

LATVIJAS UNIVERSITĀTE
ĶĪMIJAS FAKULTĀTE

***N,O*-DIACILHIDROKSILAMĪNU
DINAMISKO KOMBINATORIĀLO BIBLIOTĒKU
IZVEIDOŠANA ŪDENS VIDĒ**

MAĢISTRA DARBS

DACE RASIŅA
stud. apl. Nr. dr05006

Darba vadītāja:
Dr. chem. SARMĪTE KATKEVIČA

RĪGA
2011

KOPSAVILKUMS

***N,O*-Diacilhidroksilamīnu dinamisko kombinatoriālo bibliotēku izveidošana ūdens vidē.** Rasiņa D., zinātniskā vadītāja Dr. Chem. Katkeviča S. Maģistra darbs, 103 lappuses, 47 attēli, 19 tabulas, 61 literatūras avoti, 4 pielikumi. Latviešu valodā.

DINAMISKĀ KOMBINATORIĀLĀ ĶĪMIJA, APGRIEZENISKAS REAKCIJAS,
OGĻSKĀBES ANHIDRĀZE, KOLAGENĀZE, SULFONAMĪDI,
HIDROKSĀMSKĀBES, *N,O*-DIACILHIDROKSILAMĪNI

Darbā pētīta *O*-acilhidroksāmskābju pāracilēšanās reakcija ūdens vidē kā potenciālā apgriezeniskā reakcija dinamisko kombinatoriālo bibliotēku (DKB) izveidošanai. Pārbaudīta šādas bibliotēkas piemērotība enzīmu – ogļskābes anhidrāzes (CA) un kolagenāzes (ChC) – ligandu noteikšanai. Darba gaitā sintezētas hidroksāmskābes un *N,O*-diacilhidroksilamīni, kuri izmantoti bibliotēku izveidē. Pētīta reakcijas vides (šķīdinātāju, pH) un izmantoto komponentu struktūras ietekme uz pāracilēšanās reakcijas norisi, kā arī piemērota metode reakcijas gaitas novērošanai ar AEŠH un dinamikas noteikšanai reakcijā. Noskaidrota CA ietekme uz *N,O*-diacilhidroksilamīnu hidrolīzi, kā arī pārbaudīta bibliotēkas komponentu ietekme uz CA aktivitāti. Izstrādāta *pseido*-DKB ChC ligandu identificēšanai un noteikts labākais ChC ligands vairākkomponentu sistēmā.

ABSTRACT

Development of dynamic combinatorial *N,O*-diacylhydroxylamine libraries in aqueous media. Rasina D., supervisor Dr. chem. Katkevica S. A. Master`s thesis, 103 pages, 47 figures, 19 tables, 61 literature references, 4 appendices. In Latvian.

DYNAMIC COMBINATORIAL CHEMISTRY, REVERSIBLE REACTIONS,
CARBONIC ANHYDRASE, SULFONAMIDE, COLLAGENASE,
HYDROXAMIC ACIDS, *N,O*-DIACYLHYDROXYLAMINES

The acyl group transfer from *N,O*-diacylhydroxylamines to hydroxamic acids in aqueous media was investigated as a potential reversible reaction useful for development of dynamic combinatorial libraries (DCL) with an aim to identify ligands of Carbonic anhydrase (CA) and Collagenase (ChC). Influence of reaction media (solvent, pH) and structure of components on trans-acylation reaction were studied using HPLC. Hydroxamic acids and *N,O*-diacylhydroxylamines were synthesized. Influence of CA on hydrolysis of *N,O*-diacylhydroxylamines as well as influence of library members on CA activity was investigated. *Pseudo*-DCL of potential ChC ligands was made and the best ligand from multicomponent library was identified.

