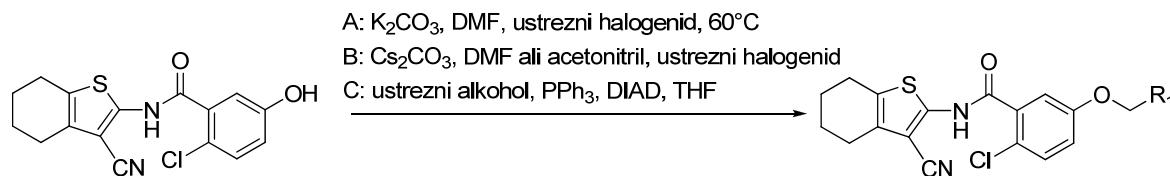
4.1.3 Tvorba amidne vezi preko aktivacije karboksilne skupine v kislinski klorid



4.1.4 Odščita hidroksilne skupine s K_2CO_3 in katalitično količino NaOMe

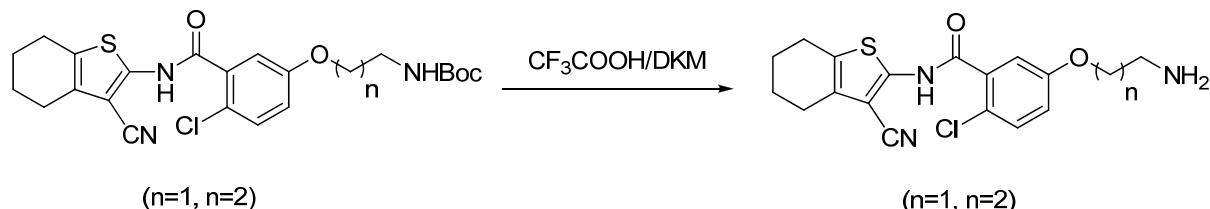


4.1.5 Alkiliranje hidroksilne skupine z različnimi benzilnimi in alkilnimi halogenidi

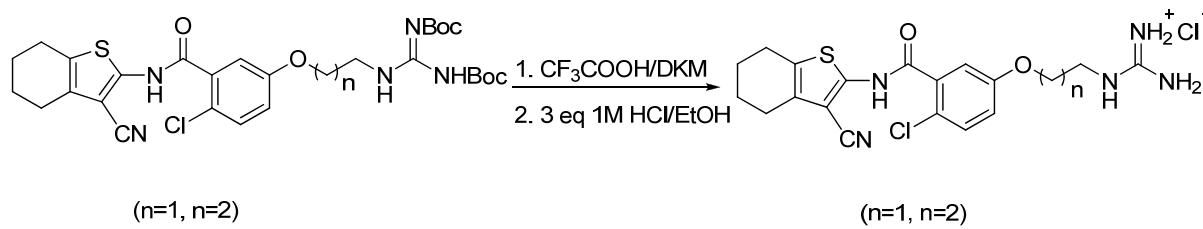


R_1	spojina
	5
	6
	7
	11

4.1.6 Odščita Boc zaščite z acidolizo

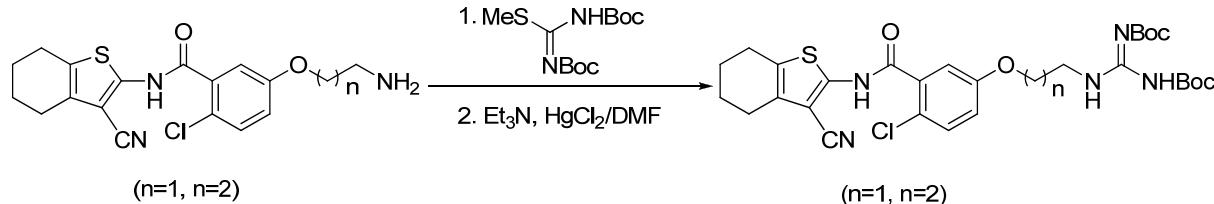


n	spojina
1	8
2	12



n	spojina
1	10
2	14

4.1.7 Sinteza različnih z Boc zaščitenih gvanidinskih derivatov (nukleofilna substitucija med *N,N'*-di(*tert*butoksikarbonil)-*S*-metilizotiosečnino in aminom)



n	spojina
1	<u>9</u>
2	<u>13</u>

4.2 MOLEKULSKO SIDRANJE

Pri validaciji postopka je bilo ugotovljeno, da znaša kvadratni koren povprečja razdalj (RMSD) 1.5 Å oziroma manj. To pomeni, da pridobljeni rezultati dobro napovedujejo kristalno strukturo liganda v kompleksu z encimom, saj se izračunana in eksperimentalno določena konformacija skoraj v celoti prekrivata.

Pri molekulskega sidranju načrtovanih inhibitorjev najboljše rezultate izkazujejo aminski (**8**, **12**) in gvanidinski derivati (**10**, **14**). Pričakovati je, da bodo prav omenjene spojine dosegale boljše rezultate, saj se te najbolje prilegajo aktivnemu mestu tarčnega encima.

Podrobnejša razprava podatkov, pridobljenih s pomočjo molekulskega sidranja, ki nam bo med drugim pomagala pojasniti tudi kasnejše rezultate bioloških testiranj, je opisana v poglavju 5.2.2.

4.3 PRAVILO PETIC – IZRAČUN PARAMETROV

Za vse načrtovane derive smo izračunali parametre (CLogP, molekulska masa, število donorjev in akceptorjev vodikove vezi), ki glede na pravilo petic napovedujejo biološko uporabnost spojin. Za primerjavo smo iste parametre izračunali tudi za spojino iz skupine psevdo-tetrapeptidnih aminoalkilfosfinskih kislin (35), za katero je znano, da ne dosega protibakterijskega učinka (tabela 1).

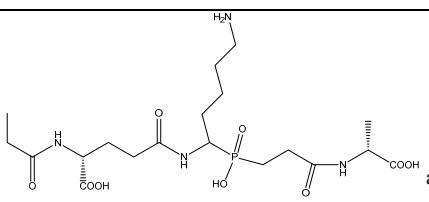
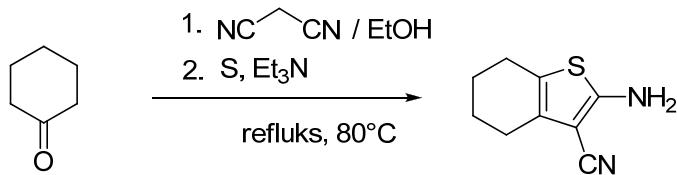
Spojina	CLogP ^b	Molekulska masa	Število donorjev vodikove vezi ^c	Število akceptorjev vodikove vezi ^d
5	5,071	422,927	1	3
6	4,504	447,937	1	4
8	2,504	375,872	3	3
12	2,904	389,899	3	3
10	1,883	417,912	5	3
14	2,232	431,939	5	3
	-4,867	494,482	8	6

Tabela 1: Izračun parameterov po Lipinskom^a Spojina iz skupine psevdo-tetrapeptidnih aminoalkilfosfinskih kislin (35)^b Izračunani LogP je pridobljen s pomočjo programa ChemBio3D Ultra 12.0^c Število O-H in N-H vezi^d Število O in N atomov

4.4 SINTEZNI POSTOPKI IN REZULTATI ANALIZ

4.4.1 Sinteza 2-amino-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-3-karbonitrila (**1**)



1

V raztopino cikloheksanona (10,4 ml, 0,1 mol) in malononitrila (6,606 g, 0,1 mol) v EtOH dodamo žveplo (3,527 g, 0,11 mol) in dietilamin (20,6 ml, 0,2 mol). Reakcijsko zmes pustimo mešati 3 ure pri temperaturi 80 °C oz. pod refluksom. Po poteku reakcije s pomočjo presesalne erlenmajerice odfiltriramo nastale kristale in jih speremo z EtOH.

Opis: svetlo rjavi kristali

η : 56 % (9,923 g)

R_f: EtOAc/heksan=1/1, 0,84

T_{tal.}: 136 – 141 °C

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.73-1.90 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 2.45-2.57 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 4.65 (s, 2H, NH₂-tiofen) ppm.

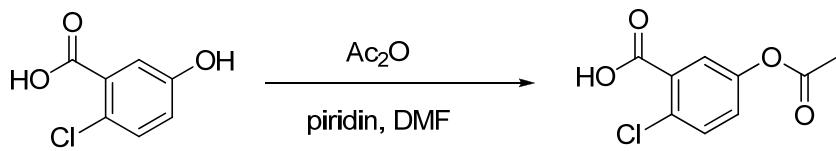
¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ 22.11, 23.36, 24.13, 24.52, 88.83, 115.41, 120.67, 132.36, 159.80 ppm.

IR v(max) = 3447, 3328, 3206, 2956, 2931, 2911, 2854, 2837, 2197, 1654, 1625, 1616, 1560, 1522, 1444, 1434, 1400, 1340, 1283, 1166, 1128, 1064, 1024, 972, 853, 832, 820 cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES+): 179,1 (MH⁺)

HRMS: izračunano (za C₉H₁₁N₂S) 179,0643; izmerjeno 179,0645 (1,1 ppm).

4.4.2 Sinteza 5-acetoksi-2-klorobenzojske kisline (2)



V raztopino 2-kloro-5-hidroksibenzojske kisline (15 mmol) v DMF (10 ml) dodamo piridin (2,4 ml, 30 mmol). Bučko zatesnimo s septumom ter preprihamo sistem z argonom. Z iglo previdno po kapljicah dodamo acetanhidrid (2,12 ml, 22,5 mmol) in mešamo 1 h pri sobni temperaturi. Po poteku reakcije zmes zlijemo v vodo (40 ml), nato vodno fazo nakisamo s 4M HCl do pH = 2 in ekstrahiramo z DKM (3×50 ml). Združene organske faze speremo z nasičeno raztopino NaCl (1×100 ml) in sušimo z Na₂SO₄. Odfiltriramo sušilno sredstvo in na rotavaporju odparimo topilo.

Opis: beli kristali

η : 95 % (3,046 g)

R_f: DKM/EtOH + 1% CH₃COOH=20/1, 0,84

T_{tal}: 115 – 120 °C

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 2.35 (s, 3H, CO-CH₃), 7.28 (dd, 1H, *J*₁ = 8.6, *J*₂ = 2.6 Hz, Ar-H), 7.52 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.79 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, Ar-H) ppm

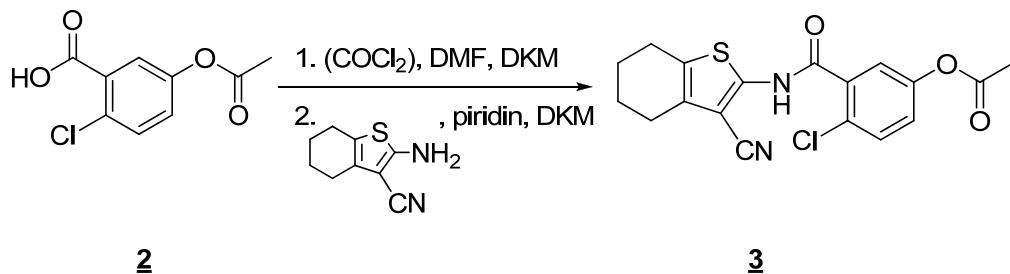
¹³C NMR (100MHz, CDCl₃): δ 21.01, 125.62, 127.06, 129.12, 131.81, 132.39, 148.85, 168.91, 169.20 ppm.

IR v(max) = 3070, 1762, 1709, 1602, 1576, 1474, 1412, 1374, 1308, 1262, 1217, 1112, 1049, 1014, 941, 907, 871, 833 cm⁻¹

MS m/z (TOF MS ES+): 237,0 (MNa⁺) (67 %), 215,0 (MH⁺) (100 %)

HRMS: izračunano (za C₉H₆O₄Cl) 212,9955; izmerjeno 212,9950 (2,3 ppm).

