

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KELI HOČEVAR

**SINTEZA IN VREDNOTENJE NOVIH  
HIDROKSJETILAMINSKIH IN CIANOTIOFENSKIH  
ZAVIRALCEV LIGAZ MURC, D IN F**

MAGISTRSKA NALOGA  
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2015

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KELI HOČEVAR

**SINTEZA IN VREDNOTENJE NOVIH  
HIDROKSJETILAMINSKIH IN CIANOTIOFENSKIH  
ZAVIRALCEV LIGAZ MURC, D IN F**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF NOVEL  
HYDROXYETHYLAMINE AND CYANOTHIOPHENE  
INHIBITORS OF MUR C, D AND F LIGASES**

Ljubljana, 2015

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm.. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani (Center za masno spektrometrijo).

### **Zahvala**

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm. za strokovno pomoč, pridobljeno znanje in nasvete pri izdelavi magistrskega dela. Zahvaljujem se tudi ostalim sodelavcem Katedre za farmacevtsko kemijo.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm..

Keli Hočevar

Ljubljana, 2015

Predsednik komisije: prof. dr. Samo Kreft, mag. farm.

Članica komisije: doc. dr. Nataša Karas Kuželički, mag. farm.

# VSEBINA

<b>SLIKOVNO KAZALO</b> .....	i
<b>POVZETEK</b> .....	iii
<b>ABSTRACT</b> .....	iv
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	v
<b>1 UVOD</b> .....	1
1.1 Zgradba bakterijske celične stene .....	2
1.2 Odpornost bakterij .....	3
1.3 Biosinteza peptidoglikana .....	4
1.4 Ligaze Mur .....	8
1.5 Hidroksietilamini kot mimetiki prehodnega stanja .....	15
<b>2 NAMEN DELA</b> .....	16
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	17
3.1 Materiali .....	17
3.2 Kromatografske metode .....	17
3.3 Spektroskopske metode .....	18
3.4 Biokemično testiranje .....	19
<b>4 EKSPERIMENTALNI DEL</b> .....	20
4.1 Sinteza hidroksietilaminskih zaviralcev .....	20
4.1.1 Sinteza 1-( <i>terc</i> -butoksikarbonil)piperidin-3-karboksilne kisline (spojina <u>4</u> ) ....	21
4.1.2 Sinteza <i>terc</i> -butil 3-((2-( <i>1H</i> -indol-3-il)etil)karbamoil)piperidin-1-karboksilata (spojina <u>5</u> ) .....	22
4.1.3 Sinteza <i>N</i> -(2-( <i>1H</i> -indol-3-il)etil)piperidin-3-karboksamida (spojina <u>6</u> ) .....	23
4.1.4 Sinteza 1-((benziloksi)karbonil)piperidin-3-karboksilne kisline (spojina <u>7</u> ) .....	24
4.1.5 Sinteza benzil 3-((2-( <i>1H</i> -indol-3-il)etil)kabamoil)piperidin-1-karboksilata (spojina <u>8</u> ) .....	25
4.1.6 Sinteza <i>N</i> -(2-( <i>1H</i> -indol-3-il)etil)piperidin-3-karboksamida (spojina <u>6</u> ) .....	26
4.1.7 Sinteza <i>N</i> -alil-4-metoksibenzensulfonamida (spojina <u>10</u> ) .....	27
4.1.8 Sinteza 4-metoksi- <i>N</i> -(oksiran-2-il-metil)benzensulfonamida (spojina <u>11</u> ) .....	28
4.1.9 Sinteza <i>N</i> -(2-( <i>1H</i> -indol-3-il)etil)-1-(2-hidroksi-3-(4-metoksifenilsulfonamido)propil)piperidin-3-karboksamida (spojina <u>12</u> ) .....	29
4. 1. 10 Sinteza 5-((oksiran-2-il)metoksimetil)benzo[d][1,3]dioksola (spojina <u>14</u> )....	30

4.1. 11 Sinteza <i>N</i> -(2-( <i>1H</i> -indol-3-il)etil)-1-(3-(benzo[d][1,3]dioksol-5-ilmetoksi)-2-hidroksipropil)piperidin-3-karboksamida (spojina <u>15</u> ) .....	31
4.2 Sinteza cianotiofenskega zaviralca .....	33
4.2.1 Sinteza 2,4-dikloro-5-(klorosulfonyl)benzojske kisline (spojina <u>16</u> ).....	33
4.2.2 Sinteza 2,4-dikloro-5-( <i>N</i> -(2-metoksietil)sulfamoil)benzojske kisline (spojina <u>17</u> ).....	34
4.2.3 Sinteza <i>terc</i> -butil 3-ciano-2-(2,4-dikloro-5-( <i>N</i> -(2-metoksietil)sulfamoil)benzamido)-4,7-dihidrotieno[2,3- <i>c</i> ]piridin-6( <i>5H</i> ) karboksilata (spojina <u>19</u> ) .....	35
4.2.4 Sinteza 3-ciano-2-(2,4-dikloro-5-( <i>N</i> -(2-metoksietil)sulfamoil) benzamido)-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3- <i>c</i> ]piridin-6-ijevega 2,2,2-trifluoroacetata (spojina <u>20</u> ).....	36
4.2.5 Sinteza 2,4-dikloro- <i>N</i> -(3-ciano-6-(3-hidroksibenzil)-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3- <i>c</i> ]piridin-2-il)-5-( <i>N</i> -(2-metoksietil)sulfamoil)benzamida (spojina <u>21</u> ) .....	37
<b>5 REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	39
5.1 Komentar sinteznih postopkov .....	39
5.1.1 Uvedba začitnih skupin z Boc <sub>2</sub> O in CbzCl na nipekotinsko kislino (sinteza spojin <u>4</u> in <u>7</u> ) .....	39
5.1.2 Sinteza amidne vezi s sklopitvenimi (angl. »coupling«) reagenti .....	40
5.1.3 Sintezni postopek za pripravo epoksida preko oksidacije alkena (spojina <u>11</u> ) ..	42
5.1.4 Sintezni postopek za pripravo epoksida z O-alkilacijo ( spojina <u>14</u> ) .....	44
5.1.5 Sinteze končnih hidrksietiaminov <u>12</u> in <u>15</u> .....	45
5.1.6 Sinteza spojine <u>21</u> .....	46
5.2 Biokemično testiranje .....	49
5.2.1 Rezultati biokemičnih testiranj .....	49
5.2.2 Ovrednotenje rezultatov biokemičnih testiranj.....	51
<b>6 SKLEP</b> .....	55
<b>7 LITERATURA</b> .....	56

## SLIKOVNO KAZALO

<b>Slika 1:</b> Strukturi zdravljenih učinkovin, ki zavirata biosintezo peptidoglikana .....	6
<b>Slika 2:</b> Shematski prikaz biosinteze peptidoglikana .....	7
<b>Slika 3:</b> Strukturni prikaz mehanizma delovanja Mur encimov .....	9
<b>Slika 4:</b> Tridimenzionalna struktura MurC ligaze .....	9
<b>Slika 5:</b> Fosfatni HEA zaviralec encimov MurC-F kot analog prehodnega stanja levo in nefosfatni HEA analog desno .....	10
<b>Slika 6:</b> Strukturne formule predstavnikov MurF zaviralcev .....	12
<b>Slika 7:</b> Prikaz strukturne formule druge generacije cianotiofenskih zaviralcev .....	14
<b>Slika 8:</b> Hidroksietilaminska struktura kot mimetik peptidne vezi; povzeto po (14) .....	15
<b>Slika 9:</b> Spojina <u>1</u> .....	16
<b>Slika 10:</b> Strukturna formula spojine <u>2</u> .....	16
<b>Slika 11:</b> Strukturna formula barvila malahit zeleno .....	19
<b>Slika 12:</b> Prikaz sinteznih poti hidroksietilaminskih zaviralcev <u>12</u> in <u>15</u> .....	20
<b>Slika 13:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>4</u> .....	21
<b>Slika 14:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>5</u> .....	22
<b>Slika 15:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>6</u> .....	23
<b>Slika 16:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>7</u> .....	24
<b>Slika 17:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>8</u> .....	25
<b>Slika 18:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>6</u> .....	26
<b>Slika 19:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>10</u> .....	27
<b>Slika 20:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>11</u> .....	28
<b>Slika 21:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>12</u> .....	29
<b>Slika 22:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>14</u> .....	30
<b>Slika 23:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>15</u> .....	31
<b>Slika 24:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>21</u> .....	33
<b>Slika 25:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>16</u> .....	33
<b>Slika 26:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>17</u> .....	34
<b>Slika 27:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>19</u> .....	35
<b>Slika 28:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>20</u> .....	36
<b>Slika 29:</b> Reakcijska shema sinteze spojine <u>2</u> .....	37
<b>Slika 30:</b> Prikaz mehanizmov aktivacije karboksilne skupine z DCC .....	41

<b>Slika 31:</b> Reakcijska shema sinteze amidne vezi z uporabo EDC sklopitvenega reagenta in HOBt .....	41
<b>Slika 32:</b> Reakcijska shema aktivacije karboksilne kisline z BOP-om.....	42
<b>Slika 33:</b> Shematski prikaz mehanizma epoksidacije alkena z <i>m</i> -CPBA preko protonacije peroksi kisline.....	43
<b>Slika 34:</b> Pretvorba prebitne <i>m</i> -CPBA do <i>m</i> -CBA z Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub> .....	44
<b>Slika 35:</b> Sinteza spojine <u>14</u> preko Williamsonove sinteze etrov .....	44
<b>Slika 36:</b> Prikaz mehanizma tvorbe kislinskega klorida z (COCl) <sub>2</sub> in DMF.....	47
<b>Slika 37:</b> Mehanizem Schotten-Baumannove reakcije , druge stopnje sinetze spojine <u>19</u> . 48	
<b>Slika 38:</b> Mehanizem tvorbe amina z direktnim reduktivnim aminiranjem .....	49
<b>Slika 39:</b> Prikaz rezidualne aktivnosti (RA) encima MurF <sub>Sp</sub> v odvisnosti od koncentracije spojine <u>21</u> .....	53
<b>Slika 40:</b> Prikaz linearne odvisnosti logaritamskih vrednosti RA od logaritamskih vrednosti koncentracij spojine <u>21</u> .....	53

## POVZETEK

Problem odpornosti bakterij na obstoječe antibiotike se v zadnjih letih pogloblja, kljub številnim raziskavam usmerjenim v področje iskanja novih tarč in odkrivanju protibakterijskih učinkovin z novimi mehanizmi delovanja. Ligaze MurC-F so za bakterije specifični od ATP odvisni citoplazemski encimi, esencialnega pomena za sintezo peptidoglikana, heteropolimera bistvenega za preživetje širokega spektra bakterijskih vrst. Katalizirajo zaporedne adicije treh aminokislin in dipeptida na uridindifosfatni substrat. Nahajajo se znotraj celične plasti peptidoglikana, kar predstavlja še dodaten izziv za razvoj novih učinkovin.

V sklopu raziskav magistrske naloge smo sintetizirali nove spojine s hidroksietilaminskim in cianotiofenskim skeletom z namenom izboljšanja jakosti inhibicije, poleg tega pa smo želeli doseči še protibakterijsko delovanje. Hidroksietilaminski in cianotiofenski analogi so že poznani inhibitorji ligaz Mur. V sklopu našega raziskovalnega dela pa smo želeli s strukturnimi spremembami izboljšati njihovo delovanje ter pridobiti dodatne informacije o odnosu med strukturo in delovanjem le-teh. Izhajali smo iz spojine zadetka, najdenega z virtualnim rešetanjem knjižnice spojin na Fakulteti za farmacijo, ki je zavirala delovanje encima MurC. Po večstopenjski sintezni poti nam je uspelo preko regioselektivnega odpiranja epoksidnega obroča s sekundarnim aminom sintetizirati dve ustrezno čisti končni spojini (**12** in **15**). Drugi del naloge je obsegal sintezo cianotiofenskih analogov, ki so že poznani zaviralci encima MurF. S petstopenjsko sintezo nam je uspelo sintetizirati spojino **21**.

Končnim spojinam smo določili rezidualno aktivnost za posamezen encim in tako ovrednotili njihovo zaviralno delovanje. Spojina **12** je pri koncentraciji 500  $\mu\text{M}$  za 48 % zmanjšala delovanje encima MurC, kar je primerljiva jakost inhibicije v primerjavi s spojino zadetkom, poleg tega pa je v manjši meri (33 %) zavirala tudi ligazo MurD. Najmočnejši zaviralec je predstavljala spojina **21**, kateri smo določili tudi  $\text{IC}_{50}$  vrednost 15,7  $\mu\text{M}$ , kar jo uvršča med enega boljših do sedaj znanih zaviralcev encima MurF. Ugotovili smo, da zamenjava morfolinskega obroča z manj rigidno 2-metoksietilno verigo nekoliko zmanjša jakost inhibicije.

Sintetizirane spojine predstavljajo odlično izhodišče za nadaljnjo optimizacijo, s katero bi dosegli protibakterijski učinek. V prihodnosti bi bilo potrebno uvesti take strukturne spremembe, ki bi omogočile boljši prehod skozi celične stene bakterij, hkrati pa bi še vedno ohranili močno zaviralno delovanje.

**Ključne besede:** encimi Mur, peptidoglikan, zaviralci, hidroksietilamini, cianotiofenski skelet



## ABSTRACT

Despite numerous research studies focused on the discovery of antibacterial agents with novel mechanisms of action, the problem of bacterial resistance to existing antibiotics has grown in recent years. MurC-F ligases are bacteria-specific ATP-dependent cytoplasmic enzymes of essential importance for the synthesis of peptidoglycan, a heteropolymer that is crucial for the survival of a wide range of bacterial species. The enzymes catalyze successive additions of amino acids and dipeptide on uridine diphosphate substrate. They are located within the cell layers of peptidoglycan, which represents an additional challenge for the development of new drugs.

Within the research, as part of this master's thesis, we synthesized new compounds with hydroxyethylamine and cyanothiophene scaffolds in order to improve inhibitory potency; in addition we wanted to achieve further antibacterial activity. Hydroxyethylamine and cyanothiophene analogues are already known inhibitors of Mur ligases. As part of our research, through structural modifications, we wanted to improve their inhibitory activity and obtain further information on the structure-activity relationship. Therefore, we started from the hit compound, found by virtual screening of libraries of compounds at the Faculty of Pharmacy in Ljubljana, which inhibited MurC enzyme activity. In a multistep-synthesis we managed, via regioselective opening of the epoxide ring with the secondary amine, to synthesize two pure final compounds (**12** and **15**). The second part of the master's thesis consisted of the synthesis of cyanothiophene-based derivatives, which are already known as MurF inhibitors. Through the five-step synthesis process we successfully synthesized compound **21**.

Furthermore, each final compound's inhibitory activity was evaluated by examining the residual activity of each enzyme. Compound **12** at a concentration of 500  $\mu\text{M}$  decreased MurC enzyme activity by 48 %, which is a similar inhibitory potency to the hit compound. In addition, to a lesser extent (33 %), it also inhibited the MurD ligase. The most potent inhibitor was compound **21**, to which we determined  $\text{IC}_{50}$  value of 15,7  $\mu\text{M}$ , which ranks it among one of the best MurF enzyme inhibitors known so far. We found that replacing the morpholine ring with less rigid 2-methoxyethyl chain slightly reduces the inhibitory activity.

To conclude, the synthesized compounds represent an excellent starting point for further optimization toward novel antibacterials. In the future, it would be necessary to introduce structural changes that would allow a better transport through bacterial cell walls, while still retaining potent inhibitory activity.

**Key words:** Mur enzymes, peptidoglycan, inhibitors, hydroxyethylamine, cyanothiophene structure

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>Ac</b>	acetil
<b>ADP</b>	adenozindifosfat
<b>Ala</b>	alanin
<b>Alr</b>	alanin racemaza
<b>angl.</b>	angleško
<b>A<sub>2</sub>pm</b>	diaminopimelinska kislina
<b>Ar</b>	aromatski
<b>Arg</b>	arginin
<b>Asn</b>	asparagin
<b>ATP</b>	adenozintrifosfat
<b>Boc<sub>2</sub>O</b>	di- <i>terc</i> -butil dikarbonat
<b>BOP</b>	benzotriazol-1-il-oksi-tris-(dimetilamino)-fosfonijev heksafluorofosfat
<b>Ca(OTf)<sub>2</sub></b>	kalcijev trifluorometansulfonat-Ca(CF <sub>3</sub> SO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
<b>CbzCl</b>	benzil kloroformat
<b>CDCl<sub>3</sub></b>	devterirani kloroform (topilo pri NMR)
<b>COSY</b>	korelacijska spektroskopija
<b>C55-PP</b>	undakaprenil fosfat
<b>d</b>	dublet (signal pri NMR)
<b>dd</b>	dublet dubleta (signal pri NMR)
<b>ddt</b>	dublet dublet tripleta (signal pri NMR)
<b>DCC</b>	<i>N,N'</i> -dicikloheksilkarbodiimid
<b>Ddl</b>	ligaza D-alanil-D-alanin
<b>δ</b>	kemijski premik
<b>DMAP</b>	4-dimetilaminopiridin
<b>DMF</b>	<i>N,N</i> -dimetilformamid
<b>DMSO-</b>	devterirani dimetilsulfoksid (topilo pri NMR)
<b><i>d</i><sub>6</sub></b>	
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>Ec</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
<b>ESI-MS</b>	masna spektrometrija z elektrorazpršilno ionizacijo (electrospray ionisation)

<b>FAD</b>	flavin adenin dinukleotid
<b>G<sup>-</sup></b>	po Gramu negativne (bakterije)
<b>G<sup>+</sup></b>	po Gramu pozitivne (bakterije)
<b>GlmM</b>	fosfoglukozamin mutaza
<b>GlmS</b>	glukozamin-6-fosfat sintaza
<b>GlmU</b>	glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza in <i>N</i> -acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferaza
<b>Glu</b>	glutaminska kislina
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> -acetilglukozamin
<b>GTP</b>	gvanidin trifosfat
<b>HEA</b>	hidroksietilamin/ski
<b>HOBt</b>	hidroksibenzotriazol
<b>HMPA</b>	heksametilfosforamid
<b>HPLC</b>	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
<b>HRMS</b>	masna spektrometrija visoke ločljivosti (high resolution mass spectrometry)
<b>Hz</b>	Hertz
<b>IC<sub>50</sub></b>	srednja inhibitorna koncentracija (angl. median inhibition concentration)
<b>Ile</b>	izolevcin
<b>IUPAC</b>	ime določeno po predpisanem sistemu Mednarodne zveze za čisto in uporabno
<b>ime</b>	kemijo
<b><i>J</i></b>	sklopitvena konstanta
<b>Lac</b>	laktat
<b>Leu</b>	levcin
<b>Lys</b>	lizin
<b>m</b>	multiplet (signal pri NMR)
<b>M</b>	molarost (mol/L)
<b>MF</b>	mobilna faza
<b><i>m</i>-CPBA</b>	<i>meta</i> -kloroperoksibenzojska kislina
<b><i>m</i>-CBA</b>	<i>meta</i> -klorobenzojska kislina
<b>mDAP</b>	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
<b>MDR</b>	multi-drug resistance (rezistenca na več učinkovin)
<b>MIC</b>	minimalna inhibitorna koncentracija
<b>MraY</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-pentapeptid fosfotransferaza

<b>MRSA</b>	methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> – sevi bakterije <i>Staphylococcus aureus</i> , ki so odporni (rezistentni) na meticilin
<b>MS</b>	masna spektrometrija
<b>MurA</b>	UDP- <i>N</i> -acetilglukozaminolpiruvil transferaza
<b>MurB</b>	UDP- <i>N</i> -acetilolpiruvilglukozamin reduktaza
<b>MurC</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat:L-Ala ligaza
<b>MurD</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-L-Ala:D-Glu ligaza
<b>MurE</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu:L-Lys ligaza
<b>MurF</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu- <i>mezo</i> -A <sub>2</sub> pm: D-Ala-D-Ala ligaza
<b>MurG</b>	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin- <i>N</i> -acetilmuramil-pentapeptid-pirofosforil-undekaprenol <i>N</i> -acetilglukozamin transferaza
<b>MurNAc</b>	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
<b>MW</b>	mikrovalovi
<b>NADPH</b>	oksidirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata
<b>NMR</b>	nuklearna magnetna resonanca
<b>PEP</b>	fosfoenolpiruvat
<b>Phe</b>	fenilalanin
<b>P<sub>i</sub></b>	anorganski fosfat
<b>Pro</b>	prolin
<b>RND</b>	angl. resistance nodulation cell division
<b>Rf</b>	retencijski faktor
<b>ROS</b>	reaktivne kisikove zvrsti
<b>rs</b>	razširjen singlet (signal pri NMR)
<b>Rt</b>	retencijski čas
<b>s</b>	singlet (signal pri NMR)
<b>Sa</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>SAR</b>	odnos med strukturo in delovanjem spojine (angl. structure-activity relationship)
<b>Sp</b>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>t</b>	triplet (signal pri NMR)
<b>td</b>	triplet dubleta (signal pri NMR)
<b>THF</b>	tetrahidrofuran

<b>Thr</b>	treonin
<b>TMS</b>	tetrametilsilan (standard pri NMR)
<b>TPK</b>	tankoplastna kromatografija
<b>UDP</b>	uridindifosfat
<b>Upp</b>	undekaprenil pirofosfat fosfataza
<b>q</b>	kvartet (signal pri NMR)

# 1 UVOD

Problem odpornosti mikroorganizmov na obstoječe protibakterijske učinkovine in s tem širjenje infekcij, ki so danes drugi najpogostejši vzrok smrti v svetovnem merilu, se v zadnjih letih pogloblja z nepredvidljivo hitrostjo in razsežnostjo. Kljub številnim raziskavam usmerjenim v področje iskanja in preučevanja novih tarč, napredujoči genomiki in reševanju visokih zmogljivosti, ki je vse bolj razširjeno pri iskanju novih spojin zadetkov, je razvoj novih protibakterijskih učinkovin počasen. Večina danes klinično uporabnih antibiotikov je bila odkrita v sredini prejšnjega stoletja (1940-1960), streptogramini in kinoloni so se začeli uporabljati leta 1962, in nato do leta 1996 (z izjemo monobaktamov odkritih v 80-ih - *aztreonam* je edini predstavnik tega razreda na tržišču), ko je bil odkrit prvi oksazolidinon *linezolid*, niso odkrili novega strukturno različnega razreda antibiotikov primerne za klinično uporabo. Danes je razvoj usmerjen tako v iskanje ogrodij naravnega izvora (lipopeptidi (*daptomicin*), mutilini (*reptamulin*)), kot novih sintetičnih učinkovin (druga generacija oksazolidinonov-*tedizolid* je dobil dovoljenje za promet junija 2014, *radezolid* je v 3. fazi kliničnih testiranj). Večina do sedaj uporabljenih antibiotikov izhaja iz majhne zbirke molekularnih ogrodij, katerih funkcionalne življenjske dobe so bile podaljšane s sintetičnimi modifikacijami. Vendar vse bolj vidno naraščujoča rezistenca zadnjih generacij patogenov proti številnim antibiotikom nam je lahko v opozorilo, da bi odkrivanje novih ogrodij in načrtovanje učinkovin z novimi mehanizmi delovanja morala biti prioriteta. Težko je poiskati tarčo, ki bi bila nujna za preživetje bakterij in bila hkrati visoko ohranjena med različnimi bakterijskimi vrstami, pri ljudeh pa odsotna, drugačna oziroma neesencialna. Učinkovina naj bi z delovanjem na ciljano tarčo zavrla celovito celično aktivnost in imela nizko podvrženost za pojav rezistence. Osnovna struktura mora dovoljevati strukturne spremembe, ki bi optimizirale njeno jakost, učinkovitost in varnost. Raznolikost bakterijskih organizmov je velika, zato karakteristik ne moremo povsem poenotiti, vendar pa ostaja eden izmed ključnih za učinkovitost pomembnih parametrov zmožnost prehoda čez bakterijsko steno (1-6).

## 1.1 Zgradba bakterijske celične stene

Celično steno po **Gramu pozitivnih ( $G^+$ ) bakterij** sestavlja do 40 plasti peptidoglikana, kar obsega približno 50 % mase celične stene. Prepustnost za raztopljene snovi je dobra, tudi za molekule večje od 70000 g/mol. Za delovanje bakterijskih encimov je pomembna optimalna koncentracija ionov, predvsem  $Mg^{2+}$ , ki se uravnava preko ionsko izmenjevalnega sistema, sestavljenega iz številnih anionskih polimerov v celični steni. Tehojska kislina, vodotopen polimer glicerol ali ribitol fosfata, ovija peptidoglikan in tako tvori najbolj zunanjo plast celične stene. Na peptidoglikan je lahko vezana kovalentno ali pa se veže na plazemsko membrano - lipotehojska kislina.  $G^+$  bakterijam omogoči pritrjevanje na gostiteljske celice in predstavlja močan antigen za človeška potitelesa. Teihuronska kislina je anionski polimer s heksuronskimi kislinami. Med plasti peptidoglikana so vsidrani proteini; lipopolisaharidi in lipoproteini za  $G^+$  bakterije niso značilni (7).