SATURS

DARBĀ IZMANTOTO APZĪMĒJUMU SARAKSTS	6
IEVADS	7
1. LITERATŪRAS APSKATS	8
1.1. Dinamiskā kombinatoriālā ķīmija	8
1.1.1. Līdzsvara reakcijas	8
1.1.2. DKB izmantošana jaunu ligandu atklāšanā	12
1.1.3. DKB izmantošana receptoru atklāšanā	18
1.1.4. DKB izmantošana agregātu un foldamēru atklāšanā	19
1.2. Ogļskābes anhidrāze	20
1.2.1. Uzbūve	20
1.2.2. Funkcijas organismā	21
1.2.3. Ogļskābes anhidrāzes ligandi un inhibitori	22
1.2.4. Ogļskābes anhidrāzes ligandu DKB	25
1.3. Kolagenāze	28
1.3.1. Uzbūve un funkcijas organismā	29
1.3.2. MMP inhibitori	30
1.4. Hidroksāmskābes un to atvasinājumi	32
2. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS	36
2.1. <i>N,O</i> -Diacilhidroksilamīnu DKB izveidošana un izpēte	36
2.1.1. DKB komponentu sintēze	36
2.1.2. <i>N,O</i> -Diacilhidroksilamīnu pārecilēšanās reakcijas izpēte DKB izveidei	39
2.2. DKB izveide ogļskābes anhidrāzes (CA) ligandu identificēšanai	50
2.2.1. CA atpazīšanas fragmentu saturošu DKB komponentu sintēze	50
2.2.2. <i>N,O</i> -Diacilhidroksilamīnu DKB izpēte CA klātbūtnē	52
2.3. DKB izveide kolagenāzes (ChC) ligandu identificēšanai	61
2.3.1. ChC atpazīšanas fragmentu saturošu DKB komponentu sintēze	61
2.3.2. <i>N,O</i> -Diacilhidroksilamīnu DKB izpēte ChC klātbūtnē	64
2.3.3. <i>Pseido</i> -DKB izveide ChC ligandu identificēšanai	68
3. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA	74
3.1. Izmantotā aparatūra un reaģenti	74
3.2. Karbonskābju sintēze	74
3.3. Hidroksāmskābju sintēze	81
3.4. <i>N,O</i> -Diacilhidroksilamīnu sintēze	90

3.5. <i>N,O</i> -Diacilhidroksilamīnu pārgrupēšanās produktu izolēšana	95
3.6. Dinamisko kombinatoriālo bibliotēku izveide	95
SECINĀJUMI	97
IZMANTOTĀ LITERATŪRA	98
PIELIKUMI.....	104

DARBĀ IZMANTOTO APZĪMĒJUMU SARAKSTS

AChE	acetilholīnesterāze;
AEŠH	augsti efektīvā šķidrumu hromatogrāfija;
AF	amplifikācijas faktors;
CA	ogļskābes anhidrāze;
CDI	karbonildiimidazols;
ChC	kolagenāze;
CoA	koenzīms A;
ConA	konkavalīns A;
DCM	dihlormetāns;
DKB	dinamiskā kombinatoriālā bibliotēka;
DKĶ	dinamiskā kombinatoriālā ķīmija;
DMSO	dimetilsulfoksīds;
EA	elektronu akceptors;
ED	elektronu donors;
EDCI	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N</i> -etilkarbodiimīna hidrohlorīds;
ESI FTICR MS	elektronizsmidzināšanas Furjē transformācijas jonu ciklotrona rezonanses masspektrometrija;
ESI-MS	elektronizsmidzināšanas masspektrometrija
G	Gibsa enerģija;
GalT	Galaktoziltransferāze;
GSH	glutations;
GST	glutaciona- <i>S</i> -transferāze;
HDAC	histona deacilāze
HOBT	hidroksibenzotriazols;
HS	hidroksāmskābe
K	līdzsvara konstante;
KMR	kodolmagnētiskās rezonanses spektroskopija;
MMP	matricas metaloproteināzes;
NA	neiramidāze;
S	hromatogrammu signālu laukums;
TFA	trifluoretiķskābe;
THF	tetrahidrofurāns;
THP	tetrahidro-2H-pirān-2-il-;
ω	koncentrāciju/ hromatogrammu signālu laukumu attiecības.

IEVADS

Viens no galvenajiem medicīnas ķīmijas uzdevumiem ir jaunu potenciālo zāļu atklāšana. Zāļu atklāšanas pirmais posms ir aktīvo savienojumu identificēšana, kas specifiski un selektīvi saistās ar mērķa biomakromolekulu (enzīmu vai receptoru). Samērā jauna aktīvo savienojumu identificēšanas metode ir dinamisko kombinatoriālo bibliotēku (DKB) izveide, kuras komponentes atrodas savstarpējā apgriezeniskā līdzsvarā. Biomakromolekulas pievienošana izraisa līdzsvara nobīdi (amplifikāciju) tās komponentes virzienā, kas ir biomakromolekulas ligands. Amplifikācija, kuru reģistrē ar analītiskām metodēm, norāda uz labāko biomakromolekulas ligandu vairākkomponentu bibliotēkā [1-5]. Metodes ierobežojums ir līdzsvara reakcijas izvēle, kurai ir jārealizējas ūdens vidē pie neitrāla pH. Pētījuma mērķis ir izveidot jaunas DKB ūdens vidē un izpētīt to izmantošanas iespējas biomakromolekulu ligandu identificēšanā.