4.4.3 Sinteza 4-kloro-3-((3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)karbamoil)fenil acetata (3)



V bučko natehtamo spojino **2** (2,146 g, 10 mmol) in jo raztopimo v 15 ml diklorometana ter dodamo katalitično količino DMF (0,17 ml, 1,5 mmol). Zmes ohladimo na ledeni kopeli, bučko zatesnimo s septumom ter sistem prepihamo z argonom. Po kapljicah dodamo oksalil klorid (2,60 ml, 30 mmol) in mešamo 1 h pri sobni temperaturi. Odparimo topilo in preostali oksalil klorid ter preostanek raztopimo v CH_2Cl_2 (15 ml). Po kapljicah dodamo mešanico spojine **1** (1,604 g, 9 mmol) in piridina (1,2 ml, 15 mmol) v diklorometanu (15 ml) in pustimo mešati čez noč pri sobni temperaturi.

Reakcijsko zmes speremo z 1M HCl (3×30 ml), nasičeno vodno raztopino $NaHCO_3$ (3×30 ml) in nasičeno raztopino $NaCl$ (1×30 ml). Sušimo z Na_2SO_4 ter s pomočjo rotavaporja odparimo topilo. Surov produkt čistimo s pomočjo prekristalizacije iz etanola. Preostanek produkta iz matičnice čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=1/2.

Opis: bledo rumeni kristali

η : 60 % (2,243 g)

R_f : EtOAc/heksan=1/2, 0,36

T_{tal} : 169 – 176 °C

1H NMR (400MHz, $CDCl_3$): δ 1.81-1.93 (m, 4H, $CH_2-CH_2-CH_2-CH_2$), 2.35 (s, 3H, O- CH_3), 2.62-2.74 (m, 2H, $CH_2-CH_2-CH_2-CH_2$), 7.27 (dd, 1H, $J_1 = 8.7$, $J_2 = 2.8$ Hz, Ar-H), 7.53 (d, $J = 8.7$ Hz, 1H, Ar-H), 7.70 (d, $J = 2.8$ Hz, 1H, Ar-H), 9.82 (s, 1H, CO-NH) ppm.

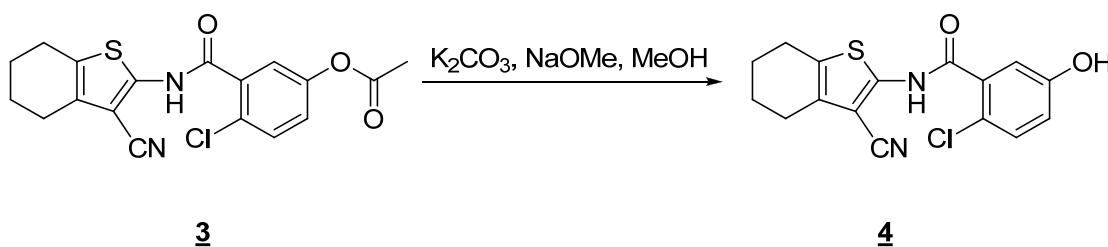
^{13}C NMR (100MHz, $CDCl_3$): δ 20.99, 22.10, 23.07, 24.00, 24.03, 94.81, 114.13, 125.07, 126.50, 127.78, 129.32, 131.38, 131.85, 132.15, 145.77, 149.69, 160.91, 168.77 ppm.

IR $\nu(\text{max})$ = 3504, 3248, 3193, 3081, 3000, 2953, 2228, 1762, 1683, 1575, 1560, 1464, 1438, 1409, 1371, 1348, 1329, 1292, 1269, 1238, 1206, 1150, 1116, 1051, 1014, 969, 951, 914, 876, 842, 820 cm^{-1} .

MS m/z (TOF MS ES+): 375,1 (MH^+)

HRMS: izračunano (za $\text{C}_{18}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{SCl}$) 375,0570; izmerjeno 375,0558 (3,2 ppm).

4.4.4 Sinteza 2-kloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-hidroksibenzamida (4)



V suspenzijo spojine **3** (2,378 g, 6,3 mmol) v metanolu (20 ml) dodamo K_2CO_3 (1,315 g, 9,5 mmol) in katalitično količino NaOMe (0,95 mmol). Reakcijsko zmes mešamo 1 h pri sobni temperaturi in odparimo topilo. Preostanek raztopimo v 1M HCl (50 ml) in ekstrahiramo z EtOAc (3×50 ml). Združene organske faze speremo z nasičeno NaCl in posušimo z Na_2SO_4 ter s pomočjo rotavaporja odparimo topilo.

Opis: svetlo rjav prašek

η : 100 % (2,102 g)

R_f : $\text{EtOAc/heksan}=1/2$, 0,28

$T_{\text{tal.}}$: 175 – 180 °C

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 1.82-1.94 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.61-2.74 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 6.80 (s, 1H, Ar-OH), 7.02 (dd, 1H, $J_1 = 8.8$, $J_2 = 3.0$ Hz, Ar-H), 7.35 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, Ar-H), 7.62 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, Ar-H), 9.86 (s, 1H, CO-NH) ppm.

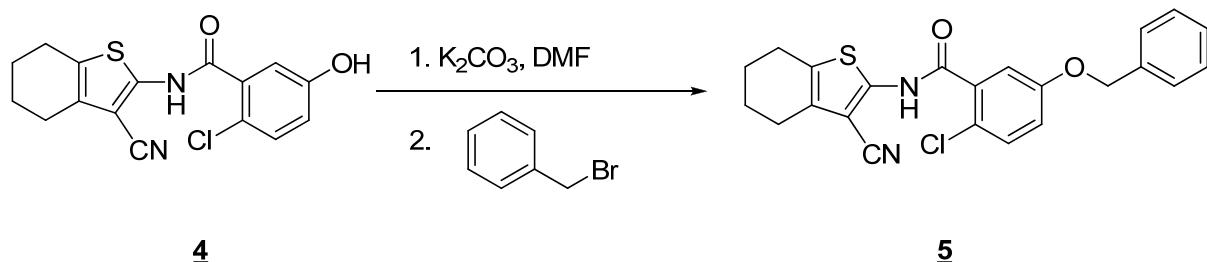
$^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3): δ 22.07, 23.06, 24.01, 24.07, 94.99, 114.12, 118.56, 121.00, 121.89, 129.50, 131.13, 131.50, 132.22, 145.75, 155.48, 161.95 ppm.

IR $\nu(\text{max})$ = 3430, 3321, 2936, 2840, 2209, 1647, 1602, 1573, 1557, 1484, 1466, 1423, 1310, 1259, 1217, 1118, 1036, 876, 822, 811 cm^{-1} .

MS m/z (TOF MS ES+): 333,0 (MH^+)

HRMS: izračunano (za $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_2\text{SCl}$) 333,0465; izmerjeno 333,0460 (1,5 ppm).

4.4.5 Sinteza 5-(benziloksi)-2-kloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)benzamida (5)



V raztopino spojine **4** (0,05 g, 0,15 mmol) v DMF (2 ml) dodamo K_2CO_3 (0,062 g, 0,45 mmol). Po 30 minutah mešanja dodamo benzilbromid (19 μl , 0,16 mmol) in mešamo čez noč pri sobni temperaturi. Topilo odparimo na rotavaporju in ostanek raztopimo v 20 ml EtOAc. Zmes prenesemo v lij ločnik, kjer organsko fazo spiramo z vodo (2×20 ml), nasičeno raztopino NaCl (1×20 ml) in posušimo z Na_2SO_4 . Topilo odparimo s pomočjo rotavaporja in surov produkt čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=1/4. Iz združenih frakcij, kjer je poleg produkta prisotna še ena nečistota s podobnim R_f , čez noč izpadejo beli igličasti kristali.

Opis: beli igličasti kristali

η : 6 % (0,004 g)

R_f : EtOAc/heksan=1/4, 0,44

T_{tal.} : 162 – 168 °C

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 1.83-1.93 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.66-2.72 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 5.14 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 7.12 (dd, $J_1 = 8.8$, $J_2 = 3.2$ Hz, 1H, Ar-H), 7.33-7.49 (m, 6H, C_6H_5 + Ar-H), 7.65 (dd, $J_1 = 3.2$, $J_2 = 1.5$ Hz, 1H, Ar-H), 9.68 (s, 1H, CO-NH) ppm.

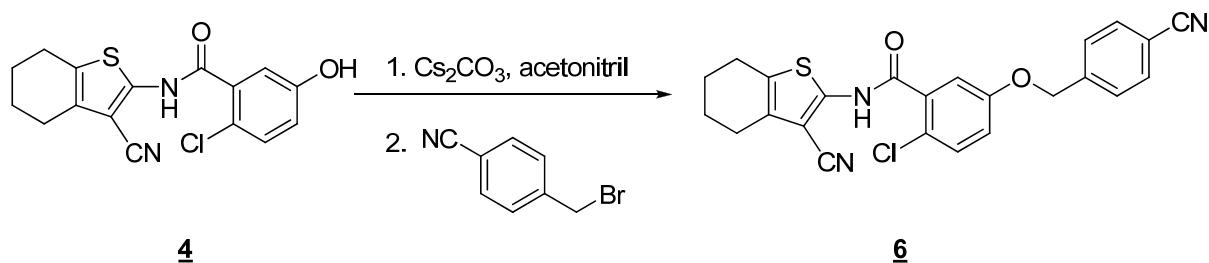
^{13}C NMR (100MHz, CDCl_3): δ 21.67, 22.61, 24.09, 24.48, 53.99, 70.44, 109.71, 113.12, 118.68, 121.87, 127.53, 128.16, 128.20, 128.65, 129.05, 130.49, 134.05, 135.54, 135.90, 136.19, 148.55, 156.98, 167.95 ppm.

IR $\nu(\text{max})$ = 3436, 3341, 2946, 2206, 1661, 1550, 1458, 1312, 1272, 1236, 1024, 879, 824 cm^{-1} .

MS m/z (TOF MS ES+): 423,1 (MH^+) (42 %), 212,1 (100 %)

HRMS: izračunano (za $\text{C}_{23}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_2\text{SCl}$) 423,0934; izmerjeno 423,0937 (0,7 ppm).

4.4.6 Sinteza 2-kloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)-5-((4-cianobenzil)oksi)benzamida (6)



V bučko natehtamo spojino **4** (0,300 g, 0,9 mmol) in Cs_2CO_3 (0,587 g, 1,8 mmol) ter ju suspendiramo v acetonitrilu (15 ml). Bučko zatesnimo s septumom in sistem prepihamo z argonom. Dodamo α -bromo-*p*-tolunitril (0,186 g, 0,95 mmol) in pustimo mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po poteku reakcije s pomočjo presesalne erlenmajerice odfiltriramo neraztopljeno sol in matičnici odparimo topilo. Surov produkt čistimo s pomočjo prekristalizacije iz etanola.

Opis: zlato-rumen prašek

η : 30 % (0,119 g)

R_f : EtOAc/heksan=1/2, 0,42

T_{tal} : 238 – 244 °C

^1H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 1.70-1.78 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.36-2.53 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 5.24 (s, 2H, $\text{CH}_2\text{-O}$), 6.92 (dd, $J_1 = 8.8, J_2 = 3.1$ Hz, 1 H, Ar-H), 7.20 (d, $J = 3.1$ Hz, 1 H, Ar-H), 7.25 (d, $J = 8.8, 1\text{H}$, Ar-H), 7.67 (AA', 2H, Ar-H), 7.87 (BB', 2H, Ar-H) ppm.