Celična stena po **Gramu negativnih ( $G^-$ ) bakterij** vsebuje le eno do dve plasti peptidoglika (5-10 % mase celične stene). Vendar imajo  $G^-$  bakterije poleg notranje membrane in peptidoglikana še dodatno oviro, to je zunanja membrana, asimetrični lipidni dvosloj, ki služi kot nepermeabilna bariera za majhne molekule. Sestavljajo jo fosfolipidi, termostabilni lipopolisaharidi vezani na membrano (endotoksini) in proteini. Glavno vstopno pot tako predstavljajo porini, cilindrično oblikovane odprtine v zunanji membrani. Da molekula lahko vstopi skozi te hidrofilne kanale, se mora odstraniti hidratacijska sfera polarnih aminokislin, ki začitujejo notranjost kanala in se začasno nadomestiti z molekulo zdravilne učinkovine. Potrebna aktivacijska energija za zelo lipofilne molekule, da preidejo ta kanal, je previsoka in tem spojinam je posledično preprečen dostop do tarčnih mest v periplazemskem prostoru ali v citoplazmi. Za prehod skozi porine tudi za hidrofilne nenabite molekule ostajajo omejitve glede molekulske mase, z zgornjo mejo 600 g/mol. K višji odpornosti  $G^-$  bakterij pripomorejo še različne družine efluks črpalk, še posebej nekatere iz naddružine RND (»resistance-nodulation cell division«), ki oblikujejo tridelne transportne komplekse kot AcrAB-TolC (*E. coli*) ali MexAB-OprM (*P. aeruginosa*). Za te črpalke je bilo dokazano, da imajo veliko substratno specifičnost in pogosto prispevajo k multipli rezistenci na zdravilne učinkovine (7, 8).

## ***1.2 Odpornost bakterij***

Rezistenco na antibiotike lahko bakterije pridobijo preko intrinzičnih (naravnih) ali pridobljenih mehanizmov. Intrinzični mehanizmi so prisotni že pred vzpostavitvijo učinkovini, kot so AmpC  $\beta$ -laktamaze  $G^-$  bakterij in veliko MDR efluks sistemov. Pridobljena bakterijska odpornost vključuje mutacije v genih (kromosomskih ali plazmidnih), ki kodirajo tarče ciljane z antibiotiki in prenos determinant rezistence na druge organizme preko plazmidov, bakteriofagov, transpozonov in drugih mobilnih genetskih elementov. V splošnem je izmenjava opravljena skozi proces transdukcije (preko bakteriofagov), konjugacije (preko plazmidov in konjugativnih transpozonov) ali transformacije (preko inkorporacije proste DNA v kromosom). Kljub temu, da je pogostejši prenos med organizmi znotraj istega rodu, lahko ta proces opazujemo tudi med različnimi rodovi, vključno s prenosom med evolucijsko oddaljenimi organizmi kot so  $G^+$  in  $G^-$  bakterije. Posledice rezistence vključujejo neuspeh prenos učinkovine v celico in neuspeh obstanek le-te v celici (posledice aktivnih efluksov), uničenje učinkovine z obrambnimi mehanizmi, alteracije v celični tarči zdravila (ribosom, metabolični encimi, proteini vpleteni v DNA replikacijo ali sintezo celične stene) in s tem nezmožnost zdravila, da zavre vitalno funkcijo v celici (7-9). Nekatere bakterije, ki najpogosteje povzročajo infekcije in njihovi mehanizmi odpornosti so prikazani v Preglednici I.

K vse večjem številu MDR organizmov doprinese tudi razširjena in nepravilna raba antibiotikov; nedokončano zdravljenje, slaba compliance bolnikov ali zmanjšana oziroma omejena dostopnost antibiotikov do določenih tkiv (kosti ali cerebrospinalne tekočine), saj subletalne doze bakteriocidnih antibiotikov s stimuliranjem produkcije ROS inducirajo mutagenozo, kar se odrazi v heterogenem porastu minimalne inhibitorne koncentracije (MIC) za razpon antibiotikov, neodvisno od tarče učinkovine. Ti efekti lahko vodijo tudi do mutiranih vrst, ki so lahko občutljive na aplicirani antibiotik, vendar rezistentne na druge antibiotike (10).



**Preglednica I: Prikaz pogosto odpornih bakterij in mehanizmov odpornosti; povzeto po (1,2)**

Bakterija	Antibiotik	Mehanizem odpornosti	Genetski mehanizem odpornosti
<i>Staphylococcus aureus</i>	penicilin, betalaktamski antibiotiki –meticilin (MRSA), vankomicin	encimska razgradnja, sprememba tarčne beljakovine	plazmid, pridobitev mobilnega genetskega elementa SCCmec
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	penicilin	sprememba tarčne beljakovine	kromosomska sprememba
<i>Enterococcus faecium</i>	vankomicin	sprememba tarčne beljakovine	plazmidi, transpozoni
<i>Enterokoki</i>	aminoglikozidi	razgradnja aminoglikozidov	plazmidi
<i>Escherichia coli</i>	različni betalaktamski antibiotiki, 3. gen. cefalosporinov, fluorokinolini	ampC betalaktamaze	kromosomska sprememba, indukcija, plazmidi
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	penicilini, tetraciklini, fluorokinoloni	sprememba tarčne beljakovine	kromosomske spremembe
<i>Enterobacteriaceae</i>	cefalosporini	betalaktamaze	kromosomske spremembe, plazmidi
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	karbapenemi, fluorokinoloni, aminoglikozidi	spremembe porinskih kanalov in črpalk za odstranjevanje zdravil	mutacije

### 1.3 Biosinteza peptidoglikana

Bakterijski peptidoglikan je eno izmed pomembnejših tarčih mest, saj z zaviranjem njegove biosinteze povzročimo lizo celic in s tem bakterijsko smrt. Njegova biosinteza je kompleksen proces mnogih encimskih reakcij v citoplazmi (sinteza nukleotidnih prekursorjev), na notranji strani (sinteza na lipid vezanih intermediatov) in zunanji strani (reakcije polimerizacije) citoplazemske membrane (11).

#### Citoplazemske reakcije obsegajo:

- tvorbo UDP-GlcNAc iz fruktoza-6-fosfata
- tvorbo UDP-MurNAc iz UDP-GlcNAc
- izgradnjo peptidne verige, kar vodi do UDP-MurNAc-pentapeptida
- stranski sintezni poti D-glutaminske kisline in dipeptida D-Ala-D-Ala

Za sintezo UDP-GlcNAc iz fruktoza-6-fosfata so potrebni štirje uspešno delujoči encimi: glukozamin-6-fosfat sintaza (GlmS), fosfoglukozamin mutaza (GlmM), glukozamin-1-fosfat aciltransferaza in *N*-acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferaza (GlmU bifunkcionalen encim). Sledi še 11 korakov (11, 12):

***Korak 1:*** fosfoenolpiruvat se veže na hidroksilno skupino ogljika 3 glukozaminskega obroča, da nastane enolpiruvat-UDP-*N*-acetilglukozamin. Reakcija je katalizirana z UDP-*N*-acetilglukozamin enolpiruviltransferazo (MurA).

***Korak 2:*** enolpiruvatna struktura je ob prisotnosti encima flavoprotein UDP-*N*-acetilpiruvil-glukozamin reduktaze (MurB) reducirana do laktilne skupine z NADPH, produkt je UDP-*N*-acetilmuraminska kislina (UDPMurNAc).

***Koraki 3-6:*** sledi zaporedna adicija petih aminokislin, ki tvorijo polipeptidno verigo na UDPMurNAc. Reakcije tvorbe amidnih vezi katalizirajo od ATP odvisne ligaze MurC, D, E in F. Običajno je zaporedje aminokislin sledeče: L-Ala, D-Glu, *meso*-DAP, D-Ala in D-Ala pri G<sup>-</sup> bakterijah, mikobakterijah, bacilih in večini ciano bakterij, pri G<sup>+</sup> bakterijah pa je namesto *m*-DAP na tretji poziciji običajno L-lizin.

Nadaljni koraki se zgodijo **na membrani** (11, 12):

***Korak 7:*** UDPMurNAc-pentapeptid se pritrdi na membransko vezano lipidno prenašalno molekulo in z vezavo nastane struktura, ki jo imenujemo lipid I. Prenášalna molekula je undekaprenil fosfat, struktura iz 55 C-atomov, ki jo sestavlja 11 izoprenoidnih enot. Vezavo katalizira membranski encim *MraY*.

***Korak 8:*** glikoziltransferaza *MurG* prenese *N*-acetilglukozamin (GlcNAc) na lipid I in tako tvori 1,4- $\beta$  disaharidno strukturo. GlcNAc-MurNAc-pentapeptid (lipid II) predstavlja osnovno monomerno enoto končnega heteropolimera peptidoglikana. Sledi translokacija lipida II skozi membrano in naslednji trije koraki v **periplazmi**:

***Korak 9:*** lipid II se vgradi v rastoči sloj peptidoglikana, tako da se oblikujejo glikozidne vezi med disaharidnimi enotami (transglikozilacija).

***Korak 10:*** sledi premreženje (transpeptidacija) peptidnih repov in odstranitev od lipidnega prenašalca, katalizirana s penicilin-vezavnimi proteini. Pri G<sup>-</sup> bakterijah so polipeptidni repi GlcNAc-MurNAc-pentapeptidnih molekul povezani neposredno preko C-terminalnega alaninskega ostanka ene molekule z  $\epsilon$ -amino skupino *mDAP* druge molekule. Pri nekaterih G<sup>+</sup> bakterijah (*Staphylococcus aureus*) pa se na L-lizinski ostanek na mestu 3

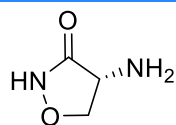
pentapeptida doda še pet glicinskih ostankov, kar katalizirajo tri homologne neribosomske glicinil-tRNA peptidiltransferaze (femX, femA, femB). Ti glicinski ostanki tvorijo most z alaninskim ostankom na poziciji 4 sosednjega GlcNAc-MurNAc-pentapeptida (terminalni alaninski ostanek se med premreženjem odstrani). Pri nekaterih drugih  $G^+$  bakterijah se lahko peptidni most oblikuje z ostanki kot so serin, treonin, aspartamska kislina, lizin ali ornitin. Tetrapeptidnih verig, ki sodelujejo v prečnih povezavah, je pri  $G^+$  bakterijah mnogo več (20 % pri  $G^-$  in več kot 90 % pri  $G^+$ ), zato je peptidoglikan  $G^+$  bakterij posledično gostejši.

**Korak 11:** undakaprenilfosfat se regenerira s specifičnim lipidnim pirofosforilaznim encimom, Upp (11, 12).

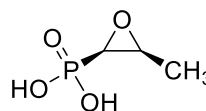
**Preglednica II: protibakterijske učinkovine, ki prekinejo določene korake sinteze peptidoglikana (12, 13)**

<b>cikloserin</b>	inhibira alanin racemazo in D-Ala-D-Ala ligazo
<b>fosfomicin</b>	fosfoenolpiruvatni analog, ki se kovalentno veže na aktivno stran cisteinskega ostanka encima in inhibira MurA
bacitracin	oblikuje tesen kompleks z undekaprenilpirofosfatom in prepreči regeneracijo te prenašane molekule
vankomicin	moti vgraditev GlcNAcMurNAc-pentapeptida v rastočo plast PG, tako da se tesno veže na D-Ala-D-Ala konec peptidnega repa.
beta-laktamski antibiotiki (penicilin)	inhibirajo premreženje polipeptidnih verig

Le dve zdravilni učinkovini, cikloserin in fosfomicin, ki sta trenutno v uporabi, delujeta pri korakih izgradnje citoplazemskega prekursorja (12, 13). Danes zato predstavljajo eno izmed pomembnejših in zanimivih raziskovanih tarčnih mest ligaze Mur.

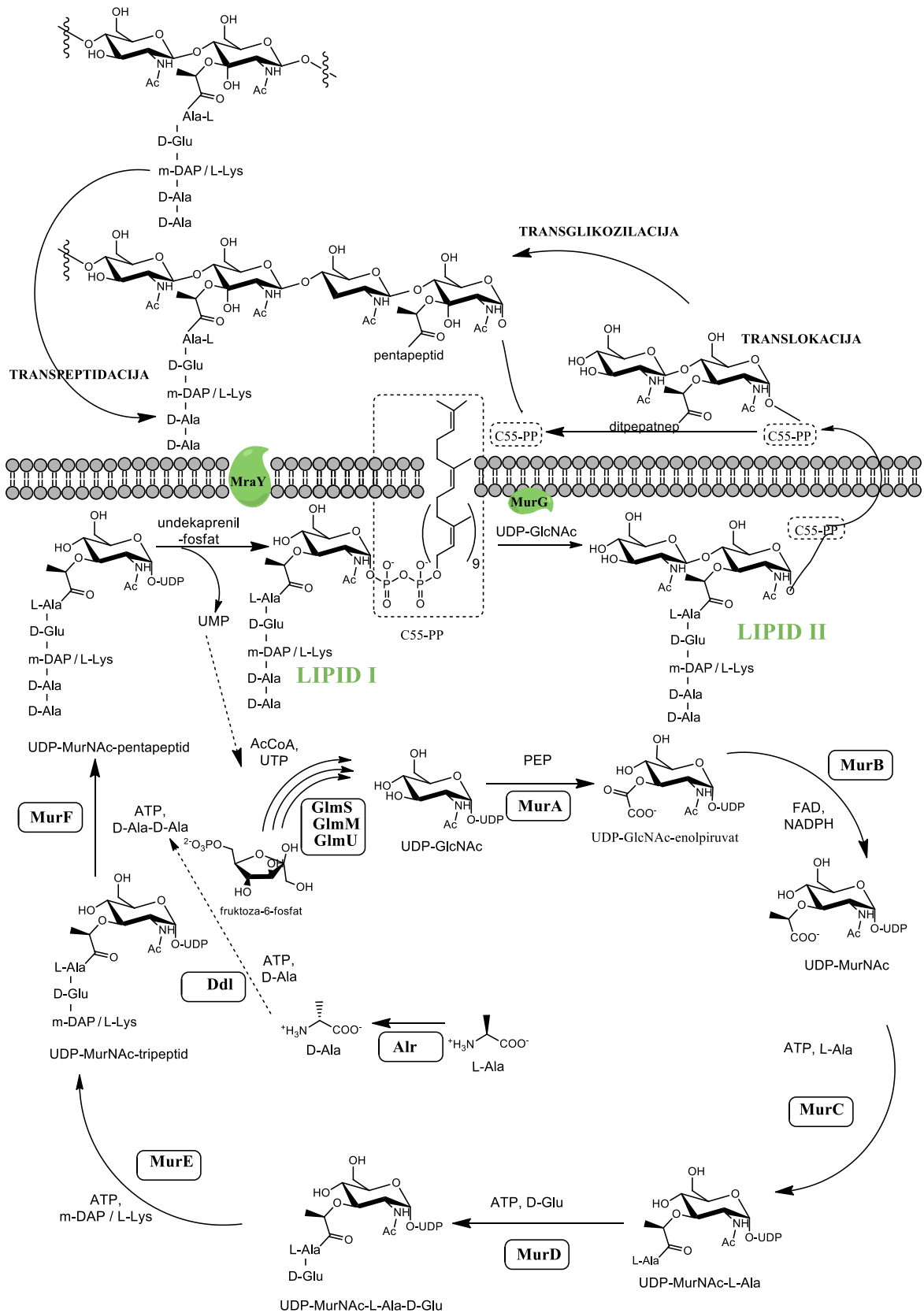


**cikloserin**



**fosfomicin**

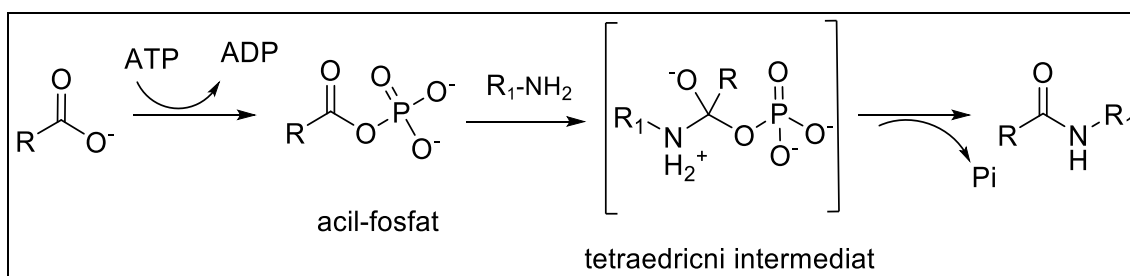
**Slika 1: Strukturi zdravilnih učinkovin, ki zavirata biosintezo peptidoglikana**



Slika 2: Shematski prikaz biosinteze peptidoglikana

## 1.4 Ligaze Mur

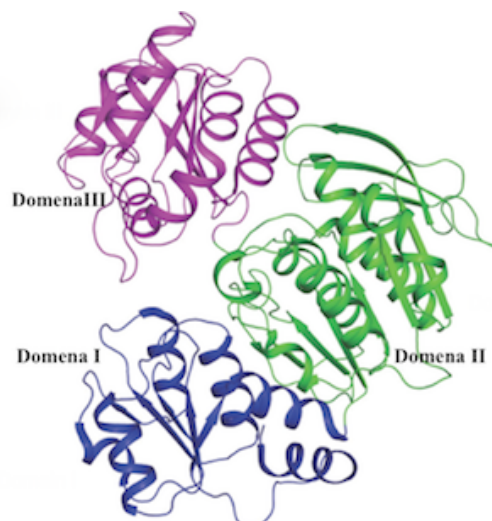
Ligaze MurC-F so od ATP odvisni encimi, nujno potrebni za preživetje tako po  $G^+$  kot po  $G^-$  bakterij. Pomembni so v osrednjem delu sintezne poti peptidoglikana, v citoplazmi, kjer katalizirajo štiri zaporedne reakcije nastanka končnega citoplazemskega prekursorja UDP-*N*-acetilmuramil-pentapeptida (Parkovega nukleotida). Le-ta se nato prenese na membranski lipidni prenašalec in nadalje tvori disaharid-pentapeptid, ki se po translokaciji kot osnovni gradnik vgradi v rastočo plast peptidoglikana. Ta kompleksen heteropolimer sestoji iz linearnih glikanskih verig izmenjujočih se sladkornih enot *N*-acetylglukozamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc), med seboj spojenih z 1,4- $\beta$  glikozidnimi vezmi ter prečno premreženih z verigami pentapeptidov. Rigidna tridimenzionalna struktura obdaja celotno celico in omogoča trdnost celične stene bakterij ter tako nasprotuje visokemu osmotskem tlaku v celicah, vendar hkrati nudi celicam tudi zadostno fleksibilnost, ki omogoča baterijam celično rast in delitev (11, 13-16). Podobnost kemijske strukture peptidoglikana med posameznimi bakterijskimi vrstami in encimov, ki sodelujejo pri njegovi sintezi, omogoči, da s ciljno inhibicijo korakov te večstopenjske sintezne poti delujemo bakteriocidno na širok spekter bakterij. Pomembna lastnost, s katero lahko zagotovimo specifičnost, je, da encimi, ki sodelujejo pri sintezi bakterijske stene, pri ljudeh niso prisotni. Encimi Mur so bili proučevani skozi številne biokemijske eksperimente, analize sekvenciranja, usmerjeno mutagenozo in X-ray določitve struktur. Kljub temu, da so strukturno edinstveni in tako vsak zase najučinkovitejši za vezavo specifičnega substrata, si delijo enak reakcijski - kemični in kinetični - mehanizem, podobno tridimenzionalno strukturo, v njihovem aktivnem mestu pa je mnogo ohranjenih aminokislinskih ostankov (1, 8). Katalizirajo tvorbo amidne vezi med karboksilno skupino UDP-substrata in amino skupino vstopajajoče aminokisline ali dipeptida, s sočasno formacijo ADP in  $P_i$  iz ATP. Divalentni kation,  $Mg^{2+}$  ali  $Mn^{2+}$  je esencialen za reakcijo. Začetni korak je vezava ATP in nato še UDP-substrata na prosti encim. Aktivacija karboksilne skupine UDP-prekursorja z ATP generira acilfosfatni intermediat in ADP; sledi nukleofilni napad amino skupine aminokisline (dipeptida v primeru encima MurF) na acilfosfat ( $S_n2$ ). To vodi do formacije visokoenergetskega tetraedričnega intermediata, ki na koncu razpade na nov UDP-prekursor, podaljšan za aminokislino, ter disociiran prosti anorganski fosfat (11, 15, 16).



Slika 3: Strukturni prikaz mehanizma delovanja Mur encimov; povzeto po (16)

Druga skupna lastnost encimov je serija šestih nespremenjenih aminokislinskih ostankov, poleg ATP-vezavne sekvence. To odkritje je vodilo k definiciji ligaz Mur kot nove družine encimov. Tudi trije encimi, ki niso povezani s sintezo peptidoglikana, pripadajo tej skupini: folilpoli-(gama-L-glutamat) sintaza FolC, C-terminalna regija cianoficin sintaze CphA in poli-gama-glutamat sintaze CapB Bacillov (11).

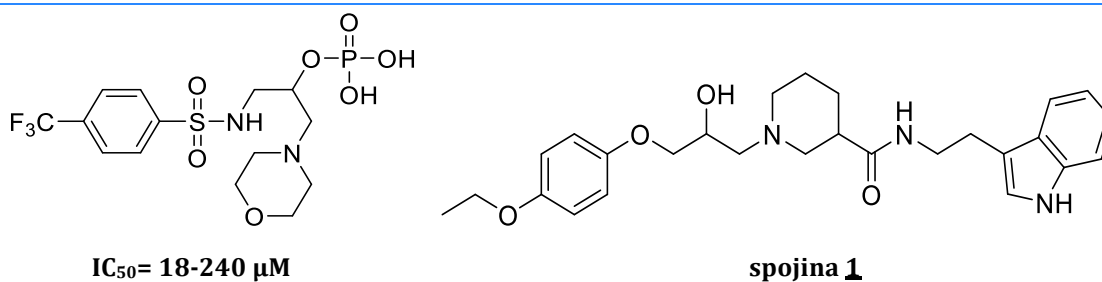
Tridimenzionalne strukture treh domen encimov so enake, kar so potrdili s kristalografskimi študijami. N-terminalna domena veže UDP-MurNAc substrat, centralna domena ATP in ima številne podobnosti z vezavnimi domenami številnih ATP-az in GTP-az, C-terminalna domena pa je odgovorna za vezavo prihajajoče aminokislina ali dipeptida. Kljub podobnosti z nekaterimi človeškimi od ATP odvisnimi encimi, so razlike v zgradbi dovolj velike, da lahko zagotovimo specifičnost delovanja na bakterijske celice. Medtem ko so topologije centralnih in C-terminalnih domen med ligazami Mur podobne, so opazne razlike v N-terminalni domeni, z MurC in MurD na eni strani ter MurE in MurF na drugi. Te razlike so posledica dolžine substrata (UDP-prekursorja), ki je na enem koncu identičen, na drugem pa drugačen za vsak encim, saj se spreminja z vsakim korakom sinteze, s tem ko se podaljša za aminokislinski ostanek. Raznolikost omogoči, da je terminalna karboksilatna skupina pozicionirana čim bližje ATP za aktivacijo. Encimi so dinamične tarče, saj obstajajo v zaprti in odprti konformaciji. Zaprtje konformacije (C-terminalna domena se rotira proti centralni in N-terminalni) je posledica vezave liganda (11, 12, 17).



Slika 4: Tridimenzionalna struktura MurC ligaze; povzeto po (18)

### MurC (UDP-*N*-acetilmuramat:L-Ala ligaza)

Encim MurC katalizira reakcijo pripajanja prve aminokislina na laktilno skupino UDP-MurNAc. Za večino bakterijskih vrst je to L-alanin, v redkih primerih se doda glicin (*Mycobacterium leprae*) ali L-serin. Stereospecifičnost substrata je strogo določena, D-Ala ni substrat. Aktivna stran encima MurC leži na stiku treh strukturnih domen in sestoji iz specifičnih vezavnih žepkov za tri substrate UDPMurNAc, ATP-Mg, in L-Ala, ki so razporejeni okrog katalitičnega centra. ATP se veže prvi, UDP-MurNAc drugi in L-Ala tretji. Reakcija je reverzibilna, zamenjava smeri je odvisna od količine fosfata in ADP (11). Do sedaj znani zaviralci encima MurC so fosfonati, fosfinati, 3,5-dioksopirazolidinski derivati, benzofuran acil-sulfonamidni derivati, benziliden rodanini, *N*-benziliden sulfonohidrazini, kinoksalin (Pfizer), vendar signifikantne protipakterijske učinkovitosti niso pokazali (18, 19). Fosforilirani hidroksietilaminski (HEA) derivati so se izkazali kot precej močnejši zaviralci MurC-F, z  $IC_{50}$  vrednostmi v mikromolarnem območju, a so fosfatne skupine na HEA strukturi zelo polarne, kar onemogoči njihovo uporabo kot zdravilne učinkovine. Najmočnejši zaviralec encima MurC je bila spojina z  $IC_{50} = 200 \mu\text{M}$  in elektrondonorsko triflourometilno skupino na *para* poziciji fenilnega obroča, nefosforilirani HEA derivati pa ligaz Mur niso signifikantno zavirali (manj kot 25 % pri  $500 \mu\text{M}$ ) (15). Na Fakulteti za farmacijo je bila nedavno z rešetanjem knjižnjice spojin odkrita spojina **1**, ki je za 48 % zavrla delovanje encima MurC.