N,O-Diacilhidroksilamīnu pāracilēšanās reakcija ir apgriezeniska reakcija, kas līdz šim nav aprakstīta DKB izveidē. Turklāt gan hidroksāmskābes, gan *N,O*-diacilhidroksilamīni tiek uzskatīti par potenciālajiem metaloproteināžu ligandiem, dēļ to spējas helatēt metāla jonu proteīna aktīvajā daļā [6-8]. Kā modelproteīni pētījumiem tika izvēlētas divas komerciāli pieejamas, relatīvi lētas cinka jonu saturošas metaloproteināzes – ogļskābes anhidrāze (CA) un kolagenāze (ChC). Literatūrā apskatītas vairākas ogļskābes anhidrāzes ligandu DKB, kurās izmantotas tādas apmaiņas reakcijas kā hidrazonu un imīnu apmaiņa, pāramidēšana un alkēnu apmaiņa [9-12]. Kolagenāzes ligandu identificēšana ar dinamiskās kombinatoriālās ķīmijas metodēm līdz šim nav aprakstīta.

Maģistra darba mērķis ir izpētīt *O*-acilhidroksāmskābju pāracilēšanās reakcijas atbilstību DKB izveidei ūdens vidē un pielietot šo reakciju izvēlēto enzīmu ligandu identificēšanai.

Darba uzdevumi:

- 1) sintezēt hidroksāmskābes un *N,O*-diacilhidroksilamīnus, un izmantot tos dinamisko kombinatoriālo bibliotēku izveidē;
- 2) izvēlēties un piemērot analītiskās metodes DKB komponentu attiecību noskaidrošanai;
- 3) izpētīt reakcijas apstākļus (vides pH, temperatūra, šķīdinātājs, aizvietotāji substrātos) ietekmi uz *N,O*-diacilhidroksilamīnu pāracilēšanās reakcijas līdzsvaru;
- 4) izveidot *N,O*-diacilhidroksilamīnu DKB ūdens vidē un pārbaudīt tās piemērotību ogļskābes anhidrāzes (CA) un kolagenāzes (ChC) ligandu identificēšanā.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1.1. Dinamiskā kombinatoriālā ķīmija

Dinamiskā kombinatoriālā ķīmija (DKĶ) ir kombinatoriālā ķīmija termodinamiskās kontroles apstākļos, tas nozīmē, ka dinamiskajās kombinatoriālajās bibliotēkās (DKB) visas komponentes atrodas savstarpējā līdzsvarā. Līdzsvars tiek panākts, iekļaujot komponentes apgriezeniskā ķīmiskā reakcijā. DKB komponentu attiecību līdzsvara brīdī nosaka katras komponentes termodinamiskā stabilitāte noteiktajos eksperimenta apstākļos. Termodinamiskā kontrole nozīmē, ka eksperimenta apstākļu maiņa var ietekmēt komponentu attiecību, t.i. DKB ir jutīga pret ārējo ietekmi – temperatūras izmaiņām, spiediena u.c. faktoru izmaiņām. DKĶ uzdevums ir līdzsvarā esoša termodinamiski stabilākā produkta noteikšana [1-5].

Stabilākās struktūras noteikšanai bibliotēkā zināmi vairāki pielietojuma veidi [1-5]:

- 1) biomakromolekulu (enzīmu/receptoru) ligandu atklāšana;
- 2) receptoru sintēze no būvblokiem, DKB pievienojot noteiktu ligandu;
- 3) stabilāko agregātu (kompleksu) izveide, starpmolekulārās mijiedarbībās rezultātā;
- 4) stabilākā foldamēra noteikšana maisījumā, kurā savienojumiem ir dažādas konformacionālās īpašības. Tā struktūra, kurā ir pati labvēlīgākā iekšmolekulārā nekovalentā mijiedarbība, būs stabilizēta un veidosies vairāk par pārējām komponentēm.