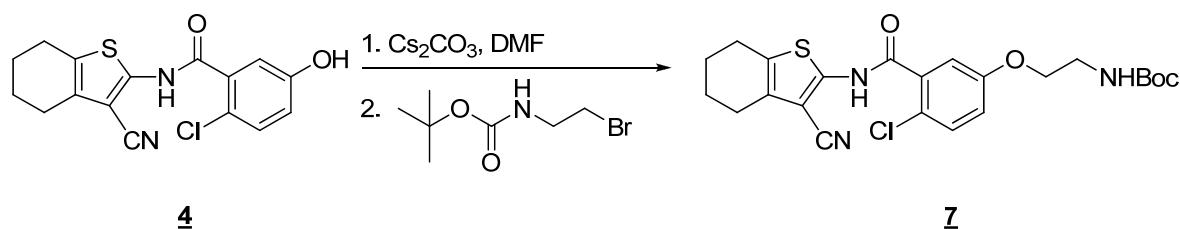
¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆): δ 22.49, 23.35, 23.80, 24.17, 68.41, 90.28, 110.40, 115.04, 115.71, 118.76, 118.94, 121.43, 122.51, 128.06, 128.23, 130.21, 132.40, 142.44, 142.81, 156.05, 168.13 ppm.

IR v(max) = 3431, 2929, 2845, 2228, 2197, 1592, 1533, 1470, 1392, 1360, 1304, 1257, 1228, 1153, 1130, 1106, 1049, 1026, 985, 889, 871, 817 cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES+): 448,1 (MH⁺) (45 %), 132,9 (100 %)

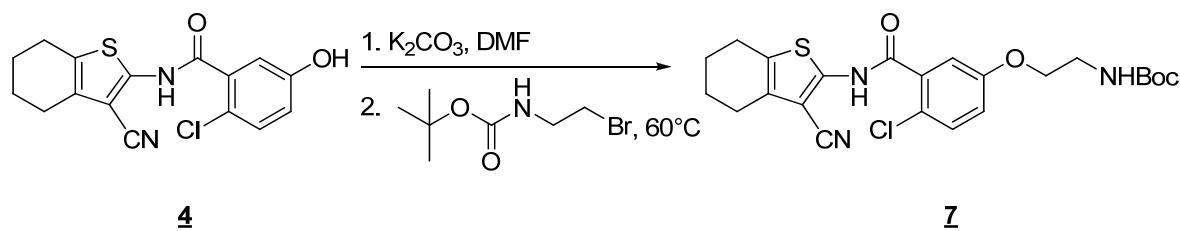
HRMS: izračunano (za C₂₄H₁₉N₃O₂SCl) 448,0887; izmerjeno 448,0877 (2,2 ppm).

4.4.7 Sinteza terc-butil 2-(4-kloro-3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamol)feniloksi)etilkarbamata (7)



Postopek A: V bučko natehtamo spojino **4** (0,600 g, 1,8 mmol) in jo raztopimo v 10 ml DMF. Dodamo Cs₂CO₃ (1,175 g, 3,606 mmol) in 2-(Boc-amino)ethylbromid (0,424 g, 1,893 mmol) ter pustimo mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po poteku reakcije s pomočjo presesalne erlenmajerice odfiltriramo neraztopljeno sol in matičnici odparimo topilo. Surov produkt čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=1/2.

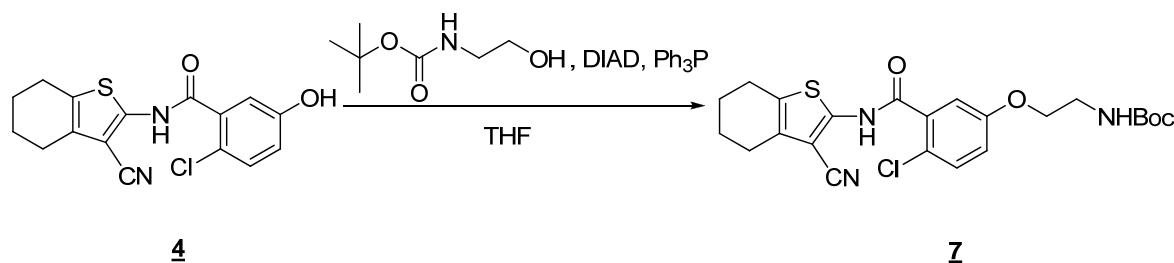
Čiščenje se izkaže za neuspešno, ker imata produkt in izhodna spojina enak R_f.



Postopek B: V bučko natehtamo spojino **4** (0,500 g, 1,5 mmol) in jo raztopimo v 10 ml DMF. Dodamo K₂CO₃ (0,623 g, 4,507 mmol) in 2-(Boc-amino)ethylbromid (0,370 g, 1,653 mmol) ter pustimo mešati čez noč pri temperaturi 60 °C. Po poteku reakcije s pomočjo

presesalne erlenmajerice odfiltriramo neraztopljeno sol in matičnici odparimo topilo. Surov produkt čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=1/2.

Tekom reakcije nastane precej več stranskih produktov, lisa domnevnega produkta na TLC pa je precej manj intenzivna kot v postopku A.

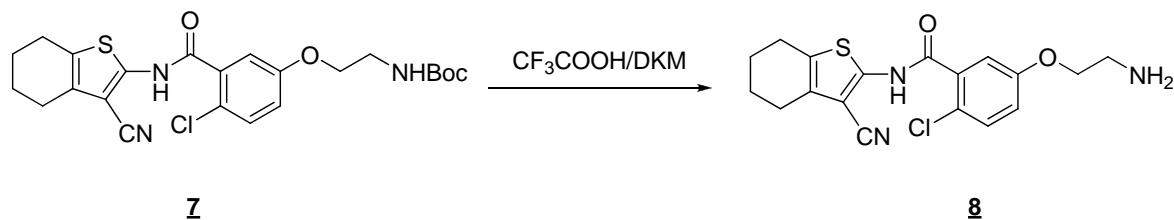


Postopek C: V raztopino spojine **4** (1 g, 3 mmol) v brezvodnem THF (15 ml) dodamo *N*-Boc-ethanolamin (0,558 ml, 3,6 mmol) in Ph₃P (1,180 g, 4,5 mmol) ter DIAD (0,89 ml, 4,5 mmol). Mešamo čez noč pri temperaturi 60 °C. Surov produkt čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=1/2.

Reakcija poteče na fenolni –OH skupini in amidnem dušiku.

Sintezo smo nadaljevali brez nadaljnega čiščenja in vmesne karakterizacije spojine **7**.

4.4.8 Sinteza 5-(2-aminoetoksi)-2-kloro-*N*-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)benzamida (8**)**



Surov produkt sinteznega postopka spojine **7** (0,894 g) raztopimo v 5 ml brezvodnega DKM. Sistem prepihamo z argonom in previdno po kapljicah dodamo 1 ml CF₃COOH. Reakcijsko zmes pustimo mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po poteku reakcije surov

produkt čistimo s pomočjo gradientne kolonske »flash« kromatografije v mobilni fazi DKM/metanol=20/1 + Et₃N → DKM/metanol=9/1 + Et₃N.

Opis: bledo rumeni kristali

η : 12 % (0,184 g)

R_f: DKM/metanol=9/1 + Et₃N = 0,35 2,36-2,53

T_{tal.}: 198 – 204 °C

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 1.70-1.80 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 2.40-2.48 (m, 2H, CH_{2(a)}-CH₂-CH₂-CH_{2(b)}), 2.49-2.53 (m, 2H, CH_{2(a)}-CH₂-CH₂-CH_{2(b)})^{*} prekrivanje z DMSO signalom, 3.14 (t, J=5.2 Hz, 2H, H₂N-CH₂-CH₂-O), 4.11 (t, J = 5.2 Hz, 2H, H₂N-CH₂-CH₂-O), 6.94 (dd, J₁ = 8.8, J₂ = 3.1 Hz, 1 H, Ar-H), 7.20 (d, J = 3.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.32 (d, J = 8.7, 1H, Ar-H) ppm.

¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆): δ 22.31, 23.18, 23.74, 24.00, 55.99, 66.27, 91.15, 115.34, 115.86, 116.60, 117.91, 122.46, 122.89, 128.86, 130.32, 140.95, 156.26, 167.26 ppm.

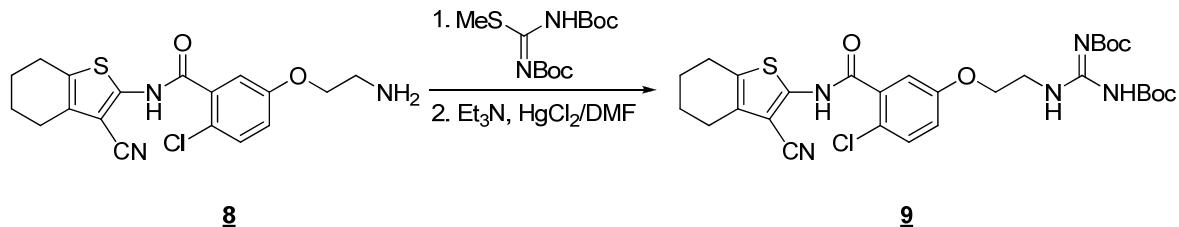
IR ν(max) = 3371, 2934, 2363, 2216, 1719, 1660, 1578, 1462, 1398, 1326, 1289, 1262, 1229, 1121, 1025, 976, 896, 826 cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES+): 376,1 (MH⁺)

HRMS: izračunano (za C₁₈H₁₉N₃O₂SCl) 376,0887; izmerjeno 376,0875 (3,2 ppm).

HPLC: t_r = 11.650 min (94.7 % at 220 nm, 95.0 % at 254 nm)

4.4.9 Sinteza terc-butil (terc-butoksikarbonilamino)(2-(4-kloro-3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)etilamino)metilenkarbamata (**9**)



V bučko natehtamo spojino **8** (0,100 g, 0,266 mmol) in jo raztopimo v 5 ml DMF. Dodamo N,N'-di-(terc-butoksikarbonil)-S-metilizotiosečnino (0,077 g, 0,266 mmol), Et₃N (0,111

ml, 0,798 mmol) in HgCl_2 (0,072 g, 0,266 ml) v navedenem zaporedju. Reakcijsko zmes pustimo mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po poteku reakcije najprej s pomočjo presesalne erlenmajerice odfiltriramo nastalo neraztopljeni sol $\text{Hg}(\text{SMe})\text{Cl}$. Filtratu odparimo topilo na rotavaporju, zaostanek pa raztopimo v 30 ml EtOAc . Prenesemo v lij ločnik, kjer organsko fazo spiramo 3×10 ml destilirane vode, 1×10 ml nasičene raztopine NaHCO_3 in 1×10 ml nasičene raztopine NaCl . Organsko fazo sušimo z Na_2SO_4 , odfiltriramo sušilno sredstvo in na rotavaporju odparimo topilo. Produkt čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo $\text{EtOAc}/\text{heksan}=1/3$.

Opis: bel prašek

η : 96 % (0,157 g)

R_f : $\text{EtOAc}/\text{heksan}=1/3$, 0,30

$T_{\text{tal.}}$: / °C

$^1\text{H NMR}$ (400MHz, CDCl_3): δ 1.52 (s, 9H, Boc), 1.54 (s, 9H, Boc), 1.80-1.94 (m, 4H, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2$), 2.61-2.68 (m, 2H, $\text{CH}_{2(a)}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_{2(b)}$), 2.68-2.74 (m, 2H, $\text{CH}_{2(a)}\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_{2(b)}$), 3.89 (q, $J=5.2$ Hz, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 4.17 (t, $J=5.2$ Hz, 2H, O- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-NH}$), 7.13 (dd, $J_1 = 8.8$, $J_2 = 3.1$ Hz, 1 H, Ar-H), 7.42 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, Ar-H), 7.56 (d, $J = 3.1$ Hz, 1H, Ar-H), 8.82 (s, 1H, NH- $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 9.72 (s, 1H, NH-CO), 11.48 (s, 1H, NH-Boc) ppm.