Slika 5: Fosfatni HEA zaviralec encimov MurC-F kot analog prehodnega stanja levo (15) in nefosfatni HEA analog desno

### MurD (UDP-*N*-acetilmuramil-L-Ala:D-Glu ligaza)

MurD katalizira tvorbo amidne vezi med drugo zaporedno aminokislino, ki je za večino bakterijskih vrst D-glutaminska kislina, in UDP-MurNAc-L-Ala. Ker ima MurD zelo visoko specifičnost za D-aminokislinski substrat, je identificiran kot ena izmed najbolj obetavnih tarč za odkrivanje selektivnih protibakterijskih učinkovin. Od drugih treh ligaz

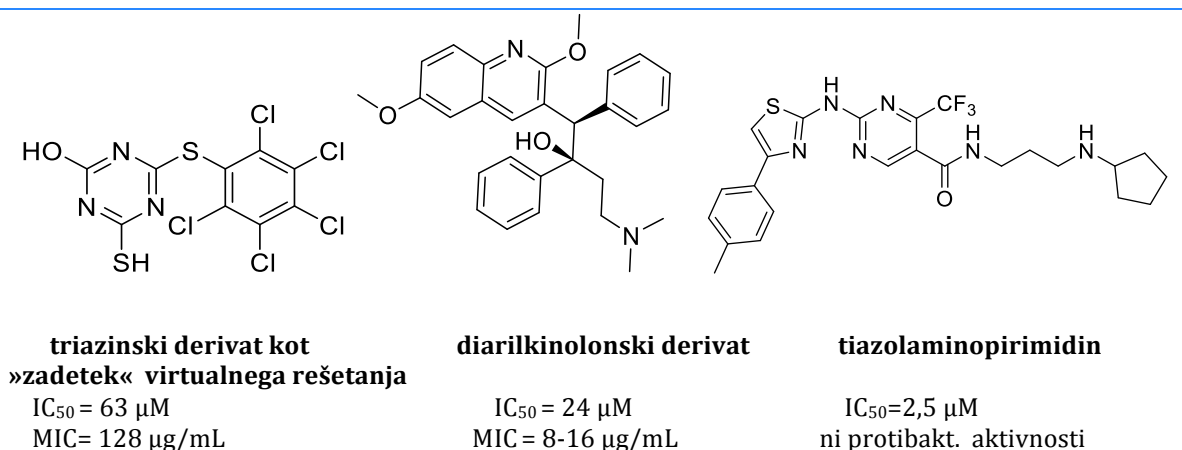
se razlikuje po nizki specifičnosti za UDP-prekurzor; medtem ko je UMP struktura ključna za vse tri ostale ligaze, je 1-fosfo-MurNAc-L-Ala substrat za MurD. Reakcija je reverzibilna, a v nasprotju z MurC zamenjava smeri ni ADP-odvisna. MurD je zmožen sproducirati adenozin tetrafosfat, ki izhaja iz reakcije acilfosfatnega intermedata z ATP. Vsebuje dva magnezijeva iona, klasičnega, ki sodeluje pri vezavi ATP in drugega, ki je vpleten v stabilizacijo acilfosfatnega intermedata. Slednji je koordiniran z dvema molekulama vode, ki sta z vodikovima vezema vezani na karbamoiliran lizinski ostanek, prisoten tudi pri MurE in MurF (11, 17). Poznani so peptidni in nepeptidni zaviralci encima MurD. Nepeptidne lahko po kemizmu razdelimo na derivate glutaminske kisline (fosfinati, sulfnamidi), 5-benzilidentiazolidin-2,4-dione in 5-benzilidenrodanine (17, 20). V letu 2014 so z računalniškim pristopom simulacije z metodo molekulske dinamike z načrtovanjem na podlagi strukture tarče in sledečim virtualnim rešetanjem odkrili derivate benzen-1,3-dikarboksilne kisline z 2,5-dimetilpirolno strukturo in multiplim zaviralnim delovanjem na encimih MurC-F (21).

#### **MurF (UDP-*N*-acetilmuramil-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*mezo*-A<sub>2</sub>pm/L-Lys:D-Ala-D-Ala ligaza)**

Ligaza MurF katalizira tvorbo amidne vezi med UDP-MurNAc-tripeptidom in dipeptidom D-Ala-D-Ala, zadnjima aminokislinskima ostanekoma v verigi. D-Ala-D-Ala je najobičajnejši substrat, z nekaterimi izjemami D-Ala-D-Ser in D-Ala-D-Lac, najdenih pri na vankomicin odpornih sevih *E. coli* in sintetiziranih z Van ligazama. MurF potrebuje substrate D-amino, vendar sprejema širši nabor substratov kot druge Mur ligaze. V peptidoglikan vgrajuje tudi netipične D-aminokisline, kot je D-metionin. Te se producirajo kot odgovor na okoljski stres (vstop v stacionarno fazo) in s tem preoblikujejo kompozicijo ter strukturo peptidoglikana. Obe obliki UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu (A<sub>2</sub>pm/L-Lys) sta enako učinkoviti kot substrata encima, opažena je bila močna povratna inhibicija s strani prebitnega UDP-MurNAc-tripeptida. Na očiščenem encimu so dokazali, da ima MurF visoko stopnjo specifičnosti za C-terminalno aminokislino, kar je komplementarno specifičnosti D-Ala:D-Ala ligaze (Ddl), ki deluje večinoma na N-terminalni aminokislini. To sestavlja mehanizem »dvojnega sita«, ki zagotovi, da se sinteza UDP-NAc-pentapeptida konča v glavnem z D-Ala-D-Ala. Peptidna vez med alaninoma je kasneje vir energije za reakcijo premreženja glikanskih verig v periplazmatskem prostoru, kjer ni ATP-ja (11, 22). Prvi zaviralci MurF so bili pseudotripeptidi in pseudotetrapeptidi aminoalkilfosforne kisline, kot poenostavljeni analogi prehodnega stanja. Abbott-ovi



laboratoriji so s tehnologijo afinitetnega virtualnega reševanja odkrili sulfonamidni spojini vodnici, kasneje ko-kristalizirani z encimom MurF<sub>Sp</sub>. Poznavanje ključnih interakcij z vezavnim mestom encima je pripomoglo k racionalnejšemu in usmerjenemu načrtovanju novih strukturno podobnih potencialnih zaviralcev. Nekateri najnovejši v mikromolarnih koncentracijah inhibirajo MurF<sub>Ec</sub> in MurF<sub>Sa</sub>, MurF<sub>Sp</sub> pa v nanomolarnih. Johnson & Johnson-ovi laboratoriji so odkrili tiazolilaminopiridine, 8-hidroksikinoline in diarilkinolone. Serije 8-hidroksikinolonov so se izkazale kot inhibitorne učinkovine za MurF<sub>Ec</sub> in kasneje postale farmakofori za identifikacijo novih zaviralcev brez kelatorskih lastnosti. Strukturno različna razreda zaviralcev, 4-fenilpiperidinski derivati (IC<sub>50</sub>= 26 μM) in diarilkinoloni (IC<sub>50</sub>= 24-30 μM), sta pokazala inhibicijo MurF<sub>Ec</sub>, vendar razen redkih izjem (Slika 5) protibakterijskega učinka niso dosegli (13, 19, 24, 25). Z virtualnim reševanjem na podlagi strukture liganda je bil nedavno odkrit triazinski derivat (23).



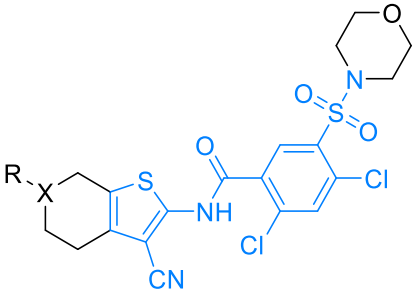
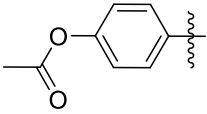
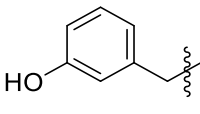
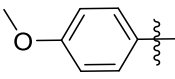
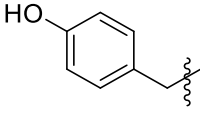
Slika 6: Strukturne formule predstavnikov MurF zaviralcev; povzeto po (13, 23, 24)

### SAR in razvoj cianotiofenskih MurF zaviralcev

Osnovni in za dobro zaviralno delovanje pomemben skelet vključuje 2-aminotiofen-3-karbonitrilni fragment, ki je z amidno vezjo povezan s 5-sulfamoil-2-klorobenzojsko kislino (13, 26). Odsotnost ciano skupine vodi do popolne izgube aktivnosti. Amidni povezovalci v centru molekule je nujen za delovanje. Klorov atom na *orto* mestu glede na amid je pomemben za tvorbo H-vezi z vezavnim mestom, njegova nadomestitev z amino ali alkoksilno skupino vodi do neaktivnih analogov, ne glede na velikost substituenta (13, 14). Izguba aktivnosti ob odstranitvi je verjetno tudi posledica spremembe konformacije, saj klorov atom prisili fenilni obroč v ne-koplanarno lego glede na amidni povezovalci.

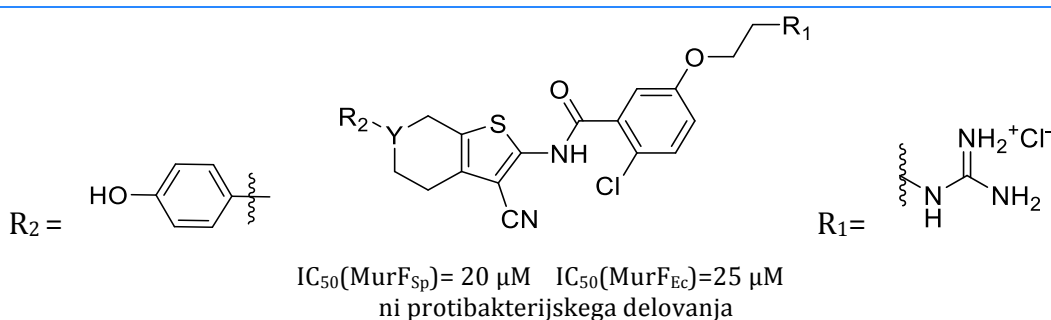
Atom halogena na orto mestu od sulfonamida izboljša zaviralno delovanje. Rezultati SAR študije (13) so pokazali, da največje povečanje zaviralnega delovanja dosežemo s pripetjem arilne skupine na šesto pozicijo 4,5,6,7-tetrahidrobenzo[b]tiofenskega obroča, kar vodi od 14 x (fenilna skupina) do 45 x (hidroksifenil) izboljšane delovanja. 4,5,6,7-tetrahidrobenzo obroč ni esencialen za biološko aktivnost in ga lahko nadomestimo z drugimi obroči (4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-c]piridinskim), kar dovoljuje hitrejše uvajanje *N*-fenila, -benzila ali alkilnih substituentov na pozicijo 6. Do sedaj je znano, da spojine z elektron akceptorskimi skupinami na *para* ali *meta* mestu benzilnega obroča nekoliko zmanjšajo zaviralno delovanje MurF<sub>Sp</sub>, medtem ko elektron donorske skupine izboljšajo inhibicijo za več kot 3x. Para substitucija na benzilnem obroču se je izkazala za bolj zaželjena kot *meta*, vendar je spojina z OH skupino na *meta* mestu kazala zaviralno delovanje tudi na MurF<sub>Ec</sub> in MurF<sub>Sa</sub>. Ta spojina je kazala tudi najboljše protibakterijsko delovanje na MurF<sub>Sp</sub> (MIC=16 µM/mL), kar jo uvrsti med enega najboljših do sedaj znanih MurF<sub>Sp</sub> zaviralcev (spojina **2**). Učinkovine z dvema substituentoma so kazale nižje zaviralno delovanje kot sam fenilni substituent, z izjemo spojine z OH skupinama na *meta* in *para* mestu (13).

**Preglednica III: Prikaz cianotiofenskega skeleta ter zaviralcev MurF z največjo jakostjo (13)**

	
X= C	X= N
 <p>IC<sub>50</sub>= 0,12 µM ni protibakterijskega delovanja</p>	 <p>IC<sub>50</sub>= 0,42 µM (MurF<sub>Sp</sub>) MIC= 16 µg/mL <b>spojina 2</b></p>
 <p>IC<sub>50</sub>= 0,17 µM ni protibakterijskega delovanja</p>	 <p>IC<sub>50</sub>= 0,18 µM (MurF<sub>Sp</sub>) MIC &gt; 128 µg /mL</p>

Kljub zelo dobrim zaviralnim lastnostim pa je osnovni problem omenjenih struktur velika molekulska masa in visoka lipofilnost ( $\log P = 2,82-3,40$ ) ter posledično slaba topnost v vodi, kar omejuje njihovo zmožnost uporabe kot zdravilnih učinkovin. Da bi povečali hidrofilnost in tako optimizirali fizikalnokemijske lastnosti, so pri spojinah druge generacije, v letu 2014, na osnovni skelet pripenjali različne alkilne ali arilne substituentne s polarnimi skupinami ( $R_1$ ) (14).

S kombinacijo lastnosti mikromolarnega zaviralca 1. generacije in spojine s podobno 3D strukturo, kjer je bil cikloheksenski obroč nadomeščen z ciklopentenskim, sulfamoilni fragment z 1-pirazolimetiloksi strukturo in klorovi atomi z vodikovimi, so prišli do osnovnega skeleta, ki je postal vodilo za razvoj druge generacije potencialnih zaviralcev. 4-kloropirazolski fragment so kasneje nadomestili različnimi alkilni in arilni substituenti (protoniran amin ali gvanidinska struktura) (14).

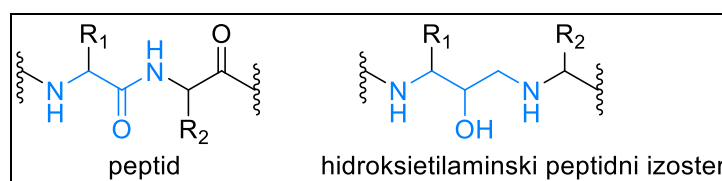


**Slika 7: Prikaz strukturne formule druge generacije cianotiofenskih zaviralcev; povzeto po (14)**

Najmočnejši zaviralec ima dobro uravnotežene zaviralne lastnosti proti obema ligazama MurF (Sp in Ec), kar prikazuje Slika 6. Vendar te spojine dosežejo del svojega protimikrobnega delovanja z uničenjem citoplazemske membrane (zmanjšanjem njene integritete), kar omejuje njihovo potencialno uporabo kot protibakterijskih učinkovin.

## 1. 5 Hidroksietilamini kot mimetiki prehodnega stanja

Vse kemijske reakcije morajo ob tvorbi produkta iz substrata preiti energetske bariero in ustvariti prehodno stanje ali aktiviran visokoenergetski kompleks. Katalitično mesto encima predstavlja dinamično elektronsko okolje, ki še poveča verjetnost tvorbe prehodnega stanja, saj so interakcije med encimom in intermedijatom v prehodnem stanju močnejše od interakcij encim-substrat in encim-produkt. Z analogi prehodnega stanja poskušamo z oponašanjem tetraedrične strukture intermedijata ustvariti še stabilnejše stanje (kompleks), kot je v primeru le-tega. Zaradi večje stabilnosti je za sprostitvev analoga potrebna energetske neugodna konformacijska sprememba encima, kar zagotovi počasno sproščanje zaviralca (27). Različne funkcionalne skupine lahko posnemajo prehodno stanje s svojo tetraedrično geometrijo ali pa distribucijo naboja, kar vodi do močnih zaviralcev. Veliko uporabljenih razredov učinkovin (fosfinati, statini, hidroksietileni, hidroksietilamini) je bilo razvitih na podlagi tega koncepta. Tudi pri številnih proteazah (encimih, ki cepijo peptidne vezi) encimska reakcija poteka preko tetraedričnega intermedijata. Veliko proteaznih zaviralcev je mimetikov prehodnega stanja, med njimi zaviralci renina, HIV proteaze, angiotenzin konvertaze, matriksne metaloproteaze in malarijske proteaze (15). HEA derivati so bili tudi že opisani kot zaviralci bakterijskih encimov D-alanin-D-alanin ligaze (DdlB) in D-alanin:D-laktat ligaze (VanA). Gre prav tako za ATP odvisne ligaze, ki kljub nekoliko drugačni tridimenzionalni strukturi, delujejo po enakem mehanizmu kot ligaze Mur (28). V zadnjem času pa so bili v literaturi predstavljeni tudi hidroksietilaminski zaviralci MurC-F encimov.



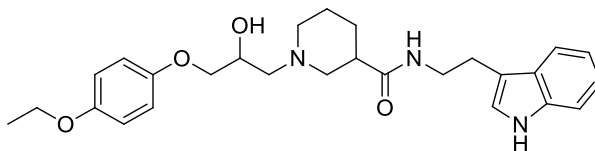
Slika 8: Hidroksietilaminska struktura kot mimetik peptidne vezi; povzeto po (15)

## 2 NAMEN DELA

Osrednji namen magistrske naloge bo sinteza in biološko vrednotenje novih potencialnih zaviralcev ligaz MurC, D in F. Naši cilji so sledeči:

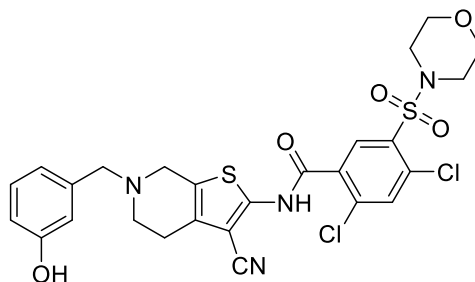
1. V prvem delu se bomo osredotočili na *sintezo novih derivatov hidroksietilaminov*. Optimizirati želimo zaviralno delovanje spojine **1** iz knjižnjice spojin Fakultete za farmacijo, ki je pri koncentraciji 500  $\mu\text{M}$  zmanjšala delovanje encima MurC za 48 % in encima MurD za 33 %.

Nove HEA derivate bomo sintetizirali preko reakcije odpiranja epoksidnega obroča z ustreznim aminom. Epoksidni intermediat bomo pripravili iz derivatov alilamina ali z uporabo epiklorhidrina, amski intermediat pa bo vključeval reakcije uvedbe zaščitne skupine na nipekotinsko kislino, tvorbo amidne vezi s triptaminom in odstranitev zaščitne skupine.



Slika 9: Spojina **1**

2. Drugi del magistrske naloge bo obsegal *petstopenjsko sintezo spojine s cianotiofenskim fragmentom*, s katero skušamo še izboljšati zaviralno delovanje na encimu MurF. Naše izhodišče bo spojina **2**, ki je kazala močno zaviralno delovanje proti MurF iz sevov Sp in Ec ter hkrati imela dokazano antibakterijsko delovanje.



Slika 10: Strukturna formula spojine **2** (11)

3. Sintetiziranim končnim spojinam bomo v sklopu magistrskega dela *določili jakost zaviralnega delovanja z izvedbo biokemičnega testiranja* na posameznih encimih MurC, D in F. Aktivnim spojinam bomo določili tudi  $IC_{50}$  vrednosti.

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 *Materiali*

Pri sinteznem delu smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev: Acros Organics, Carlo Erba reagents, Gram-mol, Maybridge, Merck, Panreac in Sigma-Aldrich (Aldrich, Fluka, Sigma). Brezvodna topila smo pripravili z destilacijo in sušenjem nad molekularnimi siti.

Uporabljeni reagenti so bili: piperidin-3-karboksilna kislina, Boc<sub>2</sub>O, DCC, DMAP, triptamin, trifluoroacetna kislina, CbzCl, Pd/C, HOBt, EDC, BOP, 4-metoksibenzen-1-sulfonil klorid, alilamin, *m*-CPBA, (CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Ca, NaH, 3,4-(metilendioksi) benzil alkohol, BuN<sup>+</sup>I<sup>-</sup>, eter-15-krona-5, epiklorhidrin, ClSO<sub>3</sub>H, 2,4-diklorobenzojska kislina, Et<sub>3</sub>N, 2-metoksietan-1-amin, oksalil klorid, Na(OAc)<sub>3</sub>BH, očetna kislina, 3-hidroksibenzaldehid, Biomol Green® (testiranje).

Topila, ki smo jih uporabljali pri sintezi in čiščenju: aceton, dietileter, dioksan, diklorometan, etilacetat, metanol, DMF, heksan, petroleter, THF, piridin, dikloroetan, prečiščena voda.

Ostala laboratorijska oprema: Laboratorijska tehnica Mettler toledo PB403-S, magnetno mešalo IKA RTC basic, rotavapor Buchi waterbath B-480, UV-svetilka Lamag cabinet II.

### 3.2 *Kromatografske metode*

**Tankoplastna kromatografija (TLC):** Uporabili smo plošče Merck DC Fertigplatten Kieselgel 60 GF<sub>254</sub> z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem in različne mobilne faze (navedene so pri vsaki spojini posebej). Za detekcijo in razločevanje med posameznimi spojinami smo uporabljali UV svetobo z valovno dolžino  $\lambda = 254$  nm ali  $\lambda = 366$  nm ter orositvena reagenta ninhidrin (15 mg/mL ninhidrina, raztopljenega v 96 % etanol/očetna kislina = 5/1) in bromkrezol zeleno.

Za čiščenje nekaterih spojin smo kot separacijsko tehniko uporabili **kolonsko kromatografijo**. V vseh primerih je bila stacionarna faza Silikagel 60 (0,040 - 0,063 mm) proizvajalca Merck. Uporabljene mobilne faze so navedene pri posameznih stopnjah.

**Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC):** Čistost spojin smo določili z reverzno-fazno HPLC analizo na sistemu Agilent Technologies HP 1100, opremljenem s kvarterno črpalko in G1365B UV-VIS detektorjem različnih valovnih dolžin (220 in 254 nm). Uporabljena je bila kolona Agilent Eclipse Plus C18 (5 $\mu$ m; 4,6 x 50 mm), pretok 1.0 mL/min in detekcija pri 254 nm. Kolona je bila ves čas termostatorirana pri 25°C.

Elucija je bila gradientna, izvedena z mešanico 0,1 % TFA v vodi (A) in metanola (B).

Za spojino **12**:

0-16 min: 10 % B → 90 % B v A

16-19 min: 90 % B v A

19-20 min: 90 % B → 10 % B v A

20-25 min: 10 % B v A

Za vse ostale spojine:

0-10 min: 5 % B → 90 % B v A

10-18 min: 90 % B v A

18-20 min: 90 % B → 10 % B v A

6 min »post time«

Določena relativna čistota vseh analiziranih spojin je presegala zahtevanih 95,0 %.

### 3.3 Spektroskopske metode

**Jedrska magnetna resonanca (NMR):** Spektre  $^1\text{H}$ -NMR in  $^{13}\text{C}$ -NMR smo posneli na Bruker Avance spektrometru na Fakulteti za farmacijo. Interni standarda je bil TMS, kot devetirana topila smo uporabljali aceton- $d_6$ , DMSO- $d_6$ ,  $\text{CDCl}_3$ . Kemijske premike smo podali v »parts per million« (ppm) in sklopitvene konstante ( $J$ ) v hertzih (Hz). Analizo NMR spektrov smo izvedli s programsko opremo MestReNova 8.1 proizvajalca Mestrelab Research S.L. Spektri  $^{13}\text{C}$ -NMR so ustrezni za vse novo sintentizirane izolirane spojine, ki so navedene v magistrskem delu. Rešeni  $^1\text{H}$ -NMR spektri so priloženi pri posameznih sinteznih stopnjah. Zaradi kompleksnosti struktur, smo si v nekaterih primerih pri reševanju pomagali tudi z  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -COSY NMR eksperimentom.

**Masna spektroskopija:** Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru VG-Analytical Autospec Q mass proizvajalca Micromass (Manchester, Velika Britanija), z ESI in HRMS tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

**Določanje temperatura tališča:** Temperature tališč smo določali na mikroskopu Leica z ogrevalno mizico. Vrednosti niso korigirane.

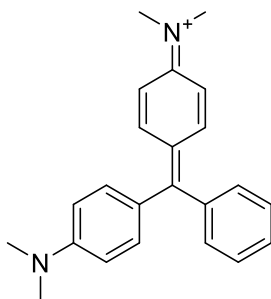
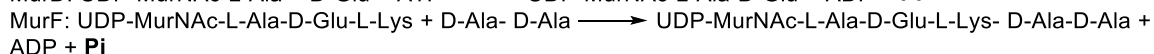
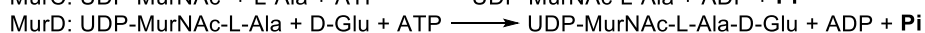
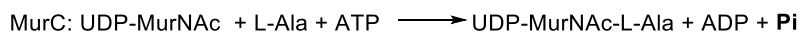
**Mikrovalovni reaktor:** Reakcije odpiranja epoksidnega obroča smo izvajali v

mikrovalovnem rektorju CEM Discover, z IR in optičnim načinom merjenja temperatur.

**Risanje in nomenklatura struktur spojin:** Za risanje in poimenovanje struktur smo uporabljali računalniški program ChemDraw Ultra 12.0 proizvajalca CambridgeSoft, slike in sheme pa so narisane z računalniškim programom ChemBioDraw Ultra 14.0. Pri iskanju spojin in sinteznih postopkov v podatkovnih bazah smo si pomagali s programom SciFinder-Scholar.

### 3.4 Biokemično testiranje

V sklopu magistrske naloge smo sintetiziranim spojinam ovrednotili zaviralno delovanje na posameznih encimih MurC, D in F z uporabo Biomol Green® reagenta, modifikacijo klasičnega malahitno zelenega reagenta z dodanim amonijevim molibdatom. Mur ligaze katalizirajo reakcije med karboksilno skupino UDP-prekurzorja in pripenjajočo aminokislino ob prisotnosti ATP, ki pri tem razpade na ADP in fosfat (Pi).