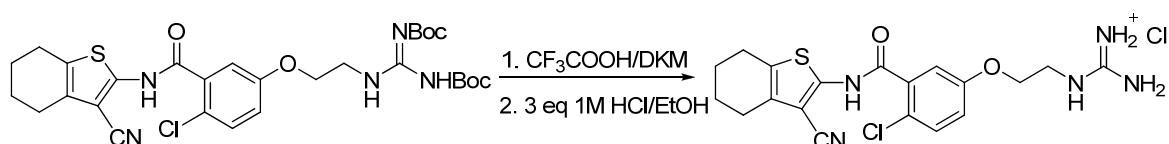
$^{13}\text{C NMR}$ (100MHz, CDCl_3): /

IR $\nu(\text{max})$ = /

MS m/z (TOF MS ES+): /

HRMS: /

4.4.10 Sinteza amino(2(4-kloro-3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)karbamoil)fenoksi)etilamino)metaminijevega klorida (**10**)



9

10

V bučko natehtamo spojino **9** (0,150 g, 0,243 mmol) in jo raztopimo v 2 ml brezvodnega DKM. Bučko zatesnimo s septumom ter sistem prepihamo z argonom. Z iglo previdno po kaljicah dodamo 0,5 ml CF₃COOH. Reakcijsko zmes pustimo mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji na rotavaporju odparimo topilo, nato spojino pretvorimo še v hidroklorid. Zaostanek raztopimo v 10 ml EtOH in dodamo 3 ekv. 1M HCl/EtOH, ki smo jo predhodno pripravili *in situ*. Ponovno odparimo topilo.

Opis: živo-rumeni kristali

η : 93 % (0,103 g)

R_f: DKM/MeOH= 20/1 + 1 % Et₃N = 0,35

T_{tal.}: 99 – 105 °C

¹H NMR (400MHz, MeOD): δ 1.80-1.96 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 2.58-2.75 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 3.63-3.69 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 4.20 (t, J=5.0Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-NH), 7.15 (dd, J₁ = 8.9, J₂ = 3.0 Hz, 1 H, Ar-H), 7.23 (d, J = 3.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.48 (d, J = 8.9 Hz, 1H, Ar-H) ppm.

¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆): δ 21.67, 22.56, 23.38, 23.53, 66.7, 94.49, 113.95, 115.26, 118.07, 121.80, 128.21, 130.26, 131.29, 135.41, 145.56, 156.60, 156.98, 163.98 ppm. *1 C skrit pod signalom topila.

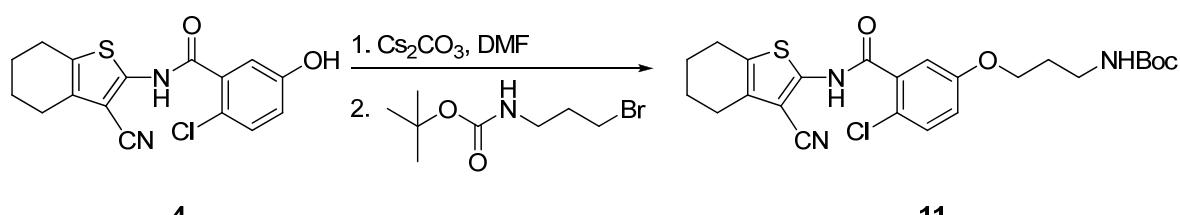
IR ν(max) = 3403, 2934, 2214, 1654, 1550, 1458, 1290, 1218, 1065, 819 cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES+): 418,1 (MH⁺)

HRMS: izračunano (za C₁₉H₂₁N₅O₂SCl) 418,1104; izmerjeno 418,1108 (1,0 ppm).

HPLC: t_r = 12.342 min (95.3 % at 220 nm, 97.7 % at 254 nm)

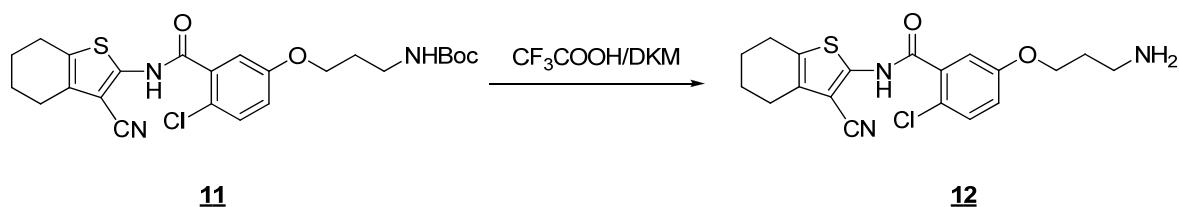
4.4.11 Sinteza terc-butil 3-(4-kloro-3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)propilkarbamata (**11**)



V bučko natehtamo spojino **4** (1 g, 3 mmol) in jo raztopimo v 15 ml DMF. Dodamo Cs_2CO_3 (1,958 g, 6 mmol) in 2-(Boc-amino)propilbromid (0,859 g, 3,610 mmol) ter pustimo mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po poteku reakcije s pomočjo presesalne erlenmajerice odfiltriramo neraztopljeni sol in matičnici odparimo topilo.

Sintezo smo nadaljevali brez nadaljnega čiščenja in vmesne karakterizacije spojine **11**.

4.4.12 Sinteza 5-(3-aminopropoksi)-2-kloro-N-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-il)benazmida (**12**)



Surov produkt sinteznega postopka spojine **11** (0,767 g) raztopimo v 5 ml brezvodnega DKM. Sistem prepihamo z argonom in previdno po kapljicah dodamo 1 ml CF_3COOH . Reakcijsko zmes pustimo mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po poteku reakcije surov produkt čistimo s pomočjo gradientne kolonske »flash« kromatografije v mobilni fazi DKM/metanol=20/1 + $\text{Et}_3\text{N} \rightarrow$ DKM/metanol=9/1 + Et_3N .

Opis: živo-rumeni kristali

η : 16 % (0,182 g)

R_f: DKM/metanol=9/1 + Et_3N , 0,31

T_{tal.}: 87 – 96 °C

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.59-2.44 (bs, 2H, -NH₂), 1.83-1.90 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 1.94 (q, *J*=6.7 Hz, 2H, H₂N-CH₂-CH₂-CH₂-O), 2.62-2.73 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 2.85 (t, *J*=6.7 Hz, 2H, H₂N-CH₂-CH₂-CH₂-O), 4.08 (t, *J*=6.1Hz, 2H, H₂N-CH₂-CH₂-CH₂-O), 7.02 (dd, *J*₁ = 8.8, *J*₂ = 3.1 Hz, 1 H, Ar-H), 7.39 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.46 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, Ar-H) ppm.

¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆): δ 22.40, 23.26, 23.77, 24.09, 27.30, 36.54, 64.95, 90.65, 114.98, 115.46, 118.45, 122.12, 128.50, 130.14, 134.34, 141.74, 156.43, 167.81, 173.26 ppm.

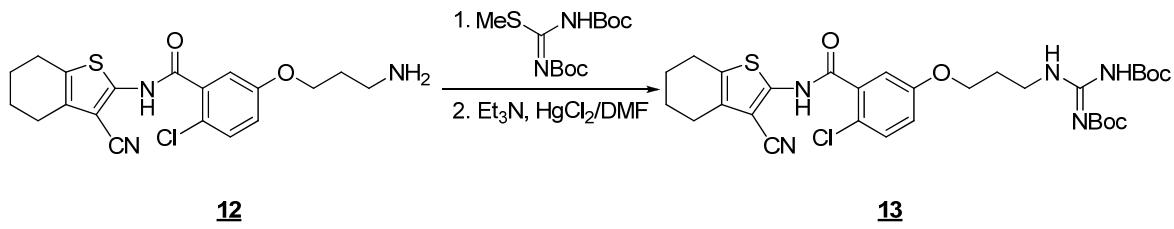
IR $\nu(\text{max})$ = 3436, 2930, 2196, 1508, 1466, 1370, 1289, 1223, 1025, 815 cm^{-1} .

MS m/z (TOF MS ES+): 390,1 (MH^+)

HRMS: izračunano (za C₁₉H₂₁N₃O₂SCl) 390,1043; izmerjeno 390,1047 (1,0 ppm).

HPLC: $t_r = 12.038$ min (93.9 % at 220 nm, 93.5 % at 254 nm)

4.4.13 Sinteza terc-butil (terc-butoskikarbonilamino)(3-(4-kloro-3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)propilamino)metilenkarbamata (13)



V bučko natehtamo spojino **12** (0,100g, 0,256 mmol) in jo raztopimo v 5 ml DMF. Dodamo *N,N'*-di-(*terc*-butoksikarbonil)-S-metilizotiosečnino (0,075g, 0,256 mmol), Et₃N (0,107 ml, 0,769 mmol) in HgCl₂ (0,070 g, 0,256 ml) v navedenem zaporedju. Reakcijsko zmes pustimo mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po poteku reakcije s pomočjo presesalne erlenmajerice odfiltriramo nastalo neraztopljeno sol Hg(SMe)Cl. Filtratu odparimo topilo na rotavaporju, zaostanek pa raztopimo v 30 ml EtOAc. Prenesemo v lij ločnik, kjer organsko fazo spiramo 3 × 10 ml destilirane vode, 1 × 10 ml nasičene raztopine NaHCO₃ in 1 × 10 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo sušimo z Na₂SO₄, odfiltriramo sušilno sredstvo in na rotavaporju odparimo topilo. Produkt čistimo s kolonsko »flash« kromatografijo z mobilno fazo EtOAc/heksan=1/3.

Opis: bel prašek

η : 71 % (0,115 g)

R_f: EtOAc/heksan=1/3 = 0,16

T_{tal.}: / °C

¹H NMR (400MHz, CDCl₃): δ 1.52 (s, 18H, 2×Boc), 1.81-1.94 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 2.82 (q, *J*=6.3 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-CH₂-NH), 2.61-2.75 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 3.68 (q, *J*=6.4 Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-CH₂-NH), 4.11-4.16 (m, 2H, O-CH₂-CH₂-CH₂-NH), 7.14 (dd, *J*₁ = 8.9, *J*₂ = 3.1 Hz, 1 H, Ar-H), 7.40 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.59

(d, $J = 3.1$ Hz, 1H, Ar-H), 8.58-8.77 (m, 1H, NH-CH₂-CH₂-CH₂-O), 9.70 (s, 1H, NH-CO), 11.53 (s, 1H, NH-Boc) ppm.

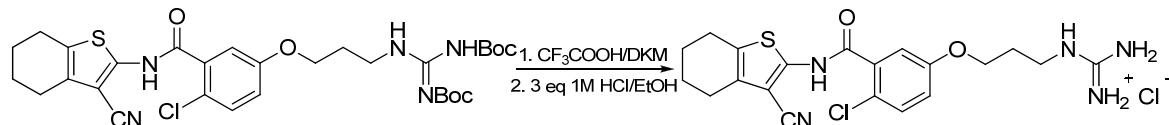
¹³C NMR (100MHz, DMSO-d₆): δ 21.69, 22.58, 23.38, 23.53, 27.55, 27.94, 31.28, 53.60, 55.88, 67.20, 78.08, 82.85, 94.31, 113.19, 115.47, 117.31, 121.32, 128.07, 130.42, 131.19, 133.93, 135.38, 152.00, 155.13, 156.95, 163.02 ppm.

IR v(max) = / cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES+): 632,2 (MH⁺) (10 %), 165,1 (100 %)

HRMS: izračunano (za C₃₀H₃₉N₅O₆SCl) 632,2310; izmerjeno 632,2307 (0,5 ppm).

4.4.14 Sinteza amino(3-(4-kloro-3-(3-ciano-4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofen-2-ilkarbamoil)fenoksi)propilamino)metaniminijevega klorida (**14**)

**13****14**

V bučko natehtamo spojino **13** (0,100 g, 0,158 mmol) in jo raztopimo v 2 ml brezvodnega DKM. Bučko zatesnimo s septumom ter sistem prepihamo z argonom. Z iglo previdno po kapljicah dodamo 0,5 ml CF₃COOH. Reakcijsko zmes pustimo mešati čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji na rotavaporju odparimo topilo, nato spojino pretvorimo še v hidroklorid. Zaostanek raztopimo v 10 ml EtOH in dodamo 3 ekv. 1M HCl/EtOH, ki smo jo predhodno pripravili *in situ*. Ponovno odparimo topilo.

Opis: rumena oborina

η : 99 % (0,073 g)

R_f: DKM/MeOH= 20/1 + Et₃N = 0,27

T_{tal}: 93 – 97 °C

¹H NMR (400MHz, DMSO-d₆): δ 1.72-1.83 (m, 4H, CH₂-CH₂-CH₂-CH₂), 1.94 (p, $J=6.4$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-CH₂-NH), 2.52-2.55 (m, 2H, CH_{2(a)}-CH₂-CH₂-CH_{2(b)})* prekrivanje z DMSO signalom, 2.59-2.67 (m, 2H, CH_{2(a)}-CH₂-CH₂-CH_{2(b)}), 3.28 (q, $J=6.5$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-CH₂-NH), 4.08 (t, $J=6.1$ Hz, 2H, O-CH₂-CH₂-CH₂-NH), 7.13 (dd,

$J_1 = 8.8$, $J_2 = 3.0$ Hz, 1 H, Ar-H), 7.19 (d, $J = 3.0$ Hz, 1H, Ar-H), 7.49 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, Ar-H), 7.74 (t, $J=5.7$ Hz, 1H, NH-Boc), 12.30 (s, 1H, NH-CO) ppm.

^{13}C NMR (100MHz, DMSO-d₆): δ 21.67, 22.56, 23.38, 23.53, 28.00, 37.73, 65.49, 94.48, 113.95, 115.18, 117.87, 121.41, 128.18, 130.52, 131.28, 135.38, 145.56, 156.82, 156.92, 164.07 ppm.

IR v(max) = 3402, 2936, 2363, 2215, 1654, 1550, 1459, 1290, 1169, 817 cm⁻¹.

MS m/z (TOF MS ES+): 432,1 (MH⁺)

HRMS: izračunano (za C₂₀H₂₃N₅O₂SCl) 432,1261; izmerjeno 432,1253 (1,9 ppm).

HPLC: t_r = 12.821 min (95.2 % at 220 nm, 96.8 % at 254 nm)

5 RAZPRAVA

5.1 PRAVILO PETIC

Vsi izračunani parametri načrtovanih inhibitorjev so glede na pravilo petic ustrezni, hkrati pa je potrebno poudariti še dejstvo, da so v nekaterih spojinah prisotne skupine, ki pri fiziološkem pH omogočajo ionizacijo, kar pozitivno vpliva na vodotopnost in obseg absorpcije ter s tem na biološko uporabnost. Spojina iz skupine psevdo-tetrapeptidnih aminoalkilfosfinskih kislin, ki smo jo uporabili za primerjavo, vsebuje veliko polarnega balasta in ima glede na pravilo petic preveliko število donorjev vodikove vezi ter izrazito prenizek ClogP, kar negativno vpliva na farmakokinetiko. To je najverjetnejše glavni razlog odsotnosti protibakterijske aktivnosti, saj omenjene lastnosti ne omogočajo prehoda skozi citoplazemske membrano.

5.2 SINTEZNI POSTOPKI

Celotno sintezno pot lahko razdelimo na dva dela. Prvi del je obsegal sintezo arilnih derivatov, kjer smo v obsegu 5 stopenj uspešno sintetizirali 2 končni spojini (**5**, **6**). Drugi del pa je potekal v skupno 8 stopnjah (petim začetnim stopnjam smo dodali še tri), kjer smo uspešno sintetizirali 4 spojine. Dva od teh sta primarna amina (**8**, **12**), dva pa gvanidina (**10**, **14**).

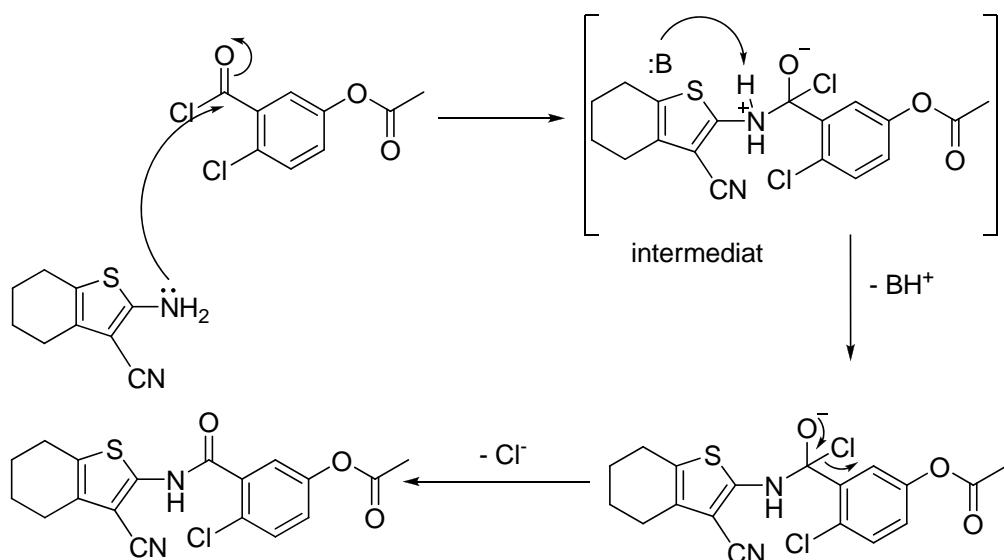
V prvi stopnji smo sintetizirali aminotiofensi derivat, ki smo ga kasneje potrebovali pri pripravi izhodne spojine **4**. Gre za kondenzacijo cikloheksanona z malononitrilom in žveplom v prisotnosti amina. V prvem koraku pride do kondenzacije med cikloheksanonom in malononitrilom, kjer nastane stabilni vmesni produkt. Po sledeči adiciji žvepla na alfa mesto ketona pride do ciklizacije, ki ji nato sledi še z bazo katalizirana tautomerizacija, pri čemer nastane želeni aminotiofen.

Pri pripravi drugega dela izhodne molekule smo izhajali iz 5-acetoksi-2-klorobenzojske kisline. Ker je naslednja stopnja vključevala aktivacijo karboksilne skupine s pomočjo oksalil klorida, smo morali predhodno zaščititi hidroksilno skupino omenjene spojine, s čimer smo se izognili možnosti, da bi v naslednjem koraku reagiralo več funkcionalnih skupin. Zaščitili smo jo s tvorbo estra, in sicer s pomočjo acetanhidrida, tako da je nastala acetatna zaščitna skupina. Zaščito bi sicer lahko uvedli tudi s pomočjo drugih reagentov, s

čimer bi lahko tvorili tudi različne etre (npr. *t*-butilni, benzilni). Za tovrstno izbiro smo se odločili, ker so estri zaradi njihovih selektivnih in milih pogojev odstranjevanja splošno zelo uporabne zaščitne skupine, pomembno vlogo pri izbiri pa igrajo tudi lahka dostopnost reagenta kot tudi hitra, selektivna in enostavna uvedba zaščite (43).

V naslednji stopnji poteče tvorba amidne vezi med prej sintetiziranim aminotiofenom in zaščiteno kislino (**2**) po mehanizmu nukleofilne substitucije na derivate karboksilnih spojin. V našem primeru je amin (**1**) kot nukleofil napadel karbonilni C-atom kislinskega klorida spojine **2**, pri čemer se je preko nestabilnega tetraedričnega intermediata tvorila amidna vez, kar je vodilo do nastanka spojine **3** (slika 15). Karboksilne kisline (RCOOH) pod običajnimi pogoji ne reagirajo kot elektrofilni, saj je hidroksilna skupina slabo izstopajoča skupina. Zato njihovo elektrofilnost dodatno povečamo s pripenjanjem elektron privlačnih in tako bolje izstopajočih skupin (43). To smo v našem primeru predhodno storili s pomočjo oksalil klorida ob prisotnosti katalitične količine DMF. Pri tem smo karboksilno kislino pretvorili v reaktivnejši kislinski klorid, s čimer smo karbonilno skupino napravili bolj polarizirano in tako olajšali nukleofilni napad amina.

Med sintezo se kot stranski produkt tvori HCl, zaradi česar smo v reakcijsko zmes dodali tudi bazo (piridin), s čimer smo poskrbeli za nevtralizacijo nastale kisline. Produkt smo dokaj uspešno izolirali s pomočjo prekristalizacije iz etanola, kar je dalo 52 % izkoristek. Ker je kasnejša TLC analiza pokazala, da se precej produkta še vedno nahaja v matičnici, smo se odločili še za kolonsko kromatografijo, s pomočjo katere smo naš izkoristek izboljšali še za 8 %.

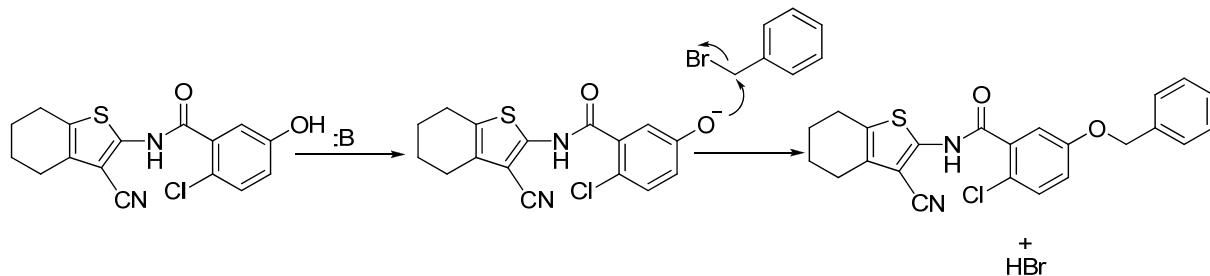


Slika 15: Mehanizem nukleofilne substitucije z vmesnim nestabilnim tetraedričnim intermediatom

Po uspešni sintezi amidne vezi smo odščitili prej zaestreno hidroksilno skupino z dodatkom kalijevega karbonata in katalitične količine NaOMe. Reakcija je potekla hitro in enostavno (v eni uri pri sobni temperaturi) in tudi kasnejša izolacija ni predstavljala težav, saj smo do čiste spojine prišli s pomočjo dodatka 1M HCl in ekstrakcije v etilacetat. Sintetizirana spojina **4** je predstavljala osnovni skelet, kamor smo nato pripenjali različne substituente.

Različne substituente smo na –OH skupino spojine **4** zaradi težav pri izolaciji in relativno majhnih izkoristkov poskusili pripenjati ob uporabi različnih reagentov.

V prvem delu smo sintetizirali različne arilne derivate, kjer je največ problemov predstavljala sinteza benzilnega derivata (**5**). Z bazo (K_2CO_3/DMF) smo najprej odcepili proton na fenolni –OH skupini spojine **4**, s čimer smo tvorili nukleofil in omogočili njegov napad na primarni C-atom benzilbromida, ki je zaradi negativnega induktivnega efekta broma dober elektrofil. Pri tem se je med njima tvorila vez, bromidni ioni pa so kot dobra izstopajoča skupina izstopili (slika 16). Tekom reakcije je bilo pomembno zagotavljanje brezvodnih pogojev. To smo omogočili z uporabo popolnoma suhe bučke, ki smo jo zatesnili s septumom, reakcijo pa samo izvajali v argonovi atmosferi. V prisotnosti vlage oziroma vode bi dosegali precej manjše izkoristke ali pa reakcija sploh ne bi potekla, saj bi izhodna spojina ostajala protonirana in kot takšna ne bi predstavljala dovolj močnega nukleofila.