Slika 11: Strukturna formula barvila malahit zeleno

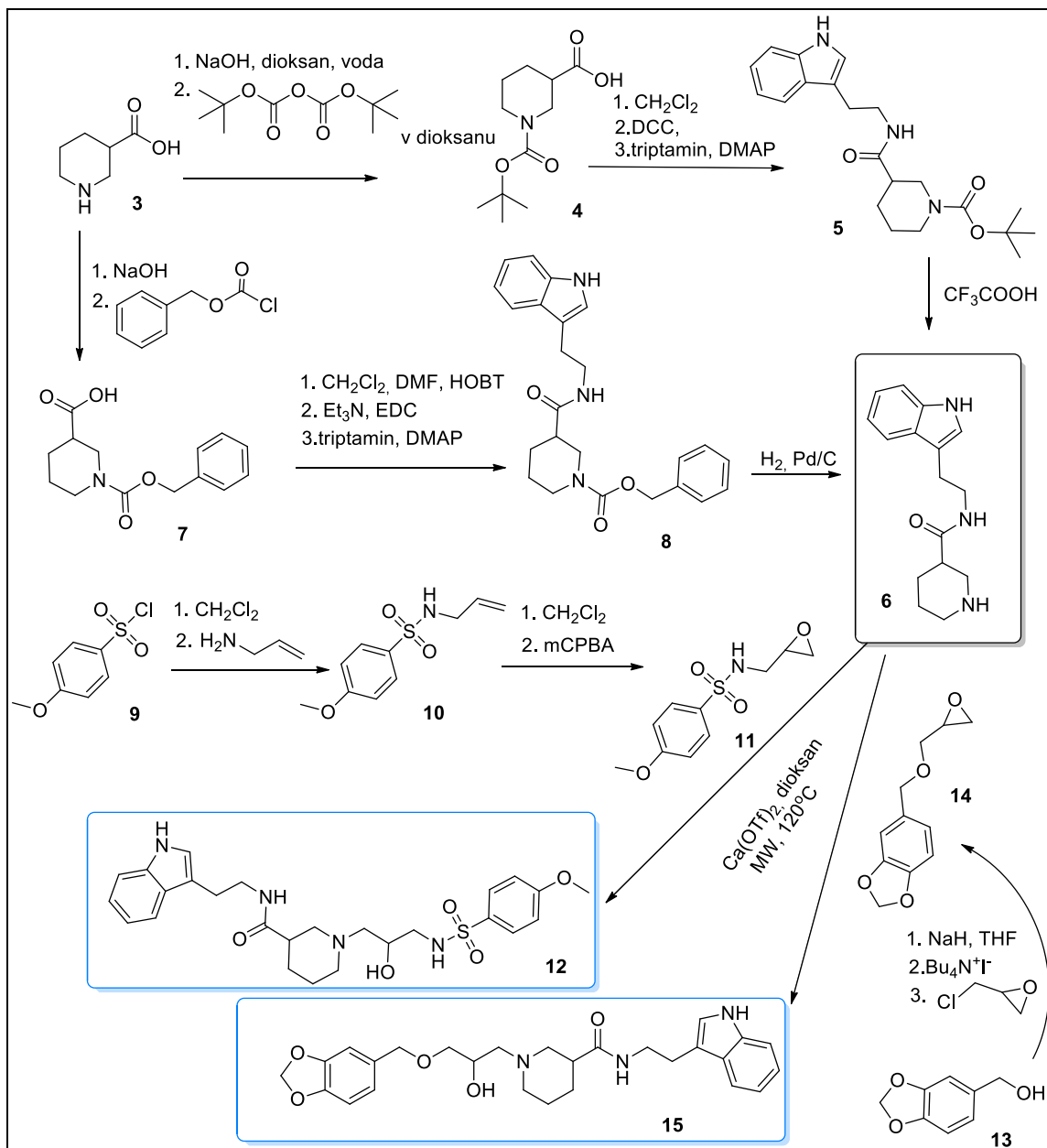
Katalitično količino ovrednotimo na podlagi množine fosfata, ki se sprosti ob reakciji, pri čemer mora biti količina fosfata v linearnem območju umeritvene krivulje za fosfat. Ob dodatku zaviralcev se katalitična aktivnost omenjenih encimov zniža, zato je množina nastalega fosfata manjša v primerjavi s kontrolo brez inhibitorja. Količino fosfata, ki se sprosti med reakcijo, smo določali spektrofotometrično pri 650 nm, posredno na podlagi tvorbe zeleno obarvanega kompleksa z malahitno zelenim. Zaviralno delovanje spojine izrazimo z rezidualno aktivnostjo (RA). Da bi izključili možno nespecifično zaviralno delovanje, so bile učinkovine testirane v prisotnosti detergenta (0,005 % Tritona X-114). Vse eksperimente smo izvedli v duplikatu.



## 4 EKSPERIMENTALNI DEL

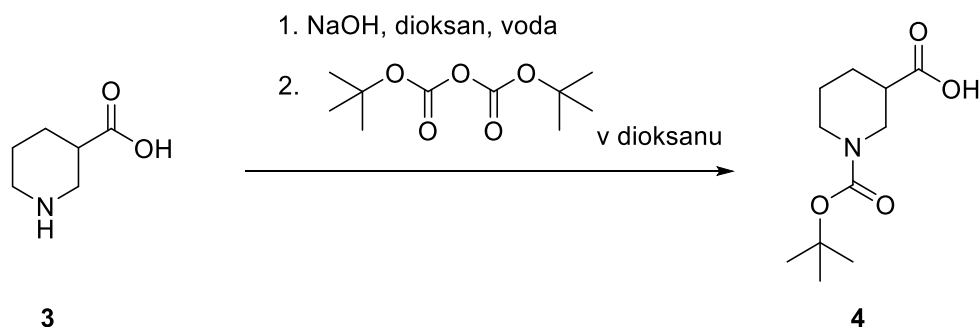
Eksperimentalni del magistrske naloge obsega sintezne postopke dveh strukturno različnih razredov potencialnih zaviralcev ligaz Mur (hidroksietilaminski in cianotiofenski derivati) ter izvedbo biokemičnega testiranja na posameznih izoliranih encimih.

### 4.1 Sinteza hidroksietilaminskih zaviralcev



Slika 12: Prikaz sinteznih poti hidroksietilaminskih zaviralcev **12** in **15**

#### 4.1.1 Sinteza 1-(*tert*-butoksikarbonil)piperidin-3-karboksilne kisline (spojina **4**)

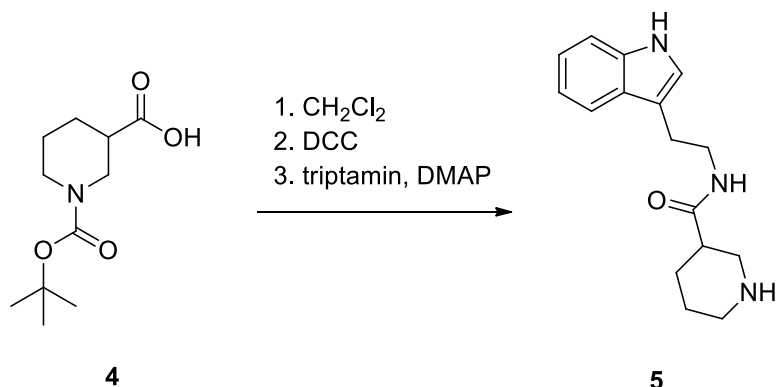


Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine **4**

Nipekotinsko kislino (*piperidin-3-karboksilno kislino*) (spojina **3**; 3,36 g; 41,5 mmol) smo raztopili v zmesi 1M NaOH (25 mL), prečiščene vode (25 mL) in dioksana (25 mL) ter raztopino ohladili do približno 10 °C na ledeni kopeli. Nato smo dodali *di-tert-butyl dikarbonat* (*Boc<sub>2</sub>O*) (10,9 g; 49,8 mmol) raztopljen v dioksanu (25 mL). Reakcijsko zmes smo pustili mešati na sobni temperaturi pol ure. Po pretečenem času smo pod znižanim tlakom odparili azeotrop dioksana in vode. Preostanku v bučki smo dodali vodo (50 mL), zmes prenesli v lij ločnik in jo nakisali do pH 2-3. Sledila je ekstrakcija z etilacetatom (najprej z 200 mL in nato še s 100 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odparili pod znižanim tlakom.

IUPAC ime	
1-( <i>tert</i> -butoksikarbonil)piperidin-3-karboksilna kislina	
<b>Izgled</b>	bela amorfna snov
<b>Izkoristek</b>	88 %
<b>Rf</b>	0,42 <span style="float: right;"><b>MF</b>: etilacetat/heksan= 2/1</span>
<b>Tališče</b>	165-169 °C <span style="float: right;">(v literaturi (29): 160-162 °C)</span>
<b><sup>1</sup>H NMR</b> (400 MHz, acetone- d <sub>6</sub> ): δ (ppm) =	1,29-1,36 (m, 1H, CH-nk); 1,39 (s, 9H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ); 1,50-1,53 (m, 1H, CH-nk); 1,61 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 16,3 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 7,5 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 3,7 Hz, CH-nk); 1,87-1,94 (m, 1H, CH-nk); 2,27-2,34 (m, 1H, CHCO-nk); 2,79-2,86 (m, 2H, CH <sub>2</sub> N-nk); 3,32-3,42 (m, 1H, CHN-nk); 3,62-3,76 (m, 1H, CHN-nk); 12,38 (rs, 1H, COOH). nk= nipekotinska kislina

#### 4.1.2 Sinteza *tert*-butil 3-((2-(1*H*-idol-3-il)etil)karbamoil)piperidin-1-karboksilat (spojina **5**)



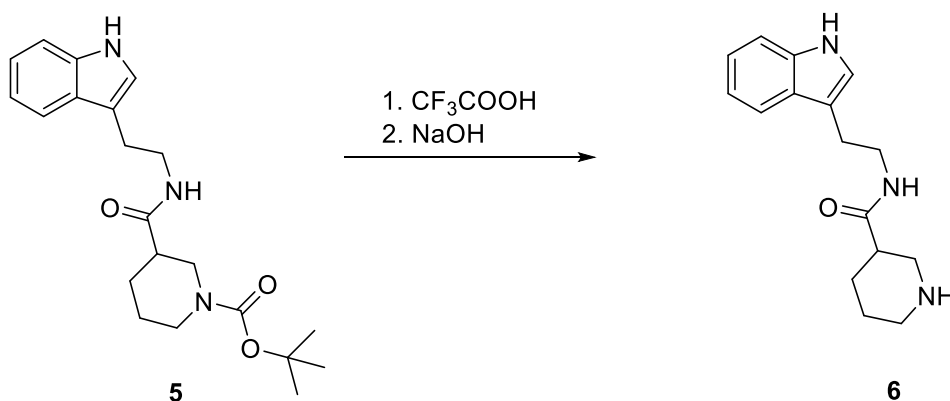
Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine **5**

Produkt prejšnje stopnje (spojina **4**; 4,02 g; 17,5 mmol) smo raztopili v *diklorometanu* (50 mL) in za boljšo topnost reaktantov dodali še *DMF* (10 mL). Na ledeni kopeli smo dodali *DCC* (3,62 g; 17,5 mmol) ter pustili reakcijsko zmes mešati 15 minut. Sledil je dodatek *DMAP*-a (214 mg; 1,75 mmol) in *triptamina* (2,95 g; 18,4 mmol). Odstavili smo ledeno kopel in zmes pustili mešati še 24 ur na sobni temperaturi. Po reakciji je izpadla bela oborina (dicikloheksilsečnina), ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem. Matičnici smo odparili topilo in preostanku v bučki dodali etilacetat (100 mL) ter dobljeno raztopino spirali s citronsko kislino (2 x 50 mL), prečiščeno vodo (50 mL), NaHCO<sub>3</sub> (2 x 50 mL), vodo (50 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (50 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odfiltrirali sušilno sredstvo in odparili topilo pod znižanim tlakom. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: etilacetat/heksan = 2/1).

IUPAC ime	
<i>tert</i> -butil 3-((2-(1 <i>H</i> -idol-3-il)etil)karbamoil)piperidin-1-karboksilat	
<b>Izgled</b>	amorfna oranžna snov
<b>Izkoristek</b>	9 %
<b>Rf</b>	0,28 <b>MF:</b> etilacetat/heksan= 2/1
<b><sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ (ppm) =	1,35-1,43 (m, 1H, CH-nk); 1,44 (s, 9H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ); 1,58-1,64 (m, 1H, CH-nk); 1,69-1,71 (m, 1H, CH-nk); 1,79-1,82 (m, 1H, CH-nk); 2,12-2,19 (m, 1H, CHCO-nk); 2,96 (t, 2H, <i>J</i> = 6,6 Hz, Ar-CH <sub>2</sub> ); 3,05-3,18 (m, 2H, CH <sub>2</sub> N-nk); 3,58 (q, 2H, <i>J</i> = 6,6 Hz, CH <sub>2</sub> NH); 3,68-3,80 (m, 1H, CHN-nk); 3,88-3,98 (m, 1H, CHN-nk); 6,00 (rs, 1H, NHCO); 7,03 (d, 1H, <i>J</i> = 2,0 Hz, Ar- <i>H</i> ); 7,12

	(ddd, 1H, $J_1= 8,0$ Hz, $J_2= 7,2$ Hz, $J_3= 1,2$ Hz, Ar-H); 7,20 (ddd, 1H, $J_1= 8,0$ Hz, $J_2= 7,2$ Hz, $J_3= 1,2$ Hz, Ar-H); 7,37 (d, 1H, $J= 8,0$ Hz, Ar-H); 7,60 (d, 1H, $J= 7,8$ Hz, Ar-H); 8,20 (s, 1H, NH-indol). nk= nipekotinska kislina
<b>HPLC</b>	tr= 10, 217 min

#### 4.1.3 Sinteza *N*-(2-(1*H*-indol-3il)etil)piperidin-3-karboksamida (spojina **6**)

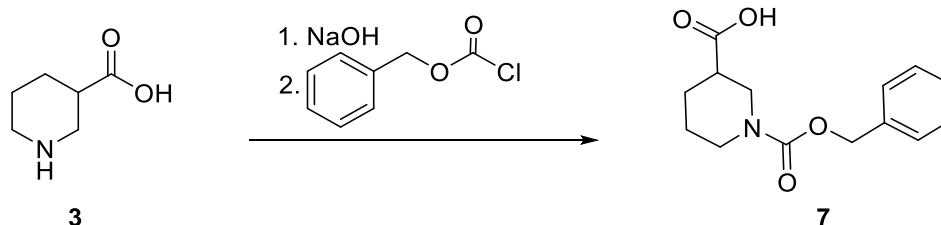


Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine **6**

Na ledeni kopeli smo spojino **5** (600 mg; 1,62 mmol) raztopili v  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  (50 mL) in postopoma dodajali *trifluoroocetno kislino* (4 mL; 52,2 mmol). Nato smo mešali na sobni temperaturi in potek reakcije sproti spremljali s tankoplastno kromatografijo, dokler ni bila na razvitem kromatogramu reakcijske zmesi vidna le lisa produkta, brez izhodne spojine (po približno treh urah). Po odparitvi topila pod znižanim tlakom smo dodali nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$  (50 mL) in zmes zaradi prenizkega pH naalkalili z 0,1 M raztopino NaOH do pH 11-12. Vodno fazo smo dvakrat sprali z etilacetatom (30 mL). Sledilo je spiranje organske faze z vodo in nasičeno raztopino NaCl ter sušenje z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Le-tega smo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom.

<b>IUPAC ime</b>	
<b><i>N</i>-(2-(1<i>H</i>-indol-3-il)etil)piperidin-3-karboksamid</b>	
<b>Izgled</b>	svetlo rjavi kristali
<b>Izkoristek</b>	98 %
<b>Rf</b>	0,63 <span style="float: right;"><b>MF:</b> etilacetat/heksan= 2/1</span>
<b>Tališče</b>	123-128 °C
<b><sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> <b>δ (ppm) =</b>	1,35-1,44 (m, 1H, CH-nk); 1,54-1,64 (m, 1H, CH-nk); 1,66-1,73 (m, 1H, CH-nk); 1,76-1,84 (m, 1H, CH-nk); 2,24-2,29 (m, 1H, CHCO-nk); 2,72 (t, 2H, <i>J</i> = 5,4 Hz, CH <sub>2</sub> N-nk); 2,85-2,94 (m, 2H, CH <sub>2</sub> N-nk); 2,99 (t, 2H, <i>J</i> = 6,6 Hz, <i>Ar</i> -CH <sub>2</sub> ); 3,62 (q, 2H, <i>J</i> = 6,8 Hz, CH <sub>2</sub> NH); 7,25 (rs, 1H, NHCO); 7,04 (d, 1H, <i>J</i> = 2,4 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,12 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 7,2 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 1,2 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,20 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 7,2 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 1,2 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,37 (td, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 0,8 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,61-7,64 (m, 1H, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 8,16 (s, 1H, NH-indol). nk= nipekotinska kislina

#### 4.1.4 Sinteza 1-((benziloksi)karbonil)piperidin-3-karboksilne kisline (spojina **7**)

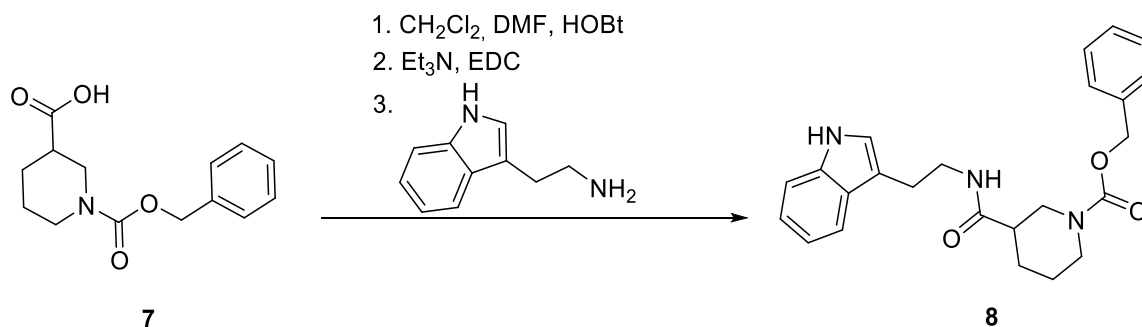


Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine **7**

Spojino **3** (4,52 g; 35 mmol) smo raztopili v 1 M NaOH (45 mL) in nato po kapljicah pri 0 °C dodajali *CbzCl* (5,97 mL; 42,0 mmol). Mešali smo 2 uri pri sobni temperaturi ter ohranjali pH okrog 10. Reakcijsko zmes smo prenesli v lij ločnik, dopolnili z vodo do 100 mL in ekstrahirali z dietilnim etrom (2 x 50 mL). Vodno fazo smo nakisali z 2 M HCl do pH 2-3 in jo ekstrahirali z etilacetatom (2 x 50 mL). Sledilo je sušenje organske faze z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtracija in odparevanje topila pod znižanim tlakom.

IUPAC ime	
<b>1-((benziloksi)karbonil)piperidin-3-karboksilna kislina</b>	
<b>Izgled</b>	beli kristali
<b>Izkoristek</b>	89 %
<b>Rf</b>	0,40 <span style="float: right;"><b>MF:</b> etilacetat/heksan= 2/1</span>
<b>Tališče</b>	105-107 °C <span style="float: right;">(v literaturi (30): 100-101 °C)</span>
<b><sup>1</sup>H NMR</b> <b>(400 MHz, DMSO-<i>d</i><sub>6</sub>):</b> <b>δ (ppm) =</b>	1,33-1,44 (m, 1H, CH-nk); 1,48-1,59 (m, 1H, CH-nk); 1,63 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 16,3 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 7,5 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 3,7 Hz, CH-nk); 1,90-1,95 (m, 1H, CH-nk); 2,33-2,39 (m, 1H, CHCO-nk); 2,88-3,16 (m, 2H, CH <sub>2</sub> N.nk); 3,71-3,84 (m, 1H, CHN-nk); 3,92-4,05 (m, 1H, CHN-nk); 5,03-5,10 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 7,29-7,39 (m, 5H, Ar- <i>H</i> ); 12,43 (rs, 1H, COOH). nk= nipekotinska kislina

#### 4.1.5 Sinteza benzil 3-((2-(1*H*-indol-3-il)etil)kabamoil)piperidin-1-karboksilata (spojina **8**)

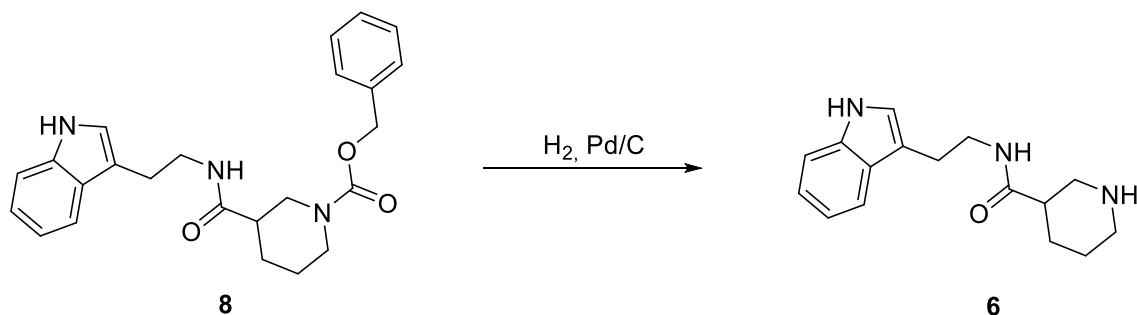


Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine **8**

Spojini **7** (3,00 g; 11,4 mmol) smo na ledeni kopeli dodali *HOBt* (1,85 g; 13,7 mmol), *CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>* (40 mL) in *DMF* (10 mL). Nato smo dodali še *trietilamin* (3,18 mL; 22,8 mmol) in *EDC* (2,84 g; 14,8 mmol), po 10 minutah pa še *triptamin* (1,92 g; 12,0 mmol) ter zmes pustili mešati 24 ur na sobni temperaturi. Iz TPK analize je bilo razvidno, da je ostalo v zmesi še veliko nezreagirane izhodne spojine, zato smo dodali še *BOP* (2,52 g; 5,7 mmol) in reakcijsko zmes pustili mešati čez noč. Izolacijo smo izvedli z dodatkom *CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>* (70 mL) in spiranjem organske faze z 1M *HCl* (2 x 70 mL), prečiščeno vodo (70 mL), *NaHCO<sub>3</sub>* (2 x 70 mL), vodo (70 mL) in nasičeno raztopino *NaCl* (70 mL). Organsko fazo smo sušili z *Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>*, filtrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom.

IUPAC ime	
<b>Benzil 3-((2-(1<i>H</i>-indol-3-il)etil)kabamoil)piperidin-1-karboksilat</b>	
<b>Izgled</b>	trjava amorfna spojina
<b>Izkoristek</b>	73 %
<b>Rf</b>	0,53 <span style="float: right;"><b>MF:</b> etilacetat/heksan= 9/1</span>
<b>Tališče</b>	124-127 °C
<b><sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> $\delta$ (ppm) =	1,35-1,46 (m, 1H, CH-nk); 1,60-1,67 (m, 1H, CH-nk); 1,70-1,86 (m, 2H, CH <sub>2</sub> -nk); 2,08-2,19 (m, 1H, CHCO-nk); 2,87-3,00 (m, 1H, CHN-nk); 2,94 (t, 2H, <i>Ar</i> -CH <sub>2</sub> , <i>J</i> = 6,7 Hz), 3,06-3,16 (m, 1H, CHN-nk); 3,49-3,64 (m, 2H, CH <sub>2</sub> NH); 3,84-4,03 (m, 1H, CHN-nk); 4,04 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 13,4 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 3,0 Hz, CHN-nk); 5,05-5,13 (m, 2H, CH <sub>2</sub> ); 5,74 (rs, 1H, NHCO); 6,96 (rs, 1H, <i>Ar</i> - <i>H</i> ), 7,11 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 7,2 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 1,2 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,20 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 7,2 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 1,2 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,03-7,38 (m, 5H, <i>Ar</i> - <i>H</i> ), 7,59 (d, 1H, <i>J</i> = 8,0 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 8,11 (rs, 1H, NH-indol). nk= nipekotinska kislina
<b>HPLC</b>	<i>t</i> <sub>R</sub> = 10,557 min

#### 4.1.6 Sinteza *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)piperidin-3-karboksamida (spojina **6**)

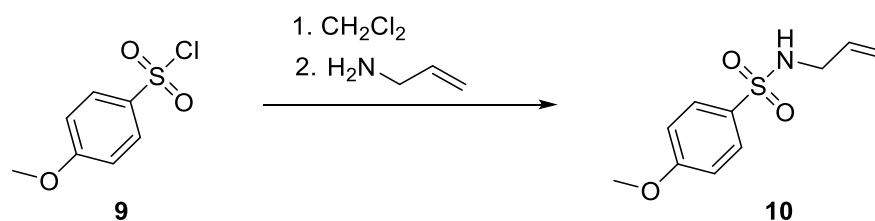


Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine **6**

Spojino **8** (2,5 g; 6,17 mmol) smo zatehtali v suho dvogrlo bučko, jo raztopili v brezvodnem etanolu in reakcijsko zmes prepihali z argonom. Po dodatku 10 % paladija na ogljiku (0,25 g) smo še enkrat prepihali z argonom, temu je sledilo enourno prepihavanje z vodikom, nato pa smo pustili mešati reakcijsko zmes v vodikovi atmosferi 48 ur. Po končani reakciji smo paladij odfiltrirali s presesavanjem in odparili etanol pod znižanim tlakom.

<b>IUPAC ime</b>	
<b><i>N</i>-(2-(1<i>H</i>-indol-3-il)etil)piperidin-3-karboksamid</b>	
<b>Izgled</b>	rumena amorfna spojina
<b>Izkoristek</b>	87 %
<b>Rf</b>	0,10 <span style="float: right;"><b>MF</b>: diklorometan/metanol = 9/1</span>
<b>Tališče</b>	123-128 °C
<b><sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> <b>δ (ppm) =</b>	1,35-1,44 (m, 1H, CH-nk); 1,54-1,64 (m, 1H, CH-nk); 1,66-1,73 (m, 1H, CH-nk); 1,76-1,84 (m, 1H, CH-nk); 2,24-2,29 (m, 1H, CHCO-nk); 2,72 (t, 2H, <i>J</i> = 5,4 Hz, CH <sub>2</sub> N-nk); 2,85-2,94 (m, 2H, CH <sub>2</sub> N-nk); 2,99 (t, 2H, <i>J</i> = 6,6 Hz, <i>Ar</i> -CH <sub>2</sub> ); 3,62 (q, 2H, <i>J</i> = 6,8 Hz, CH <sub>2</sub> NH); 7,25 (rs, 1H, NHCO); 7,04 (d, 1H, <i>J</i> = 2,4 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,12 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 7,2 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 1,2 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,20 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 7,2 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 1,2 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,37 (td, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 0,8 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,61-7,64 (m, 1H, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 8,16 (s, 1H, NH-indol). nk= nipekotinska kislina
<b>HPLC</b>	t <sub>R</sub> = 2,718 min

#### 4.1.7 Sinteza *N*-alil-4-metoksibenzensulfonamida (spojina **10**)



Slika 19: Reakcijska shema sinteze spojine **10**

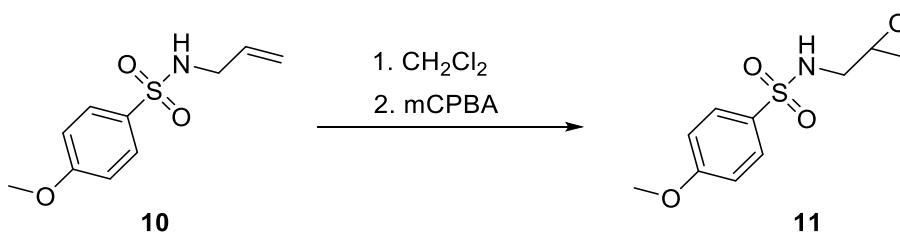
4-metoksibenzen-1-sulfonyl klorid (6,18 g; 30 mmol) smo raztopili v brezvodnem diklorometanu (40 mL) in zmes ohladili na 0 °C na ledeni kopeli. Po kapljicah smo nato dodajali alilamin (4,71 mL; 63,0 mmol). Mešali smo še 15 minut pri 0 °C, nato pa še eno uro pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo zmesi dodali CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (40 mL) in organsko fazo spirali z 1 M HCl (3 x 30 mL), prečiščeno vodo (30 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (30 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom.



TPK analiza je pokazala, da je nekaj produkta ostalo še v vodni fazi. Od tam smo ga ekstrahirali z etilacetatom (2 x 50 ml). Nato smo organsko fazo spirali z vodo (50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (50 mL), sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odparili topilo. Z NMR smo potrdili nastanek zelenega produkta in brez dodatnega čiščenja takoj nadaljevali z naslednjo stopnjo sinteze.

IUPAC ime	
<b><i>N</i>-alil-4-metoksibenzensulfonamid</b>	
<b>Izgled</b>	brezbarvno olje (v literaturi (31): brezbarvno olje)
<b>Izkoristek</b>	79 %
<b>Rf</b>	0,50 <span style="float: right;"><b>MF:</b> etilacetat/heksan= 2/1</span>
<b><sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ (ppm) =	3,58 (dddd, 2H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 6,1 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 6,1 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 1,5 Hz, <i>J</i> <sub>4</sub> = 1,5 Hz, NCH <sub>2</sub> ); 3,88 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 4,47 (t, 1H, <i>J</i> = 6,1 Hz, NH); 5,10 (ddt, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 10,2 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 1,2 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 1,2 Hz, =CH <sub>a</sub> ); 5,17 (ddt, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 17,1 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 1,5 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 1,5 Hz, =CH <sub>b</sub> ); 5,66-5,79 (m, 1H, CH); 6,96-7,01 (m, 2H, Ar-H); 7,78-7,83 (m, 2H, Ar-H).

#### 4.1.8 Sinteza 4-metoksi-*N*-(oksiran-2-il-metil)benzensulfonamida (spojine **11**)

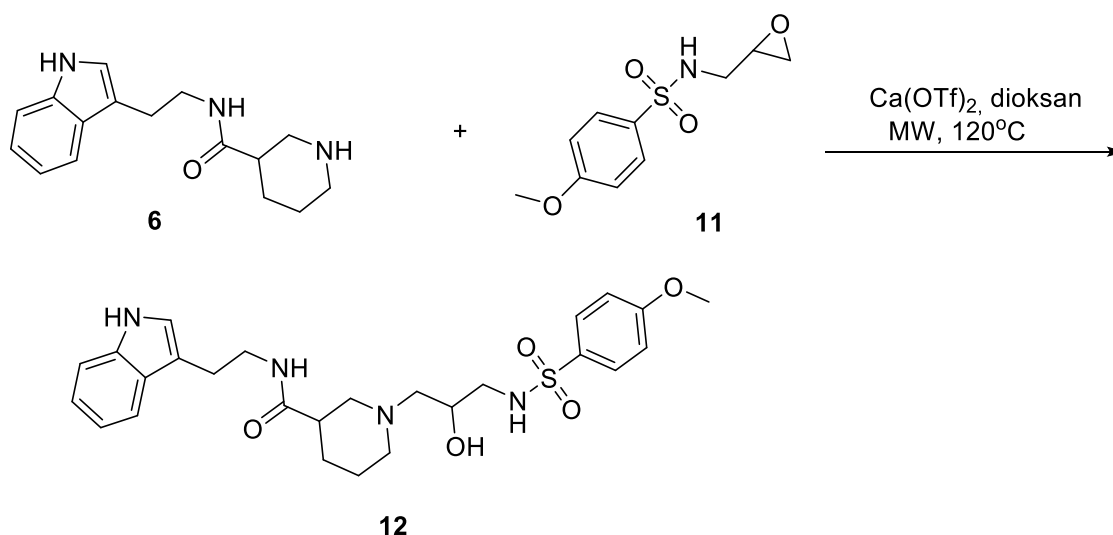


Slika 20: Reakcijska shema sinteze spojine **11**

Spojino **10** (5,28 g; 23,2 mmol) smo raztopili v *brezvodnem* diklorometanu (50 mL), raztopino ohladili na 0 °C in nato dodali *m*-CPBA (6,89 g (70 % čistost); 27,9 mmol). Zmes smo pustili mešati 15 minut na ledeni kopeli, nato pa 48 ur pri sobni temperaturi. Po pretečenem času smo dodali 20 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> in spirali organsko fazo najprej z nasičeno raztopino Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub> (4 x 30 mL), nato še z nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (30 mL), vodo (30 mL) in nasičeno raztopino NaCl (30 mL). Organsko fazo smo sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odparili topilo pod znižanim tlakom. V bučki smo dobili produkt v obliki belih kristalov.

<b>IUPAC ime</b>	
<b>4-metoksi-N-(oksiran-2-il-metil)benzensulfonamid</b>	
<b>Izgled</b>	viskozna tekočina (v literaturi (32): olje)
<b>Izkoristek</b>	44 %
<b>Rf</b>	0,37 <span style="float: right;"><b>MF:</b> etilacetat/heksan= 2/1</span>
<b>Tališče</b>	46-50 °C
<b><sup>1</sup>H NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> $\delta$ (ppm) =	2,63 (dd, 1H, $J_1 = 4,7$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, OCH <sub>a</sub> ); 2,74-2,77 (m, 1H, OCH <sub>b</sub> ); 2,99-3,09 (m, 2H, NCH <sub>a</sub> CHO); 3,27-3,38 (m, 1H, NCH <sub>b</sub> ); 3,87 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ); 4,65-4,70 (m, 1H, NH); 6,96-7,01 (m, 2H, Ar-H), 7,77-7,82 (m, 2H, Ar-H).

#### 4.1.9 Sinteza N-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-1-(2-hidroksi-3-(4-metoksifenilsulfonamido)propil)piperidin-3-karboksamida (spojina **12**)

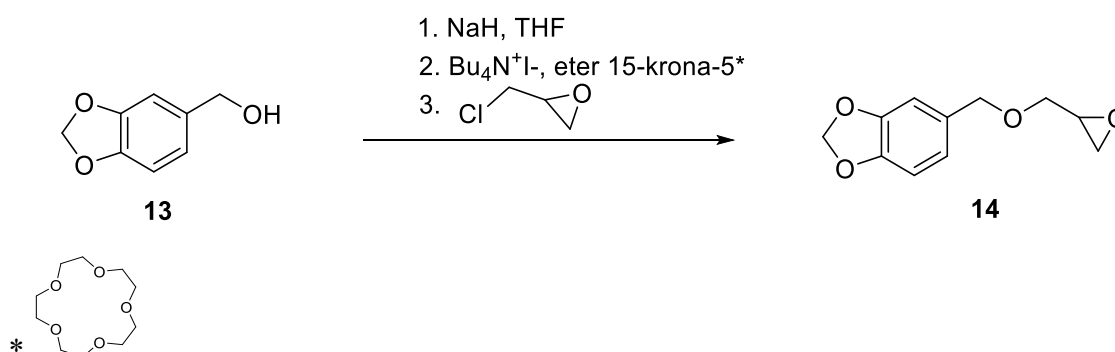


Slika 21: Reakcijska shema sinteze spojine **12**

Reakcijsko zmes smo pripravili v epruveti za mikrovalovni reaktor (10 mL) iz spojine **6** (212 mg; 1,01 mmol), **11** (393 mg; 1,45 mmol) in katalizatorja *kalcijevega trifluorometansulfonata* (223 mg; 0,660 mmol). Kot topilo smo uporabili *brezvodni dioksan* (5 mL). Reakcija je potekala 20 minut v mikrovalovnem reaktorju pri 120 °C. Po končani reakciji smo epruveto dobro sprali z acetonom, zmes filtrirali v bučko (odstranili smo katalizator) in odparili topila pod znižanim tlakom. Spojino smo izolirali s kolonsko kromatografijo. Začeli smo z mobilno fazo etilacetat/metanol= 5/1 ter postopoma povečevali delež metanola v njej.

<b>IUPAC ime</b>	
<b><i>N</i>-(2-(1<i>H</i>-indol-3-il)etil)-1-(2-hidroksi-3-(4-metoksifenilsulfonamido)propil)piperidin-3-karboksamid</b>	
<b>Izgled</b>	beli kristali
<b>Izkoristek</b>	41 %
<b>Rf</b>	0,16 <span style="float: right;"><b>MF:</b> etilacetat/metanol= 5/1</span>
<b>Tališče</b>	85-89°C
<b><sup>1</sup>H NMR</b> (400 MHz, aceton-d <sub>6</sub> ): δ (ppm) =	1,42-1,50 (m, 1H, CH-nk); 1,52-1,72 (m, 3H, CH <sub>2</sub> CH-nk); 2,26-2,60 (m, 6H, CHCO-nk, CH <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> -nk, NCH <sub>a</sub> ); 2,69-2,72 (m, 1H, NCH <sub>b</sub> ); 2,89 (dd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 12,8 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 6,0 Hz, NHCH <sub>a</sub> ); 2,95 (t, 2H, <i>J</i> = 7,2 Hz, <i>Ar</i> -CH <sub>2</sub> ); 2,96-3,02 (m, 1H, NHCH <sub>b</sub> ); 3,52 (q, 2H, <i>J</i> = 7,2 Hz, CH <sub>2</sub> NH); 3,70 (rs, 1H, OH); 3,77-3,82 (m, 1H, CHOH); 3,82 (3,83)* (s+s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 6,57 (s, 1H, NHSO <sub>2</sub> ); 7,00 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 7,2 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 1,2 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,03-7,11 (m, 3H, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,16-7,17 (m, 1H, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,39 (td, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 0,8 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,59 (td, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 0,8 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,73 (rs, 1H, NH-indol); 10,09 (rs, 1H, NHCO). * 2 diastereizomera nk= nipekotinska kislina
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>26</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S (m/z): <b>514,2217</b> Izmerjena vrednost za (m/z): <b>514,2213</b>
<b>HPLC</b>	t <sub>R</sub> =16,45 min

#### 4. 1. 10 Sinteza 5-((oksiran-2-il)metoksimetil)benzo[d][1,3]dioksola (spojina **14**)

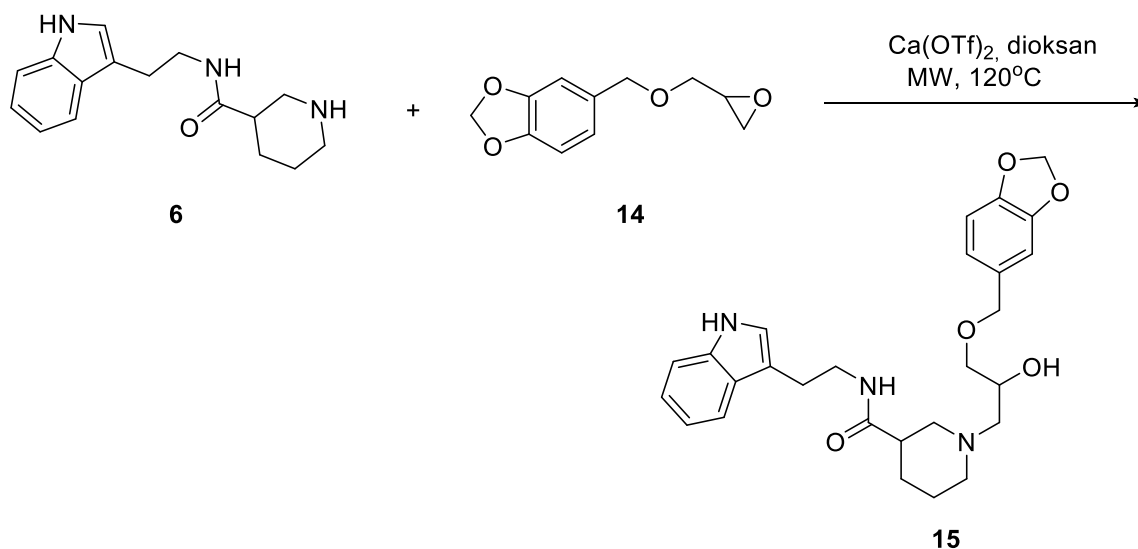


Slika 22: Reakcijska shema sinteze spojine **14**

3,4-(metilendioksi)benzilalkohol (1,52 g; 10 mmol) smo raztopili v brezvodnem THF (30 mL). Bučko smo prepihali z argonom in zmes ohladili na 0 °C, nato pa dodali NaH (300 mg; 12,5 mmol) in katalitično količino  $Bu_4NI$  (0,10 g). Reakcijsko zmes smo segreli do refluxa (vodni povratni hladilnik) in jo pustili mešati 30 min pri sobni temperaturi. Sledil je dodatek kronskega *etra 15-krona-5* (400  $\mu$ L, 2 mmol) in nazadnje epiklorhidrina (0,78 mL; 10 mmol). Mešali smo še nadaljnjih 12 ur pri sobni temperaturi. Konec reakcije smo potrdili s pomočjo tankoplastne kromatografije. THF smo odparili pod znižanim tlakom in zaostanek raztopili v etilacetatu (150 ml). Nato smo organsko fazo spirali z nasičeno raztopino NaCl (75 mL), sušili z  $Na_2SO_4$ , filtrirali in odparili topilo. S surovim produktom smo takoj nadaljevali v naslednji stopnji sinteze.

IUPAC ime	
Sinteza 5-((oksiran-2-il)metoksimetil)benzo[d][1,3]dioksol	
Izgled	viskozno rumeno olje
Izkoristek	77 %
Rf	0,63 <span style="float: right;">MF: etilacetat/heksan= 2/1</span>

#### 4.1. 11 Sinteza *N*-(2-(1*H*-indol-3-il)etil)-1-(3-(benzo[d][1,3]dioksol-5-ilmetoksi)-2-hidroksipropil)piperidin-3-karboksamida (spojina **15**)

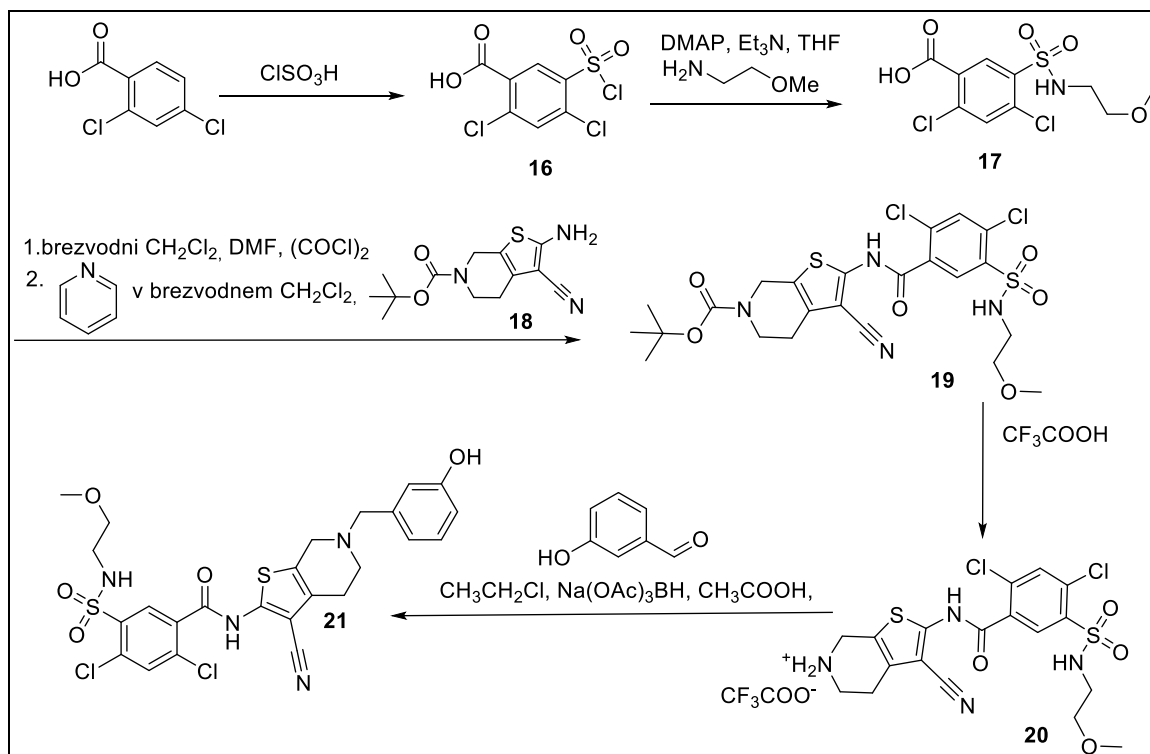


Slika 23: Reakcijska shema sinteze spojine **15**

V epruveto za mikrovalovni reaktor (10 mL), opremljeno z magnetnim mešalom, smo natehtali spojino **6** (700 mg; 2,58 mmol) in spojino **14** (521 mg; 2,35 mmol) ter dodali katalizator  $Ca(TfSO_3)_2$  (199 mg; 0,588 mmol) in *brezvodni dioksan* (5 mL). Sinteza je potekala v prisotnosti mikrovalov 20 minut pri 120 °C. Po koncu reakcije smo epruveto sprali z acetonom, katalizator odstranili s filtracijo ter odparili organska topila pod znižanim tlakom. Z namenom odstranitve prebitnega amina in nastalih stranskih produktov smo izvedli čiščenje s kolonsko kromatografijo. Začeli smo z mobilno fazo etilacetat/heksan= 2/1 in nato postopoma povečevali delež etilacetata v mobilni fazi do čistega etilacetata. Na koncu smo prešli še na mobilno fazo etilacetat/metanol= 5/1.

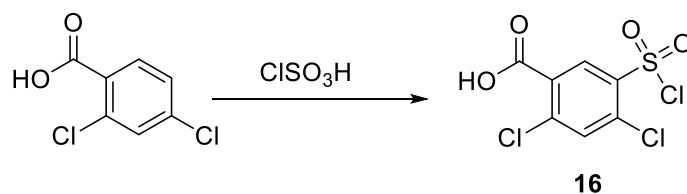
<b>IUPAC ime</b>	
<b><i>N</i>-(2-(1<i>H</i>-indol-3-il)etil)-1-(3-(benzo[d][1,3]dioksol-5-ilmetoksi)-2-hidroksipropil)piperidin-3-karboksamid</b>	
<b>Izgled</b>	svetlo rumeni kristali
<b>Izkoristek</b>	25 %
<b>Rf</b>	0,27 <span style="float: right;"><b>MF:</b> etilacetat/metanol=5/1</span>
<b>Tališče</b>	39-44 °C
<b><sup>1</sup>H NMR</b> <b>(400 MHz, aceton-d<sub>6</sub>):</b> <b>δ (ppm) =</b>	1,44-1,56 (m, 1H, CH-nk); 1,58-1,70 (m, 3H, CH <sub>2</sub> CH-nk); 2,42-2,64 (m, 6H, CHCO-nk, CH <sub>2</sub> NCH <sub>2</sub> -nk, NCH <sub>a</sub> ); 2,72-2,82 (m, 1H, NCH <sub>b</sub> ); 2,95 (t, 2H, <i>J</i> = 7,2 Hz, <i>Ar</i> -CH <sub>2</sub> ); 3,38-3,45 (m, 1H, OCH <sub>2</sub> ); 3,48-3,54 (m, 2H, CH <sub>2</sub> NH); 3,55 (rs, 1H, OH); 3,90-3,95 (m, 1H, CHOH); 4,41-4,42 (m, 2H, CH <sub>2</sub> O); 5,96 (s, 2H, OCH <sub>2</sub> O); 6,78-6,82 (m, 2H, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 6,87-6,88 (m, 1H, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,00 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 7,2 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 1,2 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,08 (ddd, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 7,2 Hz, <i>J</i> <sub>3</sub> = 1,2 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,15-7,16 (m, 1H, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,38 (td, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 0,8 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,59 (td, 1H, <i>J</i> <sub>1</sub> = 8,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 0,8 Hz, <i>Ar</i> - <i>H</i> ); 7,86 (rs, 1H, NH-indol); 10,10 (s, 1H, NHCO). nk= nipekotinska kislina
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>27</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> (m/z): <b>480,2498</b> [M+H] <sup>+</sup> Izmerjena vrednost (m/z): <b>480,2492</b>
<b>HPLC</b>	tr= 6,702 min

## 4.2 Sinteza cianotiofenskega zaviralca



Slika 24: Reakcijska shema sinteze spojine **21**

### 4.2.1 Sinteza 2,4-dikloro-5-(klorosulfonil)benzojske kisline (spojina **16**)

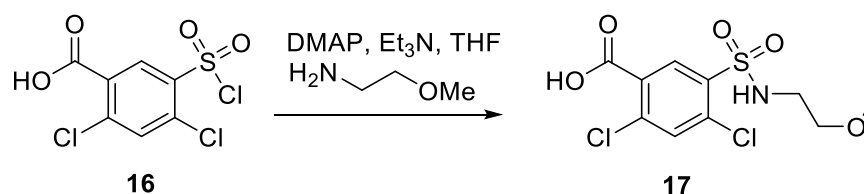


Slika 25: Reakcijska shema sinteze spojine **16**

V suho 100 mL bučko, opremljeno s klorkalcijevo cevko, smo odmerili *klorosulfonsko kislino* (29,6 mL; 445 mmol) in jo ohladili na 0 °C. Med mešanjem na ledeni kopeli smo postopoma in previdno dodajali uprašeno *2,4-diklorobenzojsko kislino* (14,2 g; 74,2 mmol). Bučko smo nato opremili s povratnim hladilnikom s klorkalcijevo cevko ter tako zaščitili reakcijsko zmes pred atmosfersko vlago. Postopoma smo jo segreli na 140 °C in pustili mešati 16 ur. Po pretečenem času smo zmes ohladili na sobno temperaturo ter jo v tankem curku in med mešanjem zlili v čašo z zdrobljenimi koščki ledu. Belo oborino smo izolirali s filtracijo z odsesavanjem in jo sprali z ledeno vodo. Dobili smo produkt v obliki belih kristalov.

IUPAC ime	
<b>2,4-dikloro-5-(klorosulfonil)benzojska kislina</b>	
<b>Izgled</b>	beli kristali
<b>Izkoristek</b>	81 %
<b>Rf</b>	0,11 <span style="float: right;"><b>MF:</b> etilacetat/metanol= 5/1</span>
<b>Tališče</b>	izmerjena vrednost: 176-180 °C (v literaturi (33): 183-185 °C)
<b><sup>1</sup>H NMR</b> (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> ): δ (ppm) =	7,67 (s, 1H, Ar-H); 8,31 (s, 1H, Ar-H); 14,10 (s, 1H, COOH).

#### 4.2.2 Sinteza 2,4-dikloro-5-(*N*-(2-metoksietil)sulfamoil)benzojske kisline (spojina **17**)

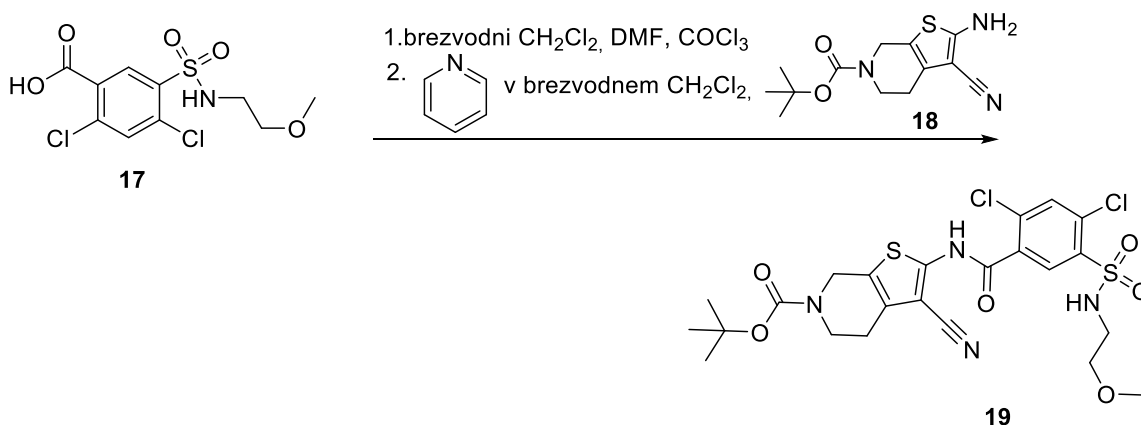


Slika 26: Reakcijska shema sinteze spojine **17**

Raztopini spojine **16** (25,96 mmol; 7,5 g) v brezvodnem tetrahidrofuranu (30 mL) smo dodali *trietilamin* (5,41 mL; 38,9 mmol) in zmes ohladili na 0 °C na ledeni kopeli. Dodali smo katalitično količino *DMAP* (0,316 g; 2,60 mmol) in nato počasi dodajali *2-metoksi etan-1-amin* (2,23 mL; 25,96 mmol). Bučko smo prepihovali z argonom in tako zagotavljali brezvodne pogoje. Po dodatku reagentov smo odstavili ledeno kopel in reakcijsko zmes pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo zmes naalkalili do pH= 12 s 3 M NaOH in jo prenesli v lij ločnik, dodali še malo destilirane vode (10 mL) ter spirali z dietiletrom (3 x 25 mL). Sledilo je nakisanje vodne faze na ledeni kopeli s 3M HCl do pH= 2-3 in ekstrakcija produkta v etilacetat (3 x 25 mL), katerega smo potem sprali še z nasičeno raztopino NaCl (37 mL), sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali ter topilo odparili pod znižanim tlakom.