Slika 16: Mehanizem nukleofilne substitucije v peti stopnji sinteze

Glede na rezultate, ki smo jih pridobili s pomočjo TLC, je omenjena reakcija potekla v celoti, saj ni bilo več sledi o izhodni spojini. Problem je predstavljala izolacija. Po spiranju organske faze (etilacetata) z vodo in kasnejšim sušenjem je bilo iz TLC razvidno, da se v zmesi poleg produkta še vedno nahaja ena nečistota. Lisi obeh spojin sta bili ob uporabi

različnih mobilnih faz strnjeni ena pod drugo, zato se je kolonska kromatografija izkazala za neuspešno. Kljub temu smo frakcije, kjer sta bili omenjeni spojini prisotni, združili. Čez noč so iz omenjene zmesi izpadli beli igličasti kristali. Iz NMR spektrov ter rezultatov masne spektrometrije smo ugotovili, da gre za želeno spojino (**5**). Izkoristek omenjene reakcije je zaradi otežene izolacije precej nizek (6 %) in bi ga v primeru uporabnosti spojine bilo potrebno optimizirati. Reakcijo smo ponovili še enkrat, kjer smo produkt poskusili izolirati s pomočjo prekristalizacije iz EtOH. Žal se je izkazala za neuspešno, saj je TLC oborine zopet pokazal dve lisi, tesno zbiti ena pod drugo.

Na enak način smo sintetizirali tudi spojino **6**, kjer smo kot bazo uporabili Cs_2CO_3 /acetonitril. Sinteza spojine **6** kot tudi njena izolacija je potekla brez težav, kar je najverjetneje posledica vpliva dodatne –CN skupine v molekuli, ki ji omogoča lažjo kristalizacijo. Po poteku reakcije smo namreč odfiltrirali neraztopljeno sol, produkt pa izolirali s pomočjo prekristalizacije iz EtOH, s čimer smo glede na prejšnjo reakcijo dosegli precej višji izkoristek (30 %) kot pri spojini **5**.

V drugem delu sinteze smo se usmerili v sintezo aminskih in gvanidinskih derivatov, kjer smo zopet izhajali iz spojine **4**. Največji problem je tudi tokrat predstavljala stopnja, kjer smo na fenolno –OH pripenjali z Boc zaščitene aminske substituente. Pri tem smo uporabili 3 različne postopke, s čimer smo žeeli doseči, da reakcija poteče karseda v največji meri, saj se je izkazalo, da imata izhodna spojina in želeni produkt enaka retencijska faktorja, kar je močno otežilo izolacijo.

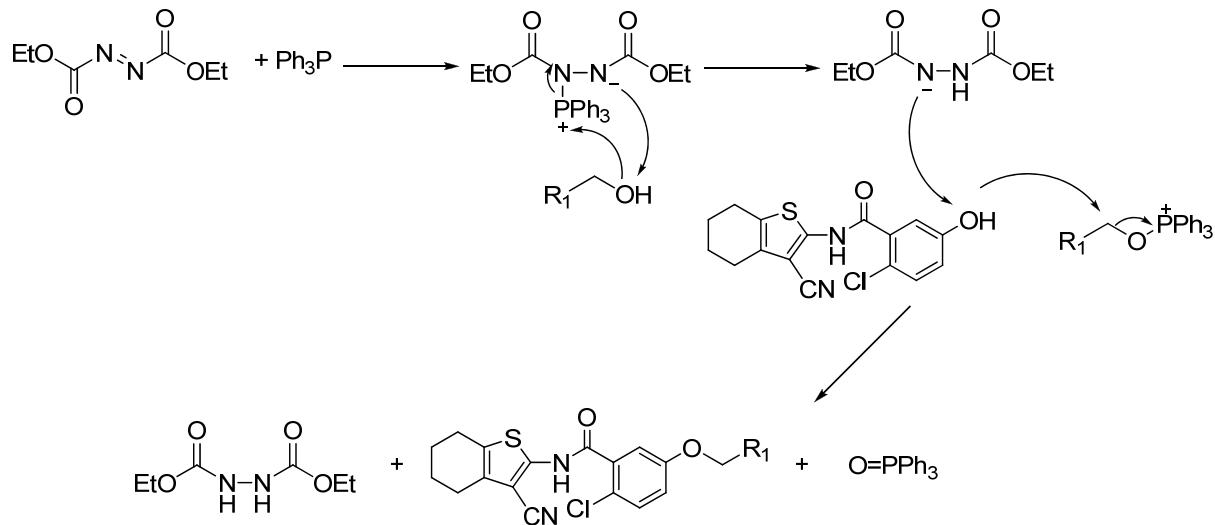
Najprej smo kot bazo uporabili Cs_2CO_3 /acetonitril ter pri sobni temperaturi pustili reakcijo teči čez noč v argonovi atmosferi. TLC je po orositvi z ninhidrinom pokazal, da je reakcija potekla – v kolikšni meri smo zaradi enakih R_f izhodne spojine in produkta težko sklepali. Sledilo je več poskusov izolacije, žal so se vsi izkazali za neuspešne:

- 1) Dodatek vode reakcijski zmesi, s čimer smo žeeli doseči izobarjanje našega produkta, ki bi ga nato odnučali. Nastala je lepljiva zmes, ki je ni bilo mogoče nučati.
- 2) Prekristalizacija iz EtOH. Po ohlajanju vroče nasičene raztopine ni prišlo do izpadanja kristalov.
- 3) Kolonska kromatografija – v obeh poskusih z različnima mobilnima fazama ($\text{EA}/\text{H}=1/1$ in $\text{EA}/\text{H}=1/2$) nam spojin ni uspelo ločiti.

- 4) Ločitev spojin s pomočjo kromatografskega sistema *Isolere One Biotope*. Tudi tu se spojini, podobno kot pri uporabi klasične kolonske kromatografije, žal nista ločili.
- 5) Preostanek smo raztopili v etilacetatu, ki smo ga nato spirali z vodno fazo, to pa smo predhodno naalkalili z 1M NaOH do pH=12. S tem smo žeeli izhodni fenol pretvoriti v sol in ga s pomočjo alkalne vodne faze sprati iz organske faze ter ga tako ločiti od želenega produkta. TLC je pokazal, da sta obe spojini ostali v organski fazi.

Po neuspeli izolaciji smo se lotili drugega postopka, kjer smo kot bazo uporabili K_2CO_3/DMF , reakcijo pa smo čez noč pustili teči pri povišani temperaturi ($60\text{ }^{\circ}\text{C}$). Ob primerjavi s prejšnjim postopkom se je ta izkazal za slabšega. Po TLC-ju sodeč, je v tem primeru nastalo precej več stranskih produktov, pa tudi lisa domnevnega želenega produkta je bila precej manj izrazita, zato smo to zamisel opustili.

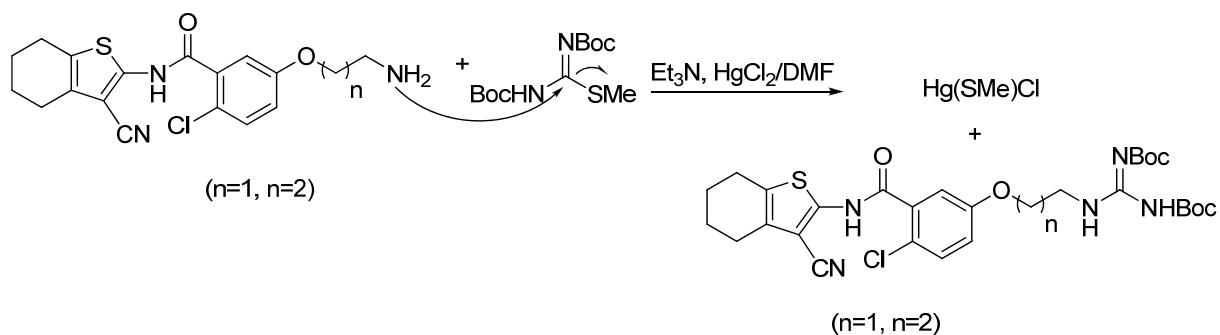
Poskusili smo še z uporabo Mitsunobu reakcije, ki naj bi veljala za bolj selektivno. Tokrat smo namesto ustreznega bromida uporabili alkoholni derivat. Glede na pričakovani mehanizem (slika 17) se je metoda v našem primeru žal izkazala za neuporabno, saj so NMR analize pokazale, da tokrat reakcija ni potekla le na fenolni $-OH$ skupini, kot smo žeeli, temveč tudi na amidnem dušiku.



Slika 17: Pričakovani mehanizem Mitsunobu reakcije (povzeto po 44)

Zaradi neuspešne izolacije z Boc zaščitenega amina smo sintezo nadaljevali brez vmesne karakterizacije spojine in pri naslednji stopnji uporabili kar surov produkt, pridobljen s prej opisanim postopkom, kjer smo kot bazo uporabili Cs_2CO_3 /acetonitril. Sledila je namreč acidoliza, s katero smo odstranili Boc zaščitno skupino in tako želeno spojino pretvorili v primarni amin. Pri tem smo uporabili CF_3COOH , lahko pa bi uporabili tudi plinsko HCl v AcOH . Odščita je potekla brez težav, nastale amine (**8** in **12**) pa smo uspešno izolirali s pomočjo gradientne kolonske kromatografije ($\text{DKM}/\text{MeOH} = 20/1 \rightarrow 9/1$), kjer smo mobilni fazi dodali še trietilamin, saj bi v nasprotnem primeru lahko tvegali izgubo amina, ko bi ta ostal vezan v stolpcu silikagela. Ko smo združenim frakcijam odparili topilo, so NMR analize pokazale, da je v preostanku poleg produkta prisotnega še precej Et_3N . Tega smo se poskusili znebiti s pomočjo prekrstalizacije iz EtOH , vendar je iz matičnice izpadlo zelo malo produkta. Zmes smo zato naalkalili z 1M NaOH do $\text{pH}=10$ in nato dodali vodo, s čimer smo dosegli, da se je začel naš produkt izobarjati, saj smo ga s pomočjo pH pretvorili v prosto bazo, ki je v vodi slabo topna.

V predzadnji stopnji sinteze je zopet potekala nukleofilna substitucija, s pomočjo katere smo dobili zaščitene gvanidinske derivate (**9**, **13**). Prej odščitena amino skupina je predstavljala s svojim prostim elektronskim parom dober nukleofil, kar ji je omogočilo napad na sečninski karbonilni ogljikov atom z Boc zaščitene S-metiltioizosečnine. Prišlo je do nastanka nove vezi, -SMe pa je kot dobro izstopajoča skupina izstopila (slika 18). Pri tem je izredno pomembna prisotnost Hg^{2+} ionov, saj ti dobro vežejo žveplo, zato reakcijski zmesi dodamo tudi HgCl_2 , kar vodi do nastanka soli Hg(SMe)Cl . Preostali Cl^- ioni, ki se sproščajo iz HgCl_2 , se porabijo za nastanek HCl , zato je potrebno reakcijski zmesi dodati tudi bazo (Et_3N), ki poskrbi za nevtralizacijo nastalega. V nasprotnem primeru bi namreč lahko prišlo do protoniranja $-\text{NH}_2$ skupine, kar bi močno zmanjšalo njeno nukleofilnost.



Slika 18: Mehanizem sinteze z Boc zaščitenih gvanidinskih derivatov

Po končani reakciji je sledila izolacija, kjer smo se s filtracijo najprej znebili nastale soli ($\text{Hg}(\text{SMe})\text{Cl}$), nato pa je sledilo spiranje v etilacetatu raztopljenega ostanka z vodo in čiščenje surovega produkta s pomočjo kolonske kromatografije.

Omenjena sinteza in izolacija sta potekali brez večjih težav, kar potrjujejo tudi precej visoki izkoristki (96 %, 71 %).

Zadnja stopnja sinteze gvanidinskih derivatov je zopet vključevala odščito amino skupin na gvanidinskem delu molekule. Tudi tokrat smo se odstranitve Boc skupin lotili z uporabo CF_3COOH . Odščiteni spojini smo po uspešni acidolizi nato pretvorili še v stabilnejšo obliko – hidroklorid.

5.3 BIOLOŠKO TESTIRANJE

Sintetizirane spojine smo posredovali na testiranja, v okviru katerih so bile določene njihove inhibitorne sposobnosti – zaviralna aktivnost na izoliranih encimih ter morebitna protibakterijska aktivnost na določenih bakterijskih sevih.