<b>IUPAC ime</b>	
<b>2,4-dikloro-5-(<i>N</i>-(2-metoksietil)sulfamoil)benzojska kislina</b>	
<b>Izgled</b>	bela amorfna snov
<b>Izkoristek reakcije</b>	33 %
<b>R<sub>f</sub></b>	0,254 <span style="float: right;"><b>MF:</b> etilacetat/metanol= 5/1</span>
<b>T<sub>tal</sub></b>	112-118 °C
<b><sup>1</sup>H NMR</b> <b>(400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> <b>δ (ppm) =</b>	3,17-3,23 (m, 2H, CH <sub>2</sub> O); 3,31 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 3,40-3,45 (m, 2H, SO <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> ); 6,73 (s, 1H, NH); 7,29 (s, 1H, Ar-H); 7,70 (s, 1H, Ar-H); 8,70 (s, 1H, COOH).

#### 4.2.3 Sinteza *tert*-butil 3-ciano-2-(2,4-dikloro-5-(*N*-(2-metoksietil)sulfamoil)benzamido)-4,7-dihidrotieno[2,3-*c*]piridin-6(5*H*) karboksilata (spojina **19**)



Slika 27: Reakcijska shema sinteze spojine **19**

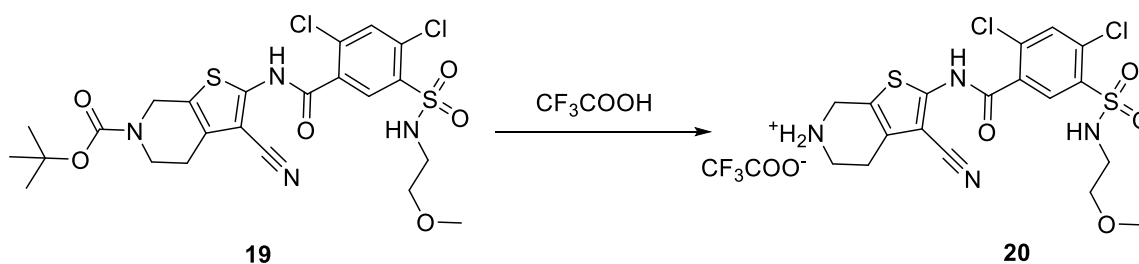
V suspenzijo spojine **17** (2,65 g; 8,10 mmol) v *brezvodnem* diklorometanu (60 mL) in v argonovi atmosferi smo dodali katalitično količino *DMF* (0,067 mL; 0,810 mmol) ter po kapljicah dodajali *oksalilklorid* ((*COCl*)<sub>2</sub>) (2,06 mL; 24,32 mmol). Pri sobni temperaturi smo mešali še pol ure in nato odparili topilo pod znižanim tlakom do suhega preostanka, katerega smo raztopili v 30 mL CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>. V pripravljeno raztopino smo po kapljicah dodajali *tert*-butil 2-amino-3-ciano-4,7-dihidrotieno[2,3-*c*]piridin-6(5*H*)-karboksilat (spojina **18**; 2,26 g; 8,10 mmol) in *piridin* (2,06 mL; 40,5 mmol) v diklorometanu (30 mL). Pustili smo mešati čez noč pri sobni temperaturi. Sledila je izolacija produkta. Zmes smo sprali z 10 % citronsko kislino (2 x 30 mL), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (30 mL) in nasičeno raztopino NaCl (30 mL). Ker smo pri ekstrakciji dobili emulzijo, ki se je ni dalo



dobro ločiti kljub ponovnemu dodatku nasičene raztopine NaCl, smo dodali še dietileter. Združene organske faze smo nato sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odparili topila pod znižanim tlakom in dobili rdeče-rjavo viskozno tekočino, ki je na zraku počasi kristalizirala. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo. Začeli smo z mobilno fazo etilacetat/eter/petroleter= 1:1:1, nato smo povečevali delež etilacetata.

IUPAC ime	
<b><i>tert</i>-butil 3-ciano-2-(2,4-dikloro-5-(<i>N</i>-(2-metoksietil)sulfamoil)benzamido)-4,7-dihidrotieno[2,3-<i>c</i>]piridin-6(5<i>H</i>)-karboksilat</b>	
<b>Izgled</b>	rjavo-rumena trdna
<b>Izkoristek reakcije</b>	40 %
<b>R<sub>f</sub></b>	0,614 <span style="float: right;"><b>MF:</b> etilacetat/metanol= 5/1</span>
<b>T<sub>tal</sub></b>	106-108 °C
<b><sup>1</sup>H NMR (400 MHz, aceton-d<sub>6</sub>):</b> δ (ppm) =	1,15 (s, 9H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ); 2,73 (t, 2H, <i>J</i> = 4,8 Hz, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 3,15 (q, 2H, <i>J</i> = 5,6 Hz, SO <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> ); 3,26 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 3,38 (t, 2H, <i>J</i> = 4,8 Hz, CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> ); 3,74 (t, 2H, <i>J</i> = 4,8 Hz, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 4,57 (s, 2H, NCH <sub>2</sub> ); 5,81 (s, 1H, SO <sub>2</sub> NH); 7,29 (s, 1H, Ar-H); 8,39 (s, 1H, Ar-H); 9,97 (s, 1H, NHCO).
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>23</sub> H <sub>26</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> : <b>589,0741</b> [M+H] <sup>+</sup> Izmerjena vrednost (m/z): <b>589,0743</b>

#### 4.2.4 Sinteza 3-ciano-2-(2,4-dikloro-5-(*N*-(2-metoksietil)sulfamoil) benzamido)-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridin-6-ijevega 2,2,2-trifluoroacetata (spojina **20**)



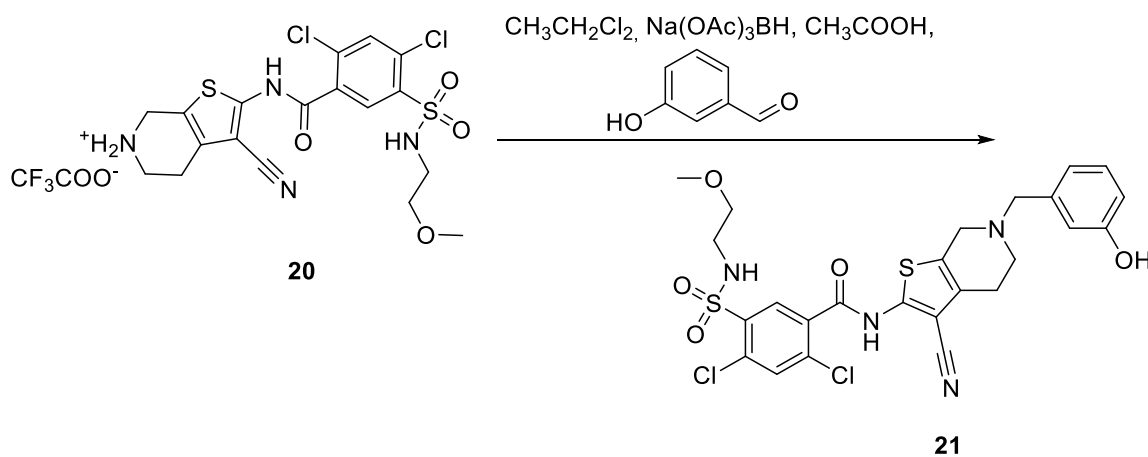
Slika 28: Reakcijska shema sinteze spojine **20**

V raztopino spojine **19** (1,8 g; 3,05 mmol) v *diklorometanu* smo po kapljicah dodajali *trifluoroacetno kislino* (9 mL) in pustili mešati pri sobni temperaturi dve uri. Nato smo pod

znižanim tlakom odparili topilo in zaostanku v bučki dodali etilacetat. Ker se je spojina **20** nahajala v obliki soli s  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , so na stenah bučke začeli izpadati rumeni kristali. Njihovo izpadanje smo pospešili še z dodatkom dietilnega etra. Produkt smo pustili sušiti čez noč v eksikatorju.

IUPAC ime	
<b>3-ciano-2-(2,4-dikloro-5-(<i>N</i>-(2-metoksietil)sulfamoil)benzamido)-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-<i>c</i>]piridin-6-ijev 2,2,2-trifluoroacetat</b>	
<b>Izgled</b>	rumeni kristali
<b>Izkoristek reakcije</b>	14 %
<b>R<sub>f</sub></b>	0,11 <span style="float: right;"><b>MF:</b> etilacetat/methanol= 5/1</span>
<b>T<sub>tal</sub></b>	razpad okrog 230 °C
<b><sup>1</sup>H NMR</b> (400 MHz, aceton- <i>d</i> <sub>6</sub> ): δ (ppm) =	2,40 (t, 2H, <i>J</i> = 5,0 Hz, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 2,92 (t, 2H, <i>J</i> = 5,0 Hz, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 3,08 (t, 2H, <i>J</i> = 5,6 Hz, SO <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> ); 3,13 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 3,31 (t, 2H, <i>J</i> = 5,6 Hz, CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> ); 3,64 (s, 2H, NCH <sub>2</sub> ); 7,74 (s, 1H, Ar-H); 8,04 (rs, 1H, CONH); 8,24 (s, 1H, Ar-H). 3H iz SO <sub>2</sub> NH in NH <sub>2</sub> <sup>+</sup> so izmenjani
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub> ( <i>m/z</i> ): <b>489,0225</b> [M+H] <sup>+</sup> Izmerjena vrednost ( <i>m/z</i> ): <b>489,0229</b>
<b>HPLC</b>	t <sub>R</sub> = 2,918 min

#### 4.2.5 Sinteza 2,4-dikloro-*N*-(3-ciano-6-(3-hidroksibenzil)-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-*c*]piridin-2-il)-5-(*N*-(2-metoksietil)sulfamoil)benzamida (spojina **21**)



Slika 29: Reakcijska shema sinteze spojine **21**

Raztopini spojine **20** (206 mg; 0,421 mmol) v dikloroetanu (5 mL), smo dodali *3-hidroksibenzaldehid* (77,3 mg; 0,632 mmol), *Na(OAc)<sub>3</sub>BH* (223 mg; 1,05 mmol) ter očetno kislino (0,024 mL; 0,421 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo dodali nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (10 mL), nato ekstrahirali z etilacetatom (3 x 5 mL), združene organske faze spirali z nasičeno raztopino NaCl (10 mL) in jih sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po odparitvi topila smo v bučki dobili rumeno viskozno tekočino, za katero se je po TLC analizi izkazalo, da vsebuje še izhodni *3-hidroksibenzaldehid*. Produkt smo izolirali s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo etilacetat/heksan= 2:1. Dobljena čista končna spojina so rumeni kristali.

<b>IUPAC ime</b>	
<b>2,4-dikloro-<i>N</i>-(3-ciano-6-(3-hidroksibenzil)-4,5,6,7-tetrahidrotieno[2,3-<i>c</i>]piridin-2-il)-5-(<i>N</i>-(2-metoksietil)sulfamoil)benzamid</b>	
<b>Izgled</b>	rumeni kristali
<b>Izkoristek reakcije</b>	94 %
<b>R<sub>f</sub></b>	0,19 <span style="float: right;"><b>MF:</b> etilacetat/heksan= 2/1</span>
<b>T<sub>tal</sub></b>	115-118 °C
<b><sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>):</b> δ (ppm) =	2,72 (t, 2H, <i>J</i> = 5,2 Hz, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 2,86 (t, 2H, <i>J</i> = 5,6 Hz, NCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 3,15 (q, 2H, <i>J</i> = 4,8 Hz, SO <sub>2</sub> NHCH <sub>2</sub> ); 3,24 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 3,36 (t, 2H, <i>J</i> = 4,8 Hz, CH <sub>2</sub> OCH <sub>3</sub> ); 3,58 (s, 2H, Ar-CH <sub>2</sub> N); 3,67 (s, 2H, NCH <sub>2</sub> ); 5,69 (t, 1H, <i>J</i> = 5,8 Hz, SO <sub>2</sub> NH); 6,70-6,80 (m, 1H, Ar-H), 6,84-6,87 (m, 2H, Ar-H); 7,16-7,21 (m, 1H, Ar-H); 7,64 (s, 1H, Ar-H); 8,41 (s, 1H; Ar-H). 2H iz OH in NHCO so izmenjani
<b>ESI-HRMS</b>	Izračunano za C <sub>25</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub> (m/z): <b>595,0643</b> [M+H] <sup>+</sup> Izmerjena vrednost (m/z): <b>595,0629</b>
<b>HPLC</b>	t <sub>R</sub> = 4,625 min

## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 Komentari sinteznih postopkov

Večstopenjske sintezne poti, ki so vodile do končnih hidroksietilaminskih in cianotiofenskih spojin, so zahtevale uporabo številnih različnih reagentov ter modifikacij posameznih reakcijskih postopkov, s katerimi smo dosegli dovolj visoke izkoristke. Sintezo hidroksietilaminskih inhibitorjev smo začeli s pripravo ustreznega amina (spojina **6**), nukleofila za nadaljnje regioselektivno odprtje različnih sintentiziranih epoksidov, katerih oksiranski obroč predstavlja glavni sinton za sintezo HEA.

Povsod smo izhajali iz nipekotinske kisline, ki ima dve reaktivni mesti; sintezna pot je zahtevala takojšnjo zaščito njene aminske skupine. Sprva smo se odločili za *terc*-butil karbamatno zaščitno skupino (Boc), vendar sledeča sinteza amidne vezi z DCC in DMAP ni potekla z zadostnim izkoristkom, da bi po odstranitvi zaščitne skupine dobili dovolj želenega amina. Sintezo je bilo potrebno ponovno izvesti, a smo se tokrat odločili za uporabo benzil karbamatne zaščitne skupine (Cbz), pri sintezi amidne vezi pa uporabili alternativne reagente.

Sinteza spojine **12** je obsegla šest sinteznih stopenj, sinteza spojine **15** pa pet sinteznih korakov. Zaradi kompleksnosti samih spojin je bila tako sinteza kot izolacija velikokrat zahtevna.

#### 5.1.1 Uvedba zaščitnih skupin z Boc<sub>2</sub>O in CbzCl na nipekotinsko kislino (sinteza spojin **4** in **7**)

Uvedbi zaščitnih skupin z Boc<sub>2</sub>O in CbzCl sta reakciji N-aciliranja, po mehanizmu nukleofilni substituciji, pri čemer poteče adicija nukleofilne amino skupine na elektrofilni C atom C=O skupine Boc<sub>2</sub>O anhidrida oziroma CbzCl. Nastane tetraedrični intermediat, ki zaradi steričnih ovir okoli kvarternega C atoma in ločitve naboja razpade do estra karbamične kisline (R-NHCOOH), ki se zaradi nestabilnosti pretvori v amin in ogljikov dioksid (34). V prvem primeru smo kot topilo uporabili mešanico dioksana in vode, saj je Boc<sub>2</sub>O topen v dioksanu, nipekotinska kislina, ki jo z dodatkom NaOH pretvorimo v obliko soli (prej se je nahajala v obliki iona dvojčka »zwitterion«), pa v vodi. Topili se popolnoma mešata. Dioksan smo odparili z rotavapiranjem v obliki azeotropa dioksana in vode (dioksan 82,1 %, voda 17,9 %) z vreliščem pri 87,6 °C (35). Odparjeno vodo smo

pred ekstrakcijo ponovno nadomestili. DMF smo uporabili za povečanje topnosti. Dobili smo dober (88 %) izkoristek.

Pri uvedbi benzil karbamatne zaščite smo z raztapljanjem v NaOH poleg tvorbe soli še nevtralizirali HCl, ki je nastajala pri reakciji. Z dodajanjem benzil kloroformata po kapljicah in ledeno kopeljo smo usmerili reakcijo na boljši nuklofil - amino skupino. V dietiletru sta ostala prebitni benzilkloroformat in benzilni alkohol, produkt pa v vodni fazi, še vedno v obliki polarne soli. Z nakisanjem vodne faze s HCl smo spojino **7** pretvorili v protonirano obliko ter tako omogočili njeno ekstrakcijo v organsko fazo. V vodni fazi je ostala nezreagirana raztopljena nipekotinska kislina. Dobili smo visok izkoristek ~ 89 %, primerljiv z uvedbo zaščitne skupine z Boc<sub>2</sub>O.

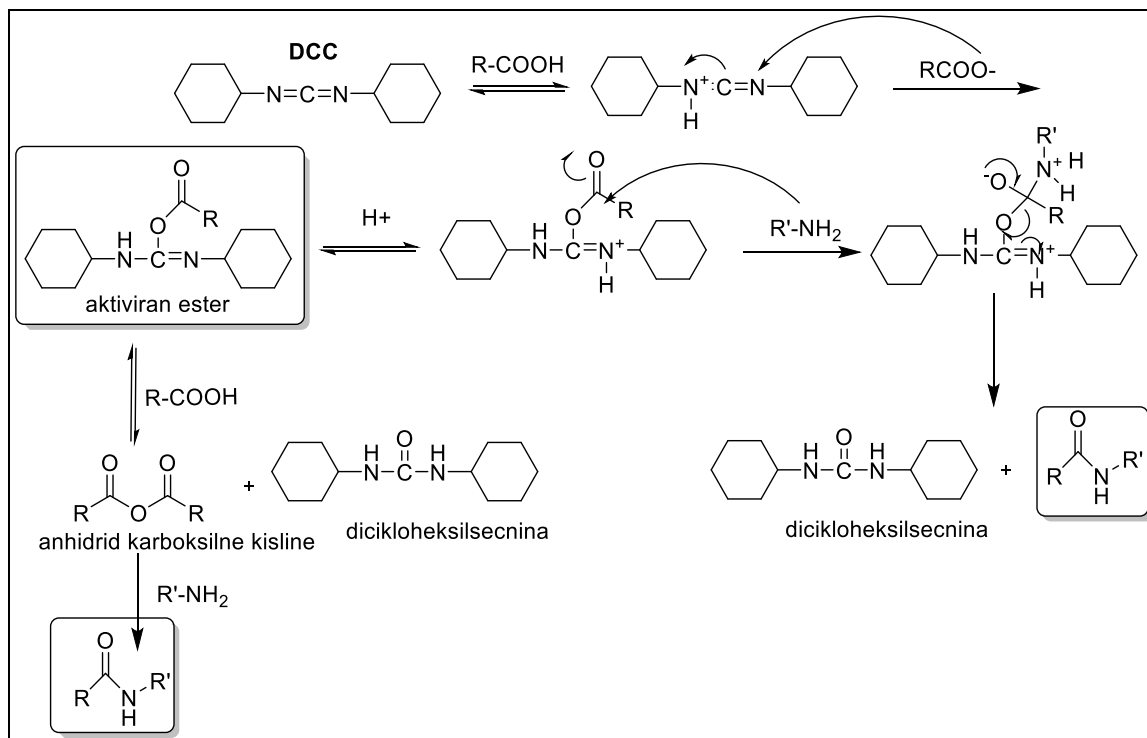
### 5.1.2 Sinteza amidne vezi s sklopitvenimi (angl. »coupling«) reagenti

Druga stopnja sinteze zajema tvorbo amidne vezi med zaščiteni nipekotinsko kislino in triptaminom. S tem, ko pred dodatkom amina s sklopitvenim reagentom (DCC, EDC) aktiviramo karboksilno skupino pri 0 °C, v precejšnji meri zmanjšamo verjetnost poteka stranskih reakcij. Te lahko omejimo tudi s pomočjo pomožnih nukleofilov - katalizatorjev, kot sta DMAP in HOBt, ki jih dodamo v reakcijsko zmes in reagirajo z aktivirano karboksilno kislino hitreje kot se zgodi acilna premestitev; tvorijo se intermediati, ki so še dovolj reaktivni, da lahko pride do sklopitve z aminom (36).

#### 1. DCC/DMAP

Upoštevajoč zgornja dejstva, smo se reakcije sprva lotili z uporabo DCC kot sklopitvenega reagenta in DMAP-a kot katalizatorja. DCC deluje preko aktivacije karboksilata in ima vlogo elektrofila, karboksilat je nukleofil. Možna sta dva mehanizma aktivacije (Slika 30), kar poleg nizke temperature še dodatno poveča hitrost in izkoristek reakcije ter zmanjša možnost nastanka stranskih produktov. S hlajenjem na ledu smo želeli preprečiti stranski reakciji, nastanek gvanidinskega derivata in N-acilsečnine. Po aktivaciji smo dodali DMAP in triptamin. DMAP je katalizator, poveča nukleofilnost C atoma karboksilne kisline in optimizira sintezo amidne vezi, s tem ko skrajša reakcijski čas, zmanjša racemizacijo izhodnih spojin in omeji tvorbo stranskih produktov (37). Poteče nukleofilna adicija DMAP-a na O-acilsečnino in nato nukleofilna substitucija le-tega z aminom. Sledilo je čiščenje s kolonsko kromatografijo, ki ga je oteževala lepljiva in viskozna zmes za nanos, ki je zastajala na stenah kolone in onemogočala samo elucijo. Sklepamo, da je vzrok prisotnost težko hlapnega topila DMF iz prve stopnje reakcije ter same fizikalno-kemijske

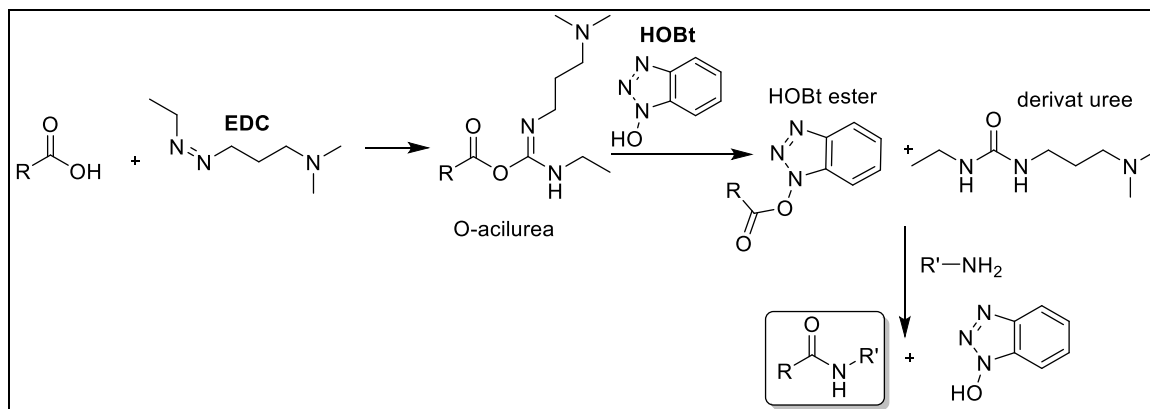
lastnosti nastalih spojin. Zaradi slabega izkoristka (9 %) smo morali ponoviti sintezo amida, tokrat iz izhodne spojine z benzil karbamatno zaščito ter uporabo drugega sklopitvenega reagenta. Zaščitno skupino smo iz spojine **5** odstranili z acidolizo s  $\text{CF}_3\text{COOH}$ .



Slika 30: Prikaz mehanizmov aktivacije karboksilne skupine z DCC; povzeto po (24, 37)

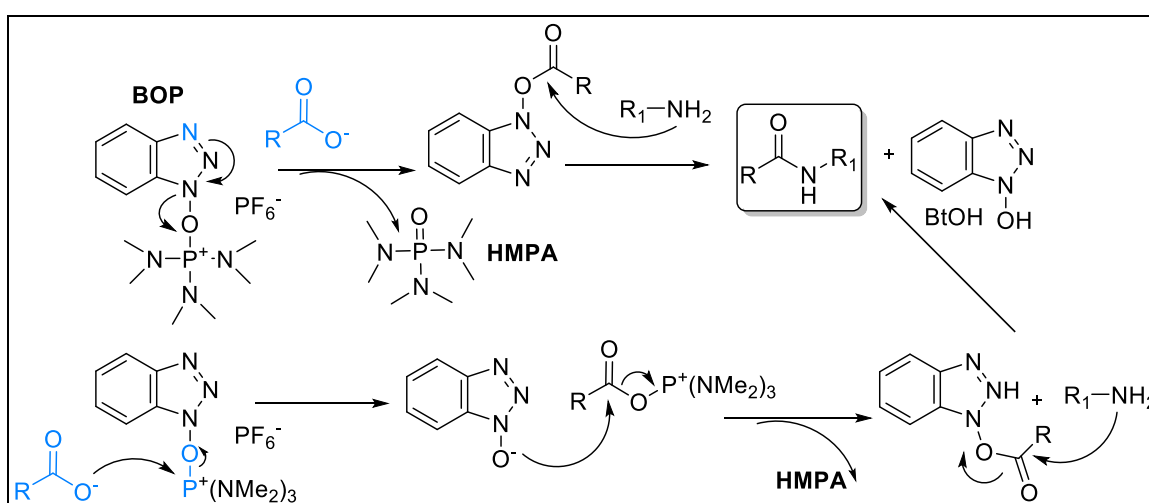
## 2. EDC/ HOBt in BOP

Drugi izbrani potek je obsegal sintezo amidne vezi z uporabo EDC kot sklopitvenega reagenta in benzotriazolnega derivata HOBt kot katalizatorja. Z uporabo EDC nastane v vodi topen stranski produkt, derivat sečnine, ki ga zlahka odstranimo. Aktivna zvrst v raztopini je 1-hidroksibenzotriazolni ester, sledi njegova aminoliza (Slika 31) (37).