5.3.1 Zaviralna aktivnost

Zaviralna aktivnost spojin je bila določena na izoliranih encimih MurF *E. Coli* (MurF_{Ec}) in *S. pneumoniae* (MurF_{Sp}) s pomočjo testa z malahitnim zelenilom. Gre za kolorimetrični test, ki omogoča določitev prostega anorganskega fosfata (P_i), ki se sprosti med encimsko reakcijo, s čimer lahko določimo inhibitorno aktivnost potencialnih inhibitorjev (45, 46). Po dodatku ustreznih reagentov se tvori obarvan kompleks med malahitnim zelenilom, molibdatom in nastalim prostim anorganskim fosfatom. Količino nastalega kompleksa merimo spektrofotometrično pri valovni dolžini med 590 in 650 nm, izmerjena absorbanca pa je sorazmerna s količino nastalega P_i in posledično aktivnostjo testiranega encima (47).

Rezultati testa so podani kot rezidualna aktivnost (RA), ki predstavlja razmerje med aktivnostjo encima MurF v prisotnosti 100 μM testirane spojine in aktivnostjo encima v odsotnosti testirane spojine. Pri derivatih z bolj izrazitim zaviralnim učinkom je podana vrednost IC_{50} , ki izkazuje tisto koncentracijo spojine, pri kateri se aktivnost encima zmanjša za polovico.

Oznaka spojine	\mathbf{R}_1	RA (%) ali IC_{50}^a (μM)	
		$MurF_{Sp}$	$MurF_{Ec}$
5		81 %	82 %
6		102 %	97 %
8		170 μM	208 μM
10		75 μM	56 μM
12		128 μM	272 μM
14		78 μM	102 μM

Tabela 2: Rezultati testiranja zaviralne aktivnosti spojin

^a Koncentracija inhibitorja, kjer je rezidualna aktivnost encima enaka 50 % - pridobljena z merjenjem aktivnosti pri sedmih različnih koncentracijah testirane spojine.

5.3.2 Protibakterijska aktivnost

Protibakterijska aktivnost je bila določena na izoliranih sevih *S. aureus*, *E. Coli* in *S. Pneumoniae* s pomočjo mikrodilucijske metode v gojišču Mueller Hinton, pri čemer smo dobili najnižjo koncentracijo testiranega derivata, ki zavre rast mikroorganizmov (MIC). (45)

Spojina	MIC ($\mu\text{g/ml}$)							
	<i>S. Aureus</i>	<i>E. Coli</i>						
		SH1000	1411	1411+ PMBN ^a	AB734	AB734+ PMBN ^a	SM1411 ^b	
8	128	128	32	128	32	32	32	128
10	64	16	8	16	8	8	8	64
12	128	64	32	64	32	32	32	/
14	>256	32	32	32	32	16	8	32

Tabela 3: Rezultati testiranja zavirala učinka sintetiziranih spojin na rast bakterij

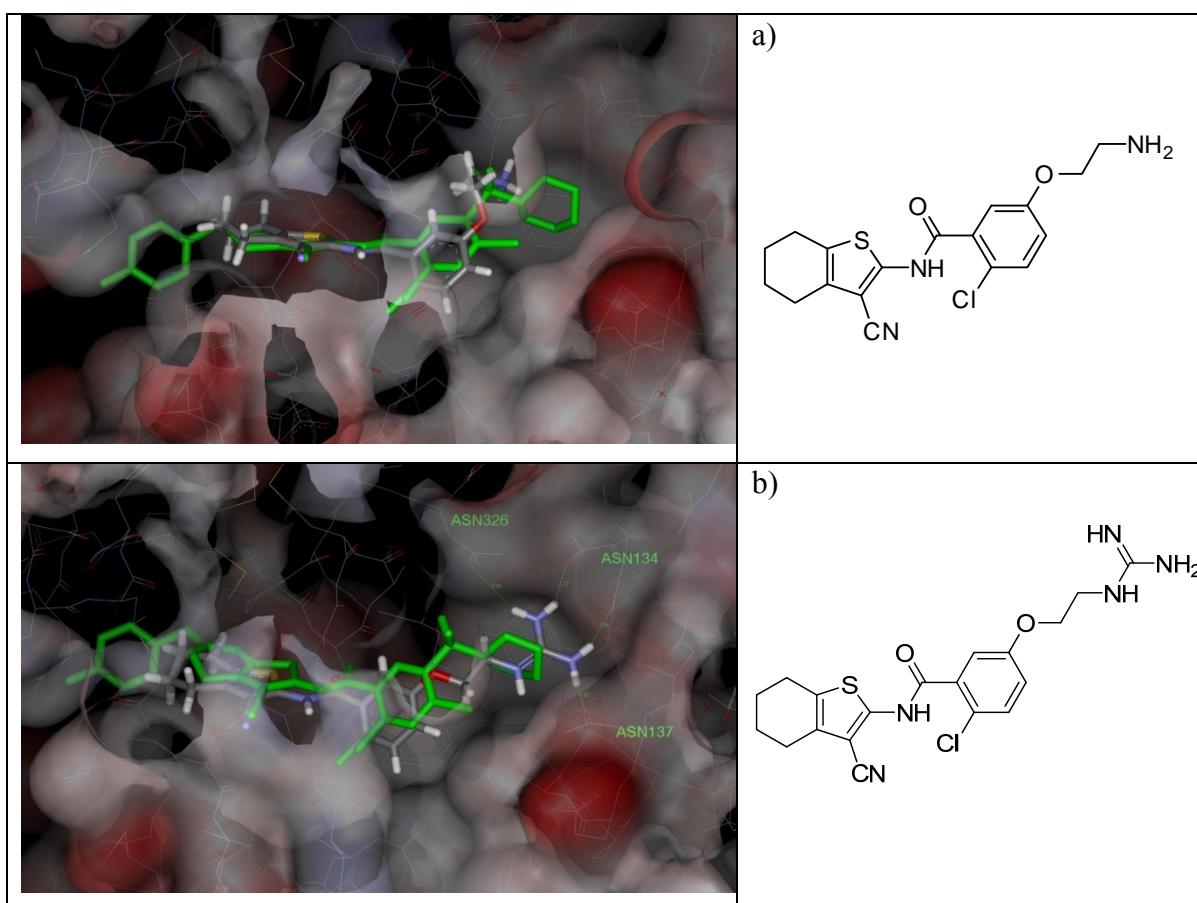
^a Zunanja membrana celic je obdelana s polimiksinom B, kar poveča njeno permeabilnost.

^b Sevi s pomanjkljivim in manj učinkovitim sistemom izčrpavanja snovi iz celice.

Iz pridobljenih rezultatov, ki so prikazani v tabelah (tabela 2 in 3), lahko vidimo, da sintetizirane spojine izkazujejo različne zavirale aktivnosti. Derivati, ki imajo na osnovni skelet priprete arilne substituente (**5** in **6**), ne izkazujejo izrazite inhibitorne aktivnosti. Precej boljše lastnosti imajo aminski derivati (**8**, **12**), kjer je zaznati sicer večji, vendar še vedno dokaj skromen zaviralni učinek. Najboljše rezultate smo pridobili s pomočjo gvanidinskih derivatov (**10**, **14**), katerih aktivnost je celo dvakrat ali trikrat večja od prej omenjenih aminov. Tako pri aminskih kot gvanidinskih derivatih nam je uspelo pridobiti tudi MIC vrednosti, kjer so najbolj spodbudne rezultate pričakovano dali gvanidinski derivati. Če preučimo vpliv dolžine alkilne verige, razliko med etilnimi in propilnimi derivati sicer opazimo, vendar ima le-ta v našem primeru zanemarljiv vpliv.

Da bi lahko bolje preučili pridobljene rezultate in način sidranja inhibitorja v aktivno mesto encima, so bile spojine posredovane tudi na Inštitut za strukturno biologijo v Grenoblu, kjer so v sodelovanju z raziskovalci Fakultete za farmacijo v Ljubljani poskušali razrešiti kristalne strukture MurF *S. Pneumoniae* v kompleksu z gvanidinskim inhibitorjem. Žal jim kristalne strukture z našim inhibitorjem ni uspelo pridobiti, pridobljene pa so bile sidrane strukture encima v kompleksu z aminskim in gvanidinskim

derivatom, ki nam pomagajo predvidevati, kako se sintetizirane spojine vežejo v aktivno mesto tarčnega encima (slika 19).



Slika 19: Cianotiofensi inhibitorji (a, b) sidrani v MurF encim *S. Pneumoniae* s kokristaliziranim inhibitorjem (obrav zeleno) (povzeto po 45)

Iz pridobljenega lahko sklepamo o načinu sidranja sintetiziranih aminskih in gvanidinskih derivatov (**8**, **10**, **12**, **14**), kar nam pomaga pojasniti tudi dosežene zaviralne aktivnosti, ki jih omenjene spojine dosegajo. Pri tem je potrebno poudariti, da gre kljub dobremu napovedovanju omenjenega postopka le za predvidevanja, ki bi jih dokončno lahko potrdile kristalne strukture.

Večjo aktivnost gvanidinskih derivatov v primerjavi z aminskimi lahko pojasnimo s številom vodikovih vezi, ki so jih substituenti sposobni tvoriti. Gvanidinska skupina je namreč z aktivnim mestom encima sposobna tvoriti kar štiri vodikove vezi z Asn 134, Asn 137 in Asn 326, medtem ko amino skupina omogoča tvorbo le dveh. To je po vsej verjetnosti eden poglavitnih vzrokov za večjo aktivnost gvanidinskih derivatov. Alkilno

verigo med osnovnim skeletom in gvanidinsko skupino najverjetneje ne bi bilo več smiselno podaljševati. Če etilni derivat primerjamo s propilnim derivatom, vidimo, da aktivnost s podaljšanjem nekoliko upade (glede na MIC vrednosti), saj postane žep, kamor se ta del zasidra, bolj utesnjen in bi bil za daljše derivate verjetno premajhen.

Iz tega lahko sklepamo, da je poleg ustrezne skupine, ki zagotavlja ustrezne interakcije, potrebno zagotoviti tudi optimalno velikost, ki je ključna pri prileganju spojine v aktivnem mestu encima. V našem primeru se je glede na te kriterije najbolje izkazala spojina **10**.

6 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo načrtovali in nato uspešno sintetizirali 6 končnih spojin, ki predstavljajo potencialne zaviralce ligaze MurF. Sintezna pot je bila sestavljena iz petih stopenj, kjer smo sintetizirali dva arilna derivata oziroma osmih stopenj, s pomočjo katerih smo sintetizirali dva aminska in dva gvanidinska derivata.

Prvi dve stopnji sta obsegali pripravo aminskega derivata in zaščito ustreznega kislinskega derivata, ki smo ju nato v tretji stopnji preko amidne vezi spojili. Po odščiti aromatske hidroksilne skupine v četrti stopnji smo tako dobili osnovni cianotiofenski skelet, na katerega smo nato pripenjali različne substituente. V peti stopnji smo sintetizirali dva derivata z benzilno skupino ter dva z Boc zaščitena amina, ki sta nato služila kot osnova za pripravo gvanidinskih derivatov. V šesti stopnji je sledila odstranitev Boc zaščite na primarni aminoskupini, kamor smo v sedmi stopnji nato vezali z Boc zaščiten gvanidin. V zadnji, osmi stopnji, je potekalo odstranjevanje Boc zaščit na gvanidinu.

Pri izvedbi omenjenih sintez smo imeli precej težav pri sintezi in izolaciji derivatov, pripravljenih v petem koraku, medtem ko so ostale stopnje potekale dokaj gladko. Problem smo imeli tako pri pripravi končnega benzilnega derivata (**5**) kot pri sintezi derivatov z Boc zaščiteno amino skupino (**7** in **11**). Z uporabo različnih sinteznih postopkov in načinov izolacije smo prišli do naslednjih spoznanj.