Slika 31: Reakcijska shema sinteze amidne vezi z uporabo EDC sklopitvenega reagenta in HOBt (37)

V reakcijski zmesi je kljub uporabi drugega reagenta in druge zaščitne skupine še vedno ostalo ogromno nezreagirane izhodne spojine (razvidno iz TPK analize), kar je kazalo na to, da reakcija ni dobro potekla. Težavo smo poskusili rešiti še z dodatkom BOP-a (benzotriazol-1-il-oksi-tris-(dimetilamino)-fosfonijevega heksafluorofosfata) kot sklopitvenega reagenta, ki se ga sicer v organski sintezi večinoma raje izogibamo, saj pri reakciji nastaja kancerogen stranski produkt, HMPA. Modifikacija sinteznega postopka se je izkazala za ustrezno, saj smo prišli do relativno dobrega, 73 % izkoristka, in dobili dovolj spojine **6** za nadaljnjo sintezo. Možna sta dva mehanizma aktivacije z BOP-om, kar prikazuje Slika 32 (36).



Slika 32: Reakcijska shema aktivacije karboksilne kisline z BOP-om; povzeto po (36)

Sledila je še odstranitev benzil karbamatne zaščite izaminskega dela molekule, kar smo izvedli s hidrogeniranjem ob prisotnosti paladija na ogljiku kot katalizatorja. Reakcija je v vodikovi atmosferi potekala dva dni.

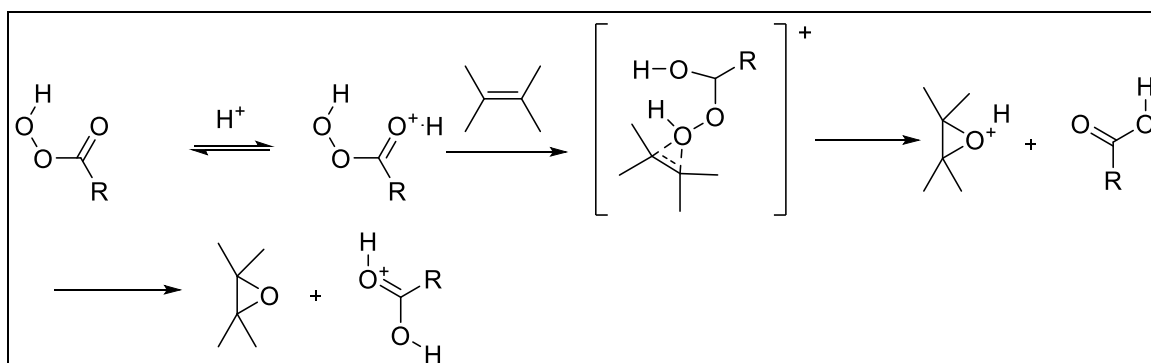
Tvorbe amidnih vezi so potekale 24 ur in morda bi lahko boljše izkoristke dosegli s podaljšanjem reakcijskega časa. Vzrok za slabšo reaktivnost so verjetno elektronske in sterične lastnosti izhodnih spojin. TPK analize so pokazale, da se pri reakcijah tudi nismo povsem uspeli izogniti tvorbi stranskih produktov, do izgub pa je prišlo tudi med samo izolacijo spojin.

### 5.1.3 Sintezni postopek za pripravo epoksida preko oksidacije alkena (spojina **11**)

Za sintezo spojine **11** smo uporabili dvostopenjsko sintezo, pri čemer smo v prvem koraku sklopili *para*-metoksi substituiran benzensulfonil klorid z alilaminom. Gre za reakcijo

nukleofilne substitucije, kjer ima primarna amino skupina vlogo nukleofila, klor pa zaradi negativnega induktivnega efekta še dodatno poveča elektrofilitnost žveplovega atoma. Prebitni alilamin smo po nakisanju s HCl ekstrahirali v vodno fazo.

V drugi stopnji smo sintetizirali spojino **11** z oksidacijo dvojne vezi spojine **10** z *meta*-kloroperoksibenzojsko kislino (*m*-CPBA). Poteče nukleofilni napad  $\pi$ -elektronov alkena preko sigma orbitale peroksi vezi ( $S_N2$ ). Po metodi gostotnih funkcionalov (DFT teoriji) predpostavljeni mehanizem reakcije poteka po »s protonom promovirani« poti. Kisikov atom karbnilne skupine (najbolj elektronegativen atom z najvišjo afiniteto do protona) v *m*-CPBA se protonira, kar močno zniža energijo sigma orbitale peroksi vezi in s tem aktivacijsko bariero epoksidacije. S takšno aktivacijo prej nevtralne kisline, ki v tem procesu odigra vlogo Lewisove baze, se epoksidacija lažje prične in zaključi. Začetni produkt je protoniran epoksid, končni pa je nevtralen (38).

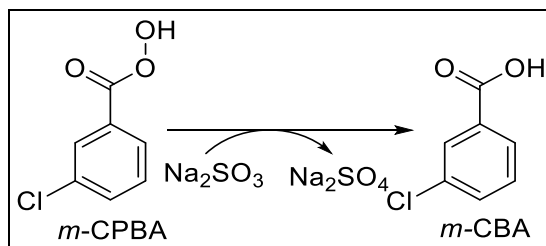


Slika 33: Shematski prikaz mehanizma epoksidacije alkena z *m*-CPBA preko protonacije peroksi kisline; povzeto po (38)

Drugi možni mehanizem je Barlettov »metuljni mehanizem«; ta je splošno sprejet, vendar po kvantnih kemijskih študijah manj verjeten. Vključuje nukleofilni napad  $\pi$ -elektronov dvojne vezi na terminalni elektrofili kisikov atom hidroksiperoksidne skupine s sočasnim intramolekularnim prenosom protona na karboksilni kisik (38).

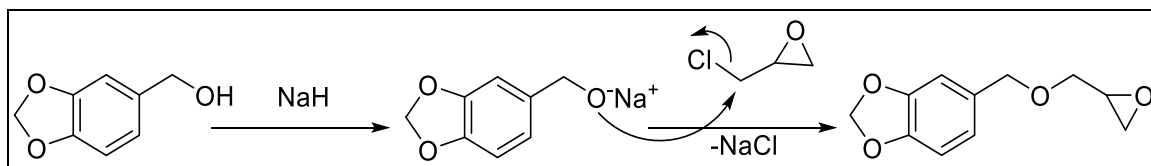
Reakcijo smo izvedli v brezvodnem diklorometanu ob prisotnosti prebitne količine *m*-CPBA (1,2 ekvivalenta). Po končani reakciji smo organsko fazo spirali z vodno raztopino  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ , da smo prebitno množino *m*-CPBA pretvorili v *meta*-klorobenzojsko kislino (*m*-CBA),  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  pa je s sprejetjem kisika hkrati zreagirala do  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . *m*-CBA smo odstranili z ekstrakcijo z nasičeno raztopino  $\text{NaHCO}_3$ .



Slika 34: Pretvorba prebitne *m*-CPBA do *m*-CBA z  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ 

### 5.1.4 Sintezni postopek za pripravo epoksida z O-alkilacijo ( spojina **14**)

Sinteza spojine **14** temelji na Williamsonovi sintezi etrov (39). NaH je močna baza, s katero smo tvorili sol na sicer slabo reaktivni OH skupini in jo s tem aktivirali za sledečo reakcijo nukleofilne substitucije  $\text{S}_{\text{N}}2$ . Dodatek epiklorhidrina v reakcijo je eksotermen, zato smo ga dodajali po kapljicah in s tem preprečili preveliko zvišanje temperature, ob katerem bi bila možnost tvorbe stranskih produktov, predvsem odprtja epoksidnega obroča z aktiviranim alkoholom, večja. Visoka vnetljivost natrijevega hidrida ter njegova burna reakcija ob stiku z vodo zahteva popolno odsotnost le-te, zato smo kot topilo uporabili sveže predestiliran brezvodni THF, bučko pa pred njegovim dodatkom prepihali z argonom, s čimer smo ustvarili inertno atmosfero. Z dodatkom etra 15-krona-5, cikličnega pentamera etilenoksida in poznane katalizatorja faznega prenosa, smo po aktivaciji OH skupine (pretečeni prvi stopnji) odtegnili  $\text{Na}^+$  ione iz aktivirane hidroksilne skupine in tako še dodatno povečali nukleofilnost kisika ter olajšali nukleofilni napad. Eter namreč deluje tako, da kompleksira natrijeve katione (40).

Slika 35: Sinteza spojine **14** preko Williamsonove sinteze etrov (42)

Reakcijski zmesi smo dodali tudi tetra-*N*-butilamonijev jodid ( $\text{Bu}_4\text{NI}$ ), saj je dokazano, da O-alkilacijske reakcije ob njegovi prisotnosti potekajo bistveno hitreje (41, 42). Gre za katalizator faznega prenosa, s katerim smo sprva zagotovili boljše topnost NaH, reaktanta ionske narave, v nepolarnem topilu. V nadaljevanju predpostavljamo, da poteče substitucija klorovega atoma epiklorhidrina z jodidnim ionom, ki je še boljše izstopajoča skupina od klora, kar olajša nukleofilni napad in pospeši reakcijo. Izkoristek reakcije je bil relativno dober  $\sim 77\%$ .

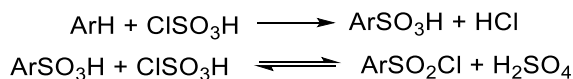
### 5.1.5 Sinteze končnih hidrksietiaminov **12** in **15**

Končni spojini **12** in **15** smo pripravili z mikrovalovno sintezo odpiranja epoksidnega obroča z ustreznim sekundarnim aminom. Opisani sintezni pristop, z uporabo kalcijevega trifluorometansulfunata ( $\text{Ca}(\text{OTf})_2$ ) kot katalizatorja, velja za enega izmed najnovejših in redkih učinkovitih sinteznih postopkov hidroksietilaminskih izosterov (43, 44). Reakcijski zmesi smo izpostavili naslednjim pogojem: moči 50 W, času 20 min in temperaturi 120 °C. Kot topilo smo uporabili brezvodni dioksan, saj bi prisotnost vode ali baze že v sledovih precej vplivala na reakcijski profil (kot nukleofila lahko odpirata epoksidni obroč) in znižala izkoristke. Izrazito nepolarno topilo je za mikrovalove skoraj transparentno ( $\tan\delta$  (dioksan) < 0,01), zato z uporabo katalizatorja v obliki soli ustvarimo mesta z električnim poljem, na katerih poteka reakcija. Predvideno je, da ima kation ( $\text{Ca}^{2+}$ ), ki tvori koordinativne vezi z oksiranskim kisikom, vlogo Lewisove kisline, anion pa je pomemben za topnost v dioksanu (43, 44). Z mikrovalovno sintezo smo uspeli znatno skrajšati reakcijske čase, omogočila nam je izvedbo reakcije pri temperaturi višji od vrelišča topila ( $T_{\text{vrei}}(\text{dioksan}) = 101 \text{ °C}$ ) (45). Zagotovili smo precej bolj homogeno segrevanje, kot bi ga pri sintezi s klasičnim segrevanjem na oljni kopeli. V reakcijo smo vstopili z 0,1 ekvivalentno prebitno množino amina, ki smo ga na koncu odstranili s kolonsko kromatografijo. Po mehanizmu je reakcija nukleofilna substitucija in poteka regioselektivno na sterično manj oviran elektrofilni epoksidni C-atom. Končni spojini **12** in **15** imata po dva kiralna centra in iz razmerja integralov pri  $^1\text{H-NMR}$  spektru lahko opazimo prisotnost dveh diastereoizomerov v ekvimolarnem razmerju. Izkoristki kljub optimiziranim pogojem niso bili visoki (40 % in 24 %). Vzrok lahko pripišemo velikim steričnim oviram, saj smo reakcijo odpiranja epoksidnega obroča izvajali s sekundarnim obročnim aminom (piperidinom), ki ima na meta poziciji verigo z velikim obročnim indolnim substituentom.

Potrebno je bilo izvesti nadaljnje čiščenje s kolonsko kromatografijo, ki je bilo zaradi visoke lipofilnosti spojin, prisotnosti diastereoizomerov in stranskih produktov precej zahtevno in dolgotrajno. Glede na to, da je bila to zadnja stopnja v naši sintezi, smo dobili dovolj čistih končnih spojin (dosegle so ustrezno čistost nad 95 %) za izvedbo nadaljnjih analiz in testiranj.

### 5.1.6 Sinteza spojine **21**

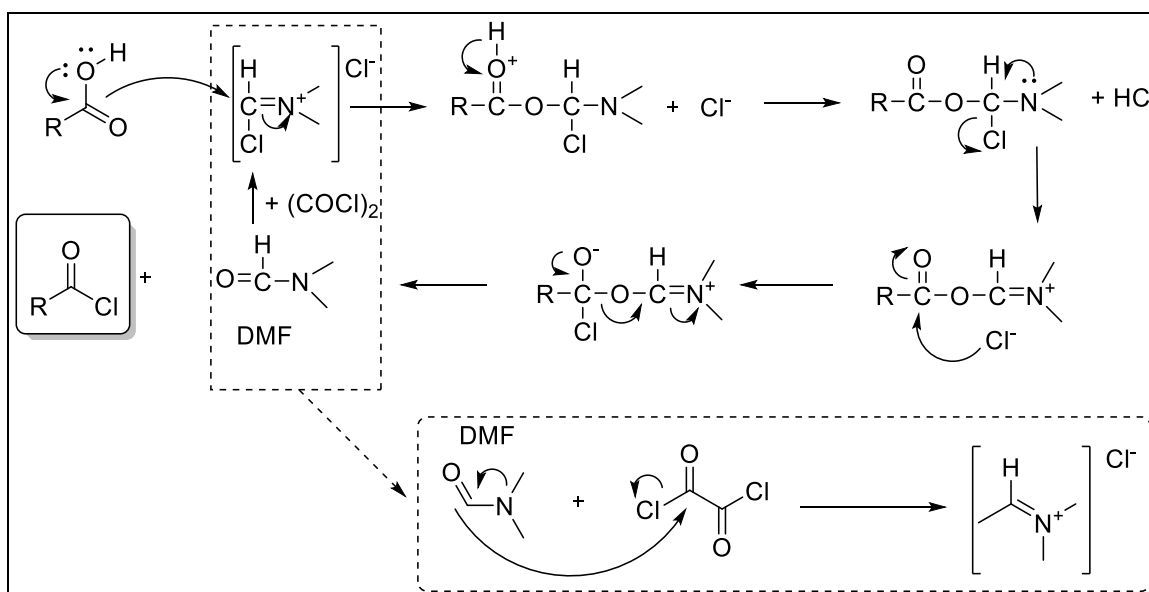
Sinteza spojine **21** je petstopenjska. V prvi stopnji smo izvedli klorosulfoniranje aromatskega obroča, ki je poteklo z visokim 81 % izkoristkom. Po mehanizmu gre za reakcijo elektrofilne aromatske substitucije, predpostavljeni mehanizem je dvostopenjski (46):



Za zagotovitev optimalnih reakcijskih pogojev smo uporabili šestkratni prebitek klorosulfonske kisline in pospešili reakcijo z ustrezno zvišano temperaturo (140 °C). Karboksilna skupina namreč z negativnim mezomernim učinkom deaktivira aromatski sistem, predvsem na *orto* in *para* mestu, kar zmanjša hitrost reakcije (47). Tako klorosulfoniranje preferenčno poteka na želeni *meta* poziciji. Tudi klorova atoma sta deaktivatorja, in sicer zaradi negativnega induktivnega efekta odtegneta elektronsko gostoto iz  $\pi$ -aromatskega sistema. Prebitna kislina pospeši reakcijo, saj je druga stopnja, ki je odločilna za njeno hitrost, ravnotežna. Reakcijsko zmes smo po končani reakciji zlili v čašo z ledom in na ta način prebitno  $\text{ClSO}_3\text{H}$  hidrolizirali v plinasto  $\text{HCl}$  in  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Potek reakcije je bil zelo eksotermen in buren, sproščena toplota se je porabila za taljenje ledu. Produkta ni bilo potrebno čistiti - izpadel je v obliki bele oborine takoj po zlitju na led, izolirali smo ga s filtracijo z odesavanjem in dobili bele kristale. Druga stopnja (sinteza spojine **17**) je reakcija nukleofilne substitucije (reakcijski mehanizem je enak kot pri sintezi spojine **10**). Nastalo  $\text{HCl}$  smo nevtralizirali z  $\text{Et}_3\text{N}$ , DMAP pa smo uporabili kot katalizator, ki hkrati sodeluje tudi pri nevtralizaciji nastale kisline.

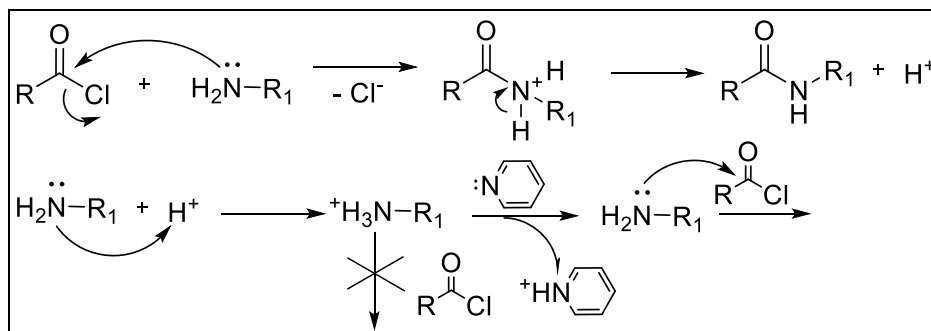
Tretja stopnja sinteze obsega tvorbo amidne vezi s predhodno aktivacijo karboksilne skupine kisline s pretvorbo do reaktivnejšega kislinskega klorida. Pretvorba karboksilne kisline v kislinski klorid z oksalil kloridom je pogosto katalizirana z DMF in verjetno je, da  $(\text{COCl})_2$  in DMF najprej zreagirata do Vilsmeier-Haackovega reagenta, ki se razlikuje od klasičnega Vilsmeier-Haackovega intermedijata med DMF in  $\text{POCl}_3$  (običajna uporaba v primeru tvorbe arilnega aldehida) le v vrsti aniona: kation je tu povezan s kloridnim anionom, v klasični reakciji pa z diklorofosfatnim. Nato karboksilna kislina reagira z ogljikom iminijevega kationa v reakciji nukleofilne substitucije, izstopi klor. Nadalje po adiciji kloridnega iona na karbonilno skupino in sledeči eliminaciji DMF nastane kislinski

klorid (37). Oksalil klorid smo zaradi burnega poteka reakcije dodajali s pomočjo kapalnika, opremljenega s klorkalcijevo cevko (brezvodni pogoji), nad reakcijsko zmesjo.



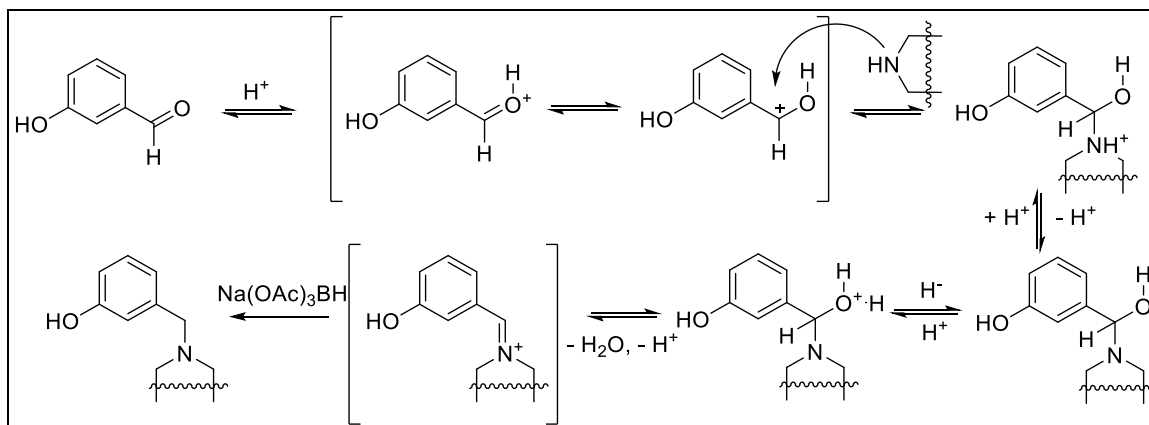
Slika 36: Prikaz mehanizma tvorbe kislinskega klorida z  $(\text{COCl})_2$  in DMF; povzeto po (37)

DMF je težko hlapno topilo, zato predvidevamo, da ga je del ostal v zmesi nanosa za kolono, kar je oteževalo samo ločbo. Prav tako je verjetno vzrok za tvorbo emulzije med ekstrakcijo, kar je posledično vplivalo tudi na izkoristek (43 %). Reakcija sinteze amidne vezi s kislinskimi kloridi poteka veliko hitreje kot reakcije s sklopitvenimi reagenti, saj so kislinski kloridi reaktivnejši, karbonylna skupina je bolj polarizirana in nukleofilni napad amina posledično lažji. Piridin, v mešanici z diklorometanom, smo s kapalnikom med drugo stopnjo reakcije postopno dodajali v reakcijsko zmes. Piridin ima vlogo baze za nevtralizacijo nastale  $\text{HCl}$ , vlogo topila in katalizatorja hkrati, saj bi se v kislem  $\text{NH}_2$  skupina protonirala in izgubila nukleofilnost. Po mehanizmu je sinteza modificirana Schotten-Baumannova reakcija, le-ta izvorno poteka z mešanico vodne raztopine baze z organskim topilom.



Slika 37: Mehanizem Schotten-Baumannove reakcije, druge stopnje sinetze spojine **19**; povzeto po (48)

V četrti stopnji smo odstranili Boc-zaščitno skupino s trifluoroocetno kislino. Zadnja, peta stopnja, je po mehanizmu direktno reduktivno aminiranje, kar pomeni, da smo reakcijo izvedli v eni sami stopnji: istočasno smo zmešali amin in aldehyd z reducentom, brez predhodne ločene tvorbe intermediata imina oziroma iminijeve soli. Izbira reducenta je v takšnih primerih ključnega pomena za uspeh reakcije, saj mora reducirati imin/iminijev kation selektivno v prisotnosti aldehyda pod istimi reakcijskimi pogoji. Uporabili smo triacetoksiborhidrid, reagent prve izbire po literaturnih virih (49). V prvem koraku gre za tvorbo imina (Schiffove baze), oziroma iminijevega kationa, saj smo v reakcijo vstopili s sekundarnim aminom. Poteče nukleofilna adicija amina na karbonilno skupino aldehyda s sledečim prenosom protona iz dušika na kisik preko nestabilnega hemiaminala. Z nadaljnjo eliminacijo vode, sta možni dve poti; nastanek iminijevega kationa ali pa neposredna redukcija karbinolamina do produkta (49). Z dodatkom očetne kisline smo zagotovili optimalen, rahlo kisel pH (okrog 5), saj je, razvidno iz spodnje sheme, reakcija tvorbe imina kislinsko katalizirana. Reakcije so, z izjemo redukcije, v celoti ravnotežne, torej jih z odstranjevanjem vode iz reakcijske zmesi lahko premaknemo v smer nastajanja produktov. To smo tudi storili z dodatkom molekularnih sit v reakcijsko zmes. Reakcija je potekla z izvrstnim, skoraj kvantitativnim izkoristkom.



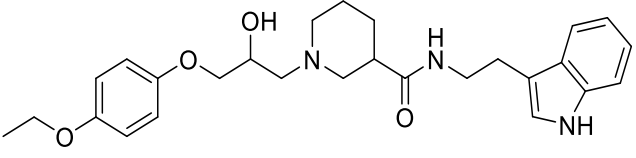
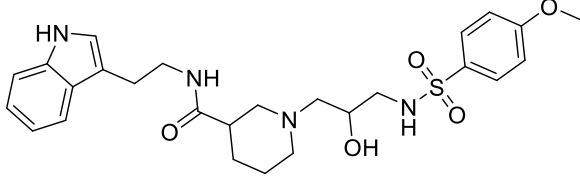
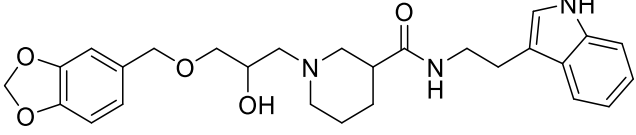
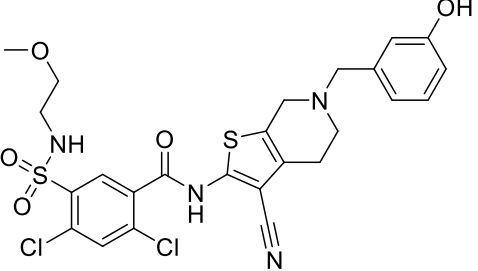
Slika 38: Mehanizem tvorbe amina z direktnim reduktivnim aminiranjem (49)

## 5.2 Biokemično testiranje

Sintetizirane končne spojine smo ovrednotili glede na inhibicijo posameznih encimov MurC, D in F z modificirano metodo malahitno zelenega barvila (Biomol Green® reagent). Bolj kot je bila spojina aktivna, manjša je bila katalitična aktivnost encima in manj prostega fosfata se je sprostilo. Posledično je nastalo manj fosfomolibdata in manj kompleksa med fosfomolibdatom in malahitno zelenim, kar je pomenilo manjšo izmerjeno absorbanco. Rezultati so predstavljeni v odstotkih kot rezidualne aktivnosti (RA), ki predstavljajo razmerje med aktivnostjo encima ob prisotnosti inhibitorja in aktivnostjo encima brez njegove navzočnosti. Za spojino, ki je imela RA nižjo od 50 %, smo izmerili rezidualne aktivnosti še pri sedmih različnih koncentracijah zaviralca in izračunali IC<sub>50</sub> vrednost, koncentracijo, pri kateri je rezidualna aktivnost 50 %.

### 5.2.1 Rezultati biokemičnih testiranj

Preglednica IV: Prikaz rezultatov testiranj

STRUKTURNA FORMULA IN OZNAKA SPOJINE	RA (%) (koncentracija spojine v testu)		
	MurC	MurD	MurF
<b><i>Hidroksietilaminski inhibitorji encimov MurC, D, F</i></b>			
 <p style="text-align: center;"><b>1</b></p>	52 <b>(500 μM)</b>	69 <b>(500 μM)</b>	65 <b>(500 μM)</b>
 <p style="text-align: center;"><b>12</b></p>	52 <b>(500 μM)</b>	67 <b>(500 μM)</b>	88 <b>(100 μM)</b>
 <p style="text-align: center;"><b>15</b></p>	ni bilo testirano	ni bilo testirano	91 <b>(100 μM)</b>
<b><i>Cianotiofenski inhibitor encima MurF</i></b>			
 <p style="text-align: center;"><b>21</b></p>	<p style="text-align: center;">17 <b>(100 μM)</b> <b>IC<sub>50</sub> = 15,7 μM</b></p>		

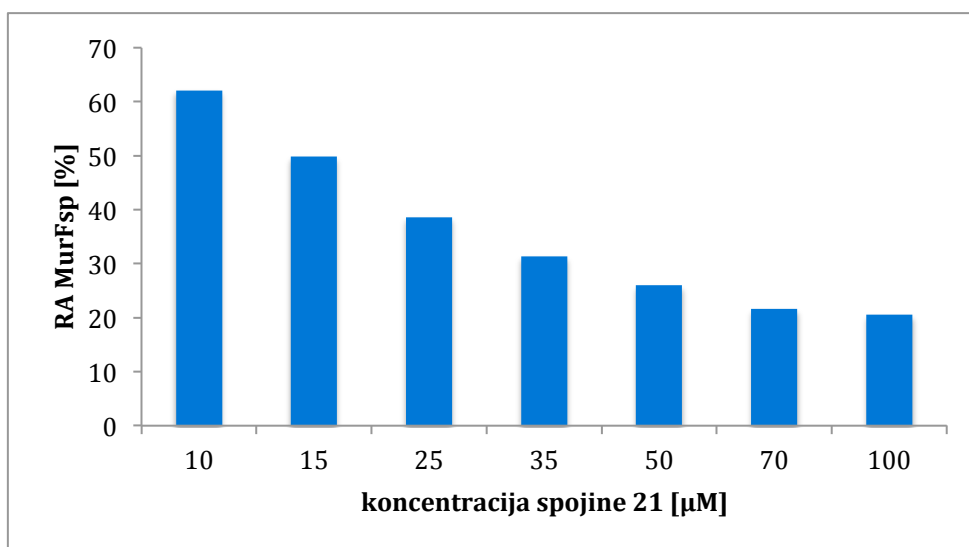
### 5.2.2 Ovrednotenje rezultatov biokemičnih testiranj

Pri sintezi hidroksietilaminskih analogov smo izhajali iz spojine **1**, ki je bila zadetek rešetanja knjižnjice spojin na Fakulteti za farmacijo (rezultati so prikazani v Preglednici IV). Osredotočili smo se na sintezo zaviralcev encima MurC. Spojini **12** in **15** sta bili sintetizirani z namenom oponašanja visokoenergetskega tetraedričnega intermedata prehodnega stanja, vendar smo zaradi podobnega reakcijskega mehanizma in strukture encimov, biokemično testiranje izvedli še na encimih MurD in MurF. Zaželjeno bi bilo namreč sintetizirati multiple zaviralce, ki se vežejo na več kot eno tarčo. Dokazano je, da imajo ti v kompleksnih sistemih potencirano učinkovitost, kljub temu da število interakcij s proteinom ostane nespremenjeno ter manjšo možnost razvoja rezistence (16). Nipekotinsko kislino smo uporabili kot rigidiziran analog  $\beta$ -alanina, ki ima za en C atom daljši distančnik med amino in karboksilno skupino kot substrat encima MurC, s čimer smo posnemali peptidni del prehodnega stanja. Ugotovili smo, da zamenjava etoksi substitucije fenilnega obroča za metoksi skupino (spojina **12**) značilno ne vpliva na zaviralno delovanje, saj sta obe skupini elektrondonorski. Iz rezultatov vidimo, da je aktivnost primerljiva s spojino **1**, in sicer rezidualna aktivnost za encim MurC znaša 52 % (enako kot pri spojini **1**) in 67 % za encim MurD pri koncentracijah 500  $\mu$ M. Testiranje na encimu MurF je bilo izvedeno pri koncentraciji 100  $\mu$ M, a se je njegova aktivnost zmanjšala le za 12 %, kar ne preseneča glede na manjšo strukturno podobnost z ostalima encimoma. Vidimo, da sulfonamidni povezovalci lahko nadomesti etrskega od izhodne spojine brez značilnega vpliva na delovanje, pripomore pa k večji polarnosti spojine, kar je zaželjeno. Za spojino **15**, ki se od spojine **1** strukturno razlikuje le malenkostno, in sicer po 3,4-(metilendioksi)-benzilnem fragmentu, testiranja še potekajo. Pri nadaljnjem razvoju bi bilo potrebno sintetizirati še več derivatov ter ugotoviti za delovanje bistvene strukturne fragmente. Zaželjeno bi bilo zmanjšati velikost molekul, s čimer bi se lahko izognili velikim lipofilnim delom molekul, s tem pa bi povečali polarnost in topnost v vodnem mediju ter omogočili prehajanje čez membrane, kar bi lahko vodilo do protibakterijskega delovanja. Spojini **12** in **15** tako predstavljata obetavno izhodišče za nadaljnji razvoj.

Pri načrtovanju cianotiofenskega derivata, katerega sinteza je opisana v magistrskem delu, smo izhajali iz prejšnjih poznanih struktur cianotiofenskih inhibitorjev. Za izhodišče smo si izbrali spojino **2**, ki ima hidroksi skupino na *meta* mestu benzilnega obroča in zaviralno delovanje proti MurF<sub>Sp/Ec</sub> v nizkem mikromolarnem območju, hkrati pa kaže tudi šibko

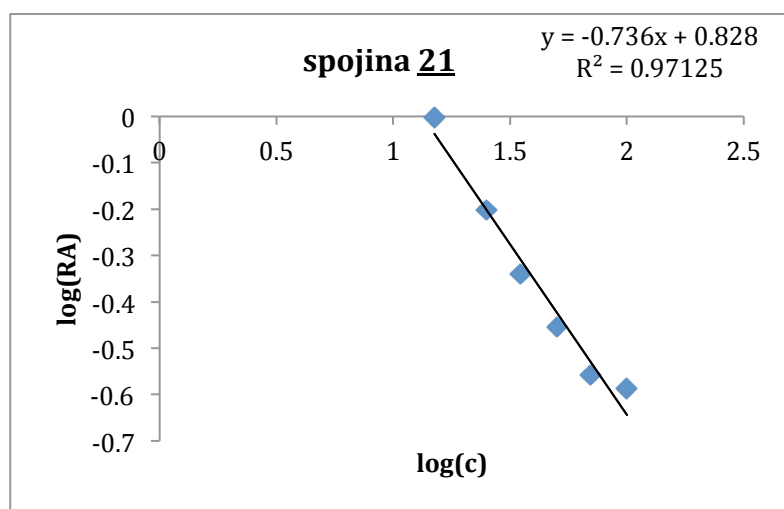


protibakterijsko delovanje. Pri spojini **21** smo ohranili sulfonamidni fragment in klor na aromatskem obroču, ki sta zaradi interakcij z vezavnim mestom dokazano pomembna za inhibicijo MurF<sub>Sp</sub> (13). Morfolinski obroč smo nadomestili z manj rigidno 1-metoksietilensko strukturo, z namenom, da proučimo njegovo vlogo pri zaviralnem delovanju. Vemo, da morfolinski kisik pripomore k dodatnim interakcijam med učinkovino in encimom s tvorbo vodikovih vezi s stransko verigo Asn137 in amidom skeleta Gly140 (26). Dva ogljikova atoma dolg distančnik ohrani kisikov atom na primerni razdalji, podobni kot pri morfolinskem obroču, da še vedno omogoči tvorbo vodikovih vezi z vezavnim mestom encima. Ohranili smo tudi podaljšan obročni sistem (*meta*-hidroksifenilni substituent na mestu 6), ki dokazano znatno izboljša zaviralno delovanje proti MurF<sub>Sp</sub> in izboljša delovanje tudi proti drugim MurF ortologom (13). Za *meta* pozicijo OH skupine smo se odločili zaradi dobrega protibakterijskega delovanja spojine **2** z enakim substituentom, kljub temu da je bila spojina s hidroksi skupino na *para* poziciji močnejši zaviralec. S testiranjem smo dokazali, da je spojina **21** še vedno zaviralec encima MurF<sub>Sp</sub>, in sicer pri koncentraciji 100 μM zmanjša njegovo aktivnost na 17 %. Zaviralno delovanje smo testirali tudi znotraj širšega koncentracijskega območja, kar grafično prikazuje Slika 39. Izračunana IC<sub>50</sub> vrednost, ki znaša 15,7 μM, je višja kot v primeru rigidnejšega morfolinskega obroča, vendar ohrani mikromolarni velikostni razred in uvršča sintetizirano spojino med enega boljših do sedaj znanih inhibitorjev encima MurF. Dokazali smo torej, da je nadomestitev morfolinosulfonilnega fragmenta z manj rigidnim 2-metoksietilsulfonilnim za delovanje manj ugodna, a še vedno ohrani zaviralno delovanje v nizkem mikromolarnem območju. Z nadaljnjimi raziskavami bi bilo zanimivo ovrednotiti tudi protibakterijsko delovanje sintetizirane spojine.



Slika 39: Prikaz rezidualne aktivnosti (RA) encima MurF<sub>Sp</sub> v odvisnosti od koncentracije spojine **21**

Iz grafa (Slika 40) lahko razberemo, da gre za linearno povezanost aktivnosti encima s koncentracijo inhibitorja **21** ( $p = 0,00031$ ), kar nam potrjuje visok Pearsonov koeficient korelacije ( $r = 0,98552$ ). Linearnost je znak specifičnega delovanja sintetizirane spojine.



Slika 40: Prikaz linearne odvisnosti logaritamskih vrednosti RA od logaritamskih vrednosti koncentracij spojine **21**

V prihodnosti bi bilo smiselno sintetizirati še spojino z 2-hidroksietilsulfonilnim fragmentom namesto 2-metoksietilsulfonilnega, saj bi z nesubstituirano OH skupino povečali polarnost, hkrati pa bi se izognili amskim in gvanidinskim strukturam druge generacije, ki bi lahko vodile do nespecifičnega uničenja membrane.

Sintetizirane spojine imajo precej visoko molekularno maso, spojina **12** 514,2 g/mol in **21** 595,2 g/mol, kar presega mejo 500 g/mol in ni v skladu s pravili Lipinskega. Res je, da pravilo sistematično uskladi fizikalno-kemijske lastnosti s peroralno biorazpoložljivostjo in predvidi uspešnost uveljavitve začetnih zadetkov in spojin vodnic ter posledične težave in izključitvene možnosti med predkliničnim in kliničnim razvojem, vendar pa so protibakterijske učinkovine že od nekdanj izjema teh pravil, saj delujejo na bakterijske celice, ki se v zgradbi razlikujejo od človeških. Fizikalno-kemijske lastnosti morajo biti ustrezne, da spojine ohranijo biorazpoložljivost, hkrati pa edinstvene in drugačne za prehod v nečloveške celice. Protibakterijske spojine imajo običajno višjo molekularno maso v primerjavi z drugimi poznanimi učinkovinami, sprejemljiva je meja 600 g/mol, pri kateri je mogoč tudi prehod skozi porine in delovanje tudi na G<sup>-</sup> bakterije (50, 51). V prihodnjih raziskavah bi bile potrebne še dodatne strukturne spremembe, predvsem povečanje polarosti (to bi dosegli z zmanjšanjem velikosti molekul in/ali vgraditvijo hidrofilnih funkcionalnih skupin v molekule) in s tem izboljšanje topnosti v vodi ter zmanjšanje tendence po precipitaciji. Manjša lipofilnost je še posebej pomembna za delovanje na G<sup>-</sup> bakterije, saj le spojine z zadostno hidrofilnostjo lahko prehajajo porine v bakterijski celični steni.

## 6 SKLEP

Z naraščujočo rezistenco bakterij na obstoječa protimikrobna zdravila postaja sinteza novih strukturnih razredov učinkovin in iskanje novih tarč pomembno raziskovalno področje. V okviru magistrske naloge smo sintetizirali hidroksietilaminska analoga in cianotiofenski analog kot potencialne nove zaviralce ligaz MurC, D in F (encimov ključnih za preživetje širokega spektra bakterij) ter izvedli biološka testiranja na posameznih encimih, s čimer smo ovrednotili zaviralno delovanje sintetiziranih spojin.

1.) Uspelo nam je sintetizirati dva končna hidroksietilaminska derivata spojine **1** (spojini **12** in **15**) kot mimetika prehodnega stanja. Sinteza hidroksietilaminskega fragmenta je obsegala regioselektivno odpiranje epoksidnega obroča, pripravljenega iz alilaminskega derivata z oksidacijo z *m*-CPBA ali preko O-alkiliranja ustreznega fenola, s predhodno sintetiziranim aminom ob prisotnosti mikrovalov in katalizatorja Ca(OTf)<sub>2</sub>.

2.) Uspešno smo sintetizirali tudi cianotiofenski zaviralec (spojina **21**). Petstopenjska sintezna pot je med drugim obsegala postopek klorosulfoniranja, sintezo amidne vezi preko tvorbe kislinskega klorida in uvajanje dodatnega obočnega sistema z reakcijo redukativnega aminiranja.

3.) Z biokemičnim testiranjem smo ovrednotili zaviralno delovanje končnih spojin na encimih MurC, MurD in MurF<sub>sp</sub>. Z novim analogom (spojina **12**) nam je uspelo doseči primerljivo inhibicijo encimov MurC in MurD s spojino **1**. Za najmočnejši zaviralec encima MurF<sub>sp</sub> se je izkazal cianotiofenski derivat (spojina **21**) z IC<sub>50</sub> vrednostjo 15,7 μM.

Zaključimo lahko, da sintetizirana HEA derivata pripomoreta k boljšemu razumevanju odnosa med strukturo in delovanjem, vendar bi bilo potrebno sintetizirati še več spojin, da bi lahko ohranili le za delovanje bistvene fragmente. V prihodnosti se je potrebno osredotočiti predvsem na povečanje polarnosti in s tem izboljšati topnosti v vodnem mediju ter omogočiti prehod čez membrane. Sintetizirano spojino **21** lahko uvrstimo med močne mikromolarne cianotiofenske inhibitorje encima MurF. S postopno strukturno modifikacijo in optimizacijo ima ta na novo razvijajoči se strukturni razred zaviralcev ligaz Mur pomembno vlogo pri razvoju novih protibakterijskih učinkovin, ki zavirajo biosintezo peptidoglikana.

## 7 LITERATURA

- 1.) Tomažič J., Strle F. s sodelavci: Infekcijske bolezni Zdrženje za infektologijo, Slovensko zdravniško društvo, Ljubljana, 2014/2015: 41-47.
- 2.) [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/112642/1/9789241564748_eng.pdf)  
Antimicrobial resistance- Global Report on Surveillance 2014, WHO (7. 12. 2014, 12:08)
- 3.) Walsh C. T., Wencewicz A. T.: Prospect for new antibiotics: a molecule centered perspective. *The Journal of Antibiotics*, 2014; 67: 7-22.
- 4.) Fischbach M. A., Walsh C. V.: Antibiotics for Emerging Pathogens. *Science* 2009; 325: 1089-1093.
- 5.) Mendes R. E., Deshpande L. M., Jones R. N.: Linezolid update: Stable in vitro activity following more than a decade of clinical use and summary of associated resistance mechanisms. *Drug Resistance Updates* 2014; 17(1-2): 1-12.
- 6.) Jones R. N., Holliday N. M., Rhomberg P. R.: Validation of a Commercial Dry-Form Broth Microdilution Device (Sensititre®) for Testing Tedizolid, a New Oxazolidinone. *Journal of Clinical Microbiology* 2014; 2014: article ID 7505564.
- 7.) Gubina M., Ihan A.: *Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi*, Ljubljana, 2002: 3-15, 33-48.
- 8.) Alekshun M. N., Levy S. B.: Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell* 2007; 128: 1037-1050.
- 9.) Davies J., Davies D.: Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2010; 74 (3): 417-433.
- 10.) Kohanski M. A., DePristo M. A., Collins J. J.: Sublethal Antibiotic Treatment Leads to Multidrug Resistance via Radical-Induced Mutagenesis. *Molecular Cell* 2010; 37: 311-320.
- 11.) Barreteau H., Kovač A., Boniface A., Sova M., Gobec S., Blanot D.: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews* 2008; 32: 168-207.
- 12.) Clyde A. S.: Structure, Function and Dynamics in the Mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases. *Journal of Molecular Biology* 2006; 362: 640-655.
- 13.) Hrast M., Turk S., Sosic I., Knez D., Randall C. P., Barreteau H., Contreras-Martel C., Dessen A., O'Neill A. J., Mengin-Lecreulx D., Blanot D., Gobec S.: Structure-activity relationships of new cyanothiophene inhibitors of the essential peptidoglycan

- biosynthesis enzyme MurF. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2013; 66: 32-45.
- 14.) Hrast M., Anderluh M., Knez D., Randall P. C., Barreateau H., O'Neill J.A., Blanot D., Gobec S.: Design, synthesis and evaluation of second generation MurF inhibitors based on a cyanotiophene scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2014; 73: 83-96.
- 15.) Sova M., Kovač A., Turk S., Hrast M., Blanot D., Gobec S.: Phosphorylated hydroxyethylamines as novel inhibitors of bacterial cell wall biosynthesis enzymes MurC to MurF. *Bioorganic Chemistry* 2009; 37: 217-222.
- 16.) Tomašić T., Kovač A., Klebe G., Blanot D., Gobec S., Kikelj D., Peterlin L. M.: Virtual screening for potential inhibitors of bacterial MurC and MurD ligases. *Journal of Molecular Modeling* 2012; 18: 1063-1072.
- 17.) Šink R., Barreateau H., Patin D., Mengin-Lecreux D., Gobec S., Blanot D.: MurD enzymes: some recent developments. *BioMol Concepts* 2013; 4 (6): 539-556.
- 18.) Gautam A., Vyas R., Tewari R.: Peptidoglycan biosynthesis machinery: A rich source of drug targets. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2011; 31(4): 295-336.
- 19.) Bugg T. D., Braddick D., Dowson C. G., Roper D. I.: Bacterial cell wall assembly: still an attractive antibacterial target. *Trends in Biotechnology* 2011; 29 (4): 167-73.
- 20.) Zidar N., Tomašić T., Šink R., Kovač A., Patin D., Blanot D., Contreras-Martel C., Dessen A., Premru M. M., Zega A., Gobec S., Mašič L. P., Kikelj D.: New 5-benzylidenethiazolidin-4-one inhibitors of bacterial MurD ligase: Design, synthesis, crystal structure and biological evaluation. *European Journal of Medicinal Chemistry* 2011; 46: 5512-5523.
- 21.) Perdih A., Hrast M., Barreateau H., Gobec S., Wolber G., Solmajer T.: Benzene-1,3-dicarboxylic acid 2,5-dimethylpyrrole derivatives as multiple inhibitors of bacterial Mur ligases (MurC–MurF). *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2014; 22: 4124-4134.
- 22.) Kouidmi I., Levesque R. C., Paradis-Bleau C.: The biology of Mur ligases as an antibacterial target. *Molecular Microbiology* 2014; 94 (2), 242-253.
- 23.) 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 and Medicinal Chemistry* 2009; 17: 1884-1889.
- 24.) 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: 3240-3247.
- 25.) 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; 52: 4420-4426.
- 26.) Stamper G. F., Longenecker L. K., Fry E. H., Jakob C. G., Florjančič A. S., Gu Y. - G., Anderson D. D., Cooper C. S., Zhang T., Clark R. F., Cia Y., Black-Schaefer C. L., McCall J. O., Lerner C. G., Hajduk P. J., Beutel B. A., Stoll V. S.: Structure-based Optimization of MurF Inhibitors. *Chem. Biol. Drug Des.* 2006; 67: 58-65.
- 27.) Schramm V. L.: Enzymatic transition states and transition state analogues. *Current Opinion in Structural Biology* 2005; 15: 604-613.
- 28.) Sova M., Čadež G., Turk S., Majce V., Polanc S., Batson S., Lloyd A. J., Roper D. I., Fishwick C. W. G., Gobec S.: Design and synthesis of new hydroxyethylamines as inhibitors of D-alanyl-D-lactate ligase (VanA) and D-alanyl-D-alanine ligase (DdlB). *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2009; 19: 1376-1379.
- 29.) Crider A. M., Tita T. T., Wood J. D., Hinko C. N.: Esters of nipecotic and isonipecotic acids as potential anticonvulsants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 1982; 71(11): 1214-1219.
- 30.) Pitre D.; *Farmaco, Edizione Scientifica* 1962, 17: 130-140.
- 31.) Moore W. J., van der Marel G. A., Liskamp R. M.: Peptides containing a sulfinamide or a sulfonamide moiety: New transition-state analogues. *Tetrahedron Letters*, 1991; 32: 409-412.
- 32.) Sova M.: Doktorska disertacija, Načrtovanje in sinteza hidroksietilaminskih inhibitorjev biosinteze peptidoglikana, Ljubljana, 2009.
- 33.) Love B., Goodman M. M., Snaer K. M., Tedeschi R., Macko E.: Hantzsch-type dihydropyridine hypotensive agents, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1974; 17: 956-965.
- 34.) Anderluh M., Mravljak J., Perdih A., Sova M., Pečar S.: *Farmacevtska kemija III Vaje in seminarji*. Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, 2010: 7-9.
- 35.) Schneider C. H., Lynch C. C.: The Ternary System: Dioxane-Ethanol-Water. *Journal of American Chemical Society* 1943; 65: 1063-1066.
- 36.) Lassen K. M., Joullié M. M.: Evolution of amide bond formation. *ARKIVOC* 2010; 8: 189-250.

- 37.) Bruckner R.: *Organic Mechanisms Reactions, Stereochemistry and Synthesis*. Springer, 2010: 275-282.
- 38.) Shi H., Zhang Z., Wang Y.: Mechanism on epoxidation of alkenes by peracids: A protonation-promoted pathway and its quantum chemical elucidation. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 2005; 238: 13-25.
- 39.) Smith M. B., Wiley 7<sup>th</sup> Edition March's *Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and structures*. Wiley, 2013: 459-461.
- 40.) Hill S. E., Feller D.: Theoretical study of cation/ether complexes: 15-crown-5 and its alkali metal complexes. *International Journal of Mass Spectrometry* 2000; 201(1): 41-58.
- 41.) Dueno E. E., Chu F., Kim S.-I., Jung K. W.: Cesium promoted O-alkylation of alcohols for the efficient ether synthesis. *Tetrahedron Letters* 1999; 40 (10): 1843-1846.
- 42.) Piccolo A., Conte P., Patti A. F.: O-Alkylation of a lignite humic acid by phase-transfer catalysis. *Analycical and Bioanalytical Chemistry* 2006; 384: 994-1001.
- 43.) Sova M., Babič A., Pečar S., Gobec S.: Microwave-assisted synthesis of hydroxyethylamine dipeptide isosteres. *Tetrahedron Letters* 2007; 63: 141-147.
- 44.) Babič A., Sova M., Gobec S. Pečar S.: Epoxide opening with amino acids: improved synthesis of hydroxyethylamine dipeptide isosteres. *Tetrahedron Letters* 2006; 47: 1733-1735.
- 45.) <http://www.epa.gov/chemfact/dioxa-sd.pdf> (31.12. 2014; 21:37).
- 46.) Cremllyn R. J.: *Chlorosulfonic acid: a versatile reagent*. Cambridge: The Royal Society of chemistry, 2002: 7-20.
- 47.) Tišler M.: *Organska kemija, tretja izdaja*. Državna založba Slovenije, Ljubljana, 1991: 100-110.
- 48.) <http://www.organic-chemistry.org/namedreactions/schotten-baumann-reaction.shtm> (19. 12. 2014, 16:16)
- 49.) Abdel-Magid A. F. Mehrman S. J.: A Review on the Use of Sodium Triacetoxyborohydride in the Reductive Amination of Ketones and Aldehydes. *Organic Process Research & Development* 2006; 10: 971-1031.
- 50.) Payne D. J., Gwynn M. N., Holmes D. J. Pompliano D. L.: Drugs for bad bugs: confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nature review, Drug discovery* 2007; 6: 29-40.



- 51.) O'Shea R., Moser H. E.: Physicochemical Properties of Antibacterial Compounds: Implications for Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry* 2008; 51 (10): 2871-2878.