- Izolacija s pomočjo prekristalizacije je v primerjavi s kolonsko kromatografijo enostavnejša in hitrejša metoda, ki zahteva precej manjšo porabo topil. Žal ne daje vedno zadovoljivih rezultatov, za kar je najverjetneje kriva prevelika vsebnost nečistot. S tem bi lahko pojasnili potek dogodkov pri izolaciji spojine **5**. Iz raztopine so namreč izpadli čisti kristali le v primeru, ko je bila predhodno izvedena kolonska kromatografija, ko smo se znebili večjega števila nečistot.
- V peti stopnji sinteze se je Cs_2CO_3 v primerjavi s K_2CO_3 izkazal za primernejšega. Tekom reakcije je ob uporabi slednjega nastalo precej več stranskih produktov, sodeč po intenzivnosti lise na TLC ploščici pa precej manj produkta. Ob tem je potrebno upoštevati še dejstvo, da je ob uporabi K_2CO_3 reakcija potekala pri višji temperaturi, s čimer smo najverjetneje ravno tako zmanjšali selektivnost reakcije in povečali verjetnost stranskih reakcij.

- Mitsunobujeva reakcija se v našem primeru ni izkazala za selektivno, saj je poleg fenolne –OH skupine reagirala tudi amidna skupina, ki ima ravno tako šibko kisle lastnosti. S tovrstno sintezo v primeru več kislih skupin v izhodni spojini tako tvegamo neselektiven potek reakcije.

Sintetiziranim spojinam smo s pomočjo testa z malahitnim zelenilom, kjer spektrofotomerično spremljamo nastanek ortofosfata med encimsko reakcijo, določili njihove zaviralne aktivnosti. Dobre rezultate smo pridobili s pomočjo aminskih derivatov (**8, 12**), še bolje pa so se izkazali gvanidinski derivati (**10, 14**). Pri obeh skupinah smo zato testirali še jakost morebitnega protimikrobnega delovanja, kjer smo pričakovano dobili dobre in spodbudne rezultate pri gvanidinskih derivatih.

Iz tega lahko na splošno sklepamo, da je poleg ustrezone velikosti in konformacije inhibitorja potrebno priskrbeti tudi ustrezne funkcionalne skupine, ki bodo zagotavljale interakcije z aktivnim mestom encima. Močnejša kot je interakcija inhibitorja z encimom, boljši zaviralni učinek le-tega lahko pričakujemo.

7 LITERATURA

1. Lemke, T. L.; Williams, D. A. *Foye's principles of medicinal chemistry*, 7th ed., Lippincott Williams & Williams, Philadelphia, 2013; 1074-1078.
2. <http://www.britannica.com/EBchecked/media/102103/Bacterial-cells-differ-from-animal-cells-and-plant-cells-in>.
3. Tenover, F. C. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *American journal of infection control*, junij **2006**, 34, S3-10.
4. Graham, L. P. *An introduction to Medicinal Chemistry*, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, 2005; 379-382.
5. Sengupta, S.; Chattopadhyay, M. K.; Grossart, H. P. The multifaceted roles of antibiotic sand antibiotic resistance in nature. *Frontiers in microbiology*, **2013**, 4, art. 47, 1-13.
6. Silver, L. L. Challenges of antibacterial discovery. *Clinical microbiology reviews*, **2011**, 24(1), 71-109.
7. Walsh, F. M.; Amyes, S. G. B. Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens. *Elsevier*, **2004**, 7(5), 439-444.
8. <http://www.klinika-golnik.si/dejavnost-bolnisnice/klinicna-dejavnost/datoteke/Navodila-za-preprecevanje-sirjenja-MRSA.pdf>
9. Miklavčič, V. Preprečevanje nastanka in širjenja rezistentnih bakterijskih sevov in ostalih mikroorganizmov. *Obzornik zdravstvene nege*, **1999**, 33 (1-2), 93-97.
10. Giedraitiene, A.; Vitkauskiene, A.; Naginiene, R.; Pavilonis, A. Antibiotic resistance mechanisms of clinically important bacteria. *Medicina (Kaunas)*, **2011**, 47(3), 137-146.
11. <http://amrls.cvm.msu.edu/microbiology/molecular-basis-for-antimicrobial-resistance/intrinsic-resistance>
12. Courvalin, P. Predictable and unpredictable evolution of antibiotic resistance. *Journal of internal medicine*, **2008**, 264, 4-16.
13. Benett, P. M. Plasmid encoded antibiotic resistance: Acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British Journal of Pharmacology*, **2008**, 153, S347-S357.
14. http://www.wiley.com/college/pratt/0471393878/student/activities/bacterial_drug_resistance/

15. Gubina, M.; Ihan, A; Števanec, I. *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikobiologijo*, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002, 3-7.
16. Yount, N. Y.; Yeaman, M. R. Peptide antimicrobials: cell wall as a bacterial target. *Annals of the New York Academy of sciences*, **2013**, 1277, 127-38.
17. Silhavy, T. J.; Kahne, D.; Walker, S. The bacterial cell envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, **2010**, 2:a000414.
18. Navarre, W. W.; Schneewind, O. Surface proteins of Gram-positive bacteria and mechanisms of their targeting to the cell wall envelope. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **1999**, 63 (1), 174-229.
19. Hughes, A. H.; Hancock, I. C.; Baddiley, J. The function of teichoic acids in cation control in bacterial membranes. *Biochemical Journal*, **1973**, 132, 83-93.
20. Schirner, K.; Marles-Wright, J.; Lewis, R. J.; Errington, J. Distinct and essential morphogenic functions for wall- and lipo-teichoic acids in *Bacillus subtilis*. *The European Molecular Biology Organization Journal*, **2009**, 28, 830-842.
21. Huang, K. C.; Mukhopadhyay, R.; Wen, B.; Gitai, Z.; Wingreen, N. S. Cell shape and cell-wall organization in Gram-negative bacteria. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America*, **2008**, 105 (49), 19282-19287.
22. Vollmer, W.; Blanot, D.; de Pedro, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology reviews*, **2008**, 32 (2), 149-167.
23. Vollmer, W. Structural variation in the glycan strands of bacterial peptidoglycan. *FEMS Microbiology reviews*, **2008**, 32 (2), 287-306.
24. Barreteau, H.; Kovač, A.; Boniface, A.; Sova, M.; Gobec, S.; Blanot, D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology reviews*, **2008**, 32 (2), 168-207.
25. Bouhss, A.; Trunkfield, A. E.; Bugg, T. D. H.; Mengin-Lecreulx, D. The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiology reviews*, **2008**, 32 (2), 208-233.
26. Vollmer, W.; Bertsche U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2008**, 1778 (9), 1714-1734.
27. Johnson, J. W.; Fisher, J. F.; Mobashery, S. Bacterial cell-wall recycling. *Annals of the New York Academy of sciences*, **2013**, 1277, 54-75.

28. 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. *The European Molecular Biology Organization Journal*, **2011**, 30 (8), 1425-1432.
29. van Heijenoort, J. Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology*, **2011**, 11(3), 25R-36R.
30. Sauvage, E.; Kerff, F.; Terrak, M; Ayala, J. A.; Charlier, P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology reviews*, **2008**, 32 (2), 234-258.
31. El Zeeby, A.; Sanschagrin, F.; Levesque, R. C. Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Molecular Microbiology*, **2003**, 47 (1), 1-12.
32. Yan, Y.; Munshi, S.; Leiting, B.; Anderson, M. S.; Chrzas, J.; Chen, Z. Crystal structure of Escherichia coli UDPMurNAc-tripeptide D-alanyl-D-alanine adding enzyme (MurF) at 2.3 Å resolution. *Journal of molecular biology*, **2000**, 304 (3), 435-445.
33. Longenecker, K. L.; Stamper, G. F.; Hajduk, P. J.; Fry, E. H.; Jakob, C. G.; Harlan, J. E.; Edalji, R.; Bartley, D. M.; Walter, K. A.; Solomon, L. R.; Holzman, T. F.; Gu, Y. G.; Lerner, C. G.; Beutel, B. A., Stoll, V. S. Structure of MurF from Streptococcus pneumoniae co-crystallized with a small molecule inhibitor exhibits interdomain closure. *Protein Science*, **2005**, 14 (12), 3039-3047.
34. Baum, E. Z.; Crespo-Carbone, S. M.; Abbanat, D.; Foleno, B.; Maden, A.; Goldschmidt, R.; Bush, K. Utility of muropeptide ligase for identification of inhibitors of the cell wall biosynthesis enzyme MurF. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2006**, 50 (1), 230-236.
35. Miller, D. J.; Hammond, S. M.; Anderuzzi, D.; Bugg, T. D. H. Aminoalkylphosphinate inhibitors of D-Ala-D-Ala adding enzyme. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1*, **1998**, 131-142.
36. Gu, Y. G.; Florjancic, A. S.; Clark, R. F.; Zhang, T.; Cooper, C. S.; Anderson, D. D.; Lerner, C. G.; McCall, J. O.; Cai, Y.; Black-Schaefer, C. L.; Stamper, G. F.; Hajduk, P. J.; Beutel, B. A. Structure-activity relationships of novel potent MurF inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, **2004**, 14 (1), 267-270.

37. Stamper, G. F.; Longenecker, K. L.; Fry, E. H.; Jakob, C. G., Florjancic, A. S.; Gu, Y. G.; Anderson, D. D.; Cooper, C. S.; Zhang, T.; Clark, R. F.; Cia, Y.; Black-Schaefer, C. L.; Owen McCall, J.; Lerner, C. G.; Hajduk, P. J.; Beutel, B. A.; Stoll, V. S. Structure-based optimization of MurF inhibitors. *Chemical biology & Drug Design*, **2006**, 67 (1), 58-65.
38. Turk, S.; Kovač, A.; Boniface, A.; Bostock, J. M.; Chopra, I.; Blanot, D.; Gobec, S. Discovery of new inhibitors of the bacterial peptidoglycan biosynthesis enzymes MurD and MurF by structure-based virtual screening. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **2009**, 17, 1884-1889.
39. Baum, E. Z.; Crespo-Carbone, S. M.; Klinger, A.; Foleno, B. D.; Turchi, I.; Macielag, M.; Bush, K. A MurF Inhibitor That Disrupts Cell Wall Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2007**, 51 (12), 4420-4426.
40. Baum, E. Z.; Crespo-Carbone, S. M.; Foleno, B. D.; Simon, L. D.; Guillemont, J.; Macielag, M.; Bush, K. MurF Inhibitors with Antibacterial Activity: Effect on Muropeptide Levels. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, **2009**, 53 (8), 3240-3247.
41. Turk, S.; Hrast, M.; Sosič, I.; Barreteau, H.; Mengin-Lecreux, D.; Blanot, D.; Gobec, S. Biochemical characterization of MurF from *Streptococcus pneumoniae* and the identification of a new MurF inhibitor through ligand-based virtual screening. **2013** – članek še ni objavljen.
42. Lipinski, C. A.; Lombardo, F.; Dominy B. W.; Feeney, P. J. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2001**, 46, 3-26.
43. Anderluh, M.; Mravljak, J.; Perdih, A.; Sova, M.; Pečar, S. *Farmacevtska kemija III: vaje in seminarji*, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2010; 3-19.
44. Humphries, P. S.; Do, Q. Q.; Wilhite, D. M. ADDP and PS-PPh₃: an efficient Mitsunobu protocol for the preparation of pyridine ether PPAR agonists. *Bilstein Journal of Organic Chemistry*, **2006**, 2:21.
45. Hrast, M.; Anderluh, M.; Knez, D.; Randall, C. P.; Barreteau, H.; O'Neill, A. J.; Blanot, D.; Gobec, S. Second generation cyanothiophene MurF inhibitors. **2013** – članek še ni objavljen.

46. Lanzetta, P. A.; Alvarez, L. J.; Reinach, P. S.; Candia, O. A. An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Analytical biochemistry*, **1979**, 100, 95-97.
47. Pegan, S. D.; Tian, Y.; Sershon, V.; Meseca, A. D. A Universal, Fully Automated High Throughput Screening Assay for Pyrophosphate and Phosphate Release from Enzymatic Reactions. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, **2010**, 13, 27-38.