1.1.1. Līdzsvara reakcijas

DKB komponentes tiek saistītas līdzsvara reakcijā, kura vienmēr cenšas ieņemt Gibbsa enerģijas minimumu. Līdzsvara reakcija no termodinamikas viedokļa ir reakcija, kas sasniedz minimālo Gibbsa enerģiju, kad reakcijas maisījums satur nozīmīgus daudzumus gan izejvielas, gan produktus (skat. 1.1.a att. B). Ja Gibbsa enerģija sasniedz minimālo vērtību, kad neliels daudzums reģentu ir pārvērtušies produktos, tad reakcija nenotiek (skat. 1.1.a att. A), turpretim, ja lielākā daļa reģentu ir pārvērtušies produktos, tad reakcija notiek ar kvantitatīviem produktu iznākumiem (skat. 1.1.a att. C) [13].

Ķīmiskā līdzsvara kritērijs konstantā temperatūrā un spiedienā ir $\Delta G=0$ (skat. 1.1.b. att.). Līdzsvara brīdī reakciju $aA+bB \rightleftharpoons cC+dD$ apraksta līdzsvara konstante:

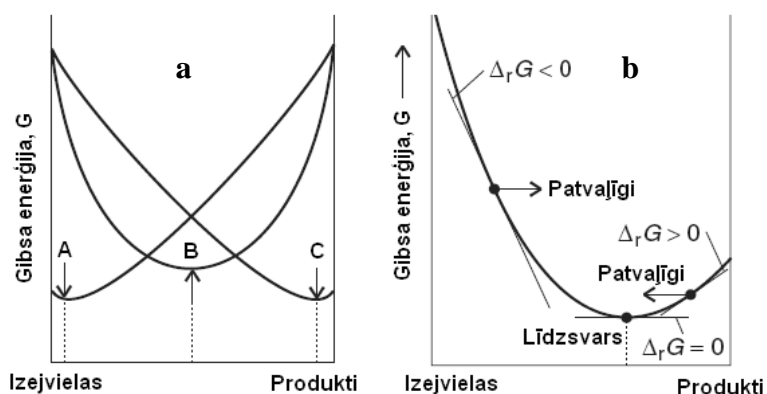
$$K_l = \left(\frac{a_c^c a_d^d}{a_a^a a_b^b} \right), \quad (1.1.)$$

kur: K_l – līdzsvara konstante, a – līdzsvarā esošo savienojumu aktivitātes.

Līdzsvara konstante ar Gibbsa enerģiju ($\Delta_r G$) ir saistīta vienādojumā:

$$\Delta_r G = -RT \ln K_l, \quad (1.2.)$$

kur: R – universālā gāzes konstante, T – temperatūra [13].



1.1. att. a) Gibbsa enerģijas maiņa atkarība no reakcijas gaitas: (A) $\Delta G_{\min} \sim \Delta G_{\text{izejv.}}$ reakcija nenotiek, (B) reakcija ir līdzsvarā, (C) $\Delta G_{\min} \sim \Delta G_{\text{prod.}}$ reakcija iet gandrīz līdz galam; b) Līknes minimums atbilst līdzsvaram $\Delta G = 0$, kad $\Delta G < 0$ – tiešā reakcija ir patvaļīga, kad $\Delta G > 0$ – apgriezeniskā reakcija ir patvaļīga [13]

Tā kā DKB cenšas ieņemt zemāko Gibbsa enerģiju, un bibliotēkas komponentes ir saistītas savā starpā līdzsvara reakcijā, jebkuras izmaiņas kādas komponentes stabilitātē, piemēram, saistīšanos ar templātu, ietekmē citas komponentes. Līdzsvara izjaukšana – amplifikācija, ietekmēs visu pārējo savienojumu termodinamisko stabilitāti, veidojot jaunu komponentu attiecību sadalījumu bibliotēkā.

Lai apgriezeniskā reakcija būtu piemērota DKB izveidei, tai jāatbilst sekojošiem nosacījumiem [1-2]:

- 1) reakcijai jābūt apgriezeniskai pieņemamā laika sprīdī;
- 2) līdzsvara reakcijai jābūt savietojamai ar templāta pievienošanas apstākļiem, ieskaitot komponentu un templāta funkcionālo grupu savietojamību, šķīdinātāju, vides pH (īpaši biomolekulu lietošanas gadījumā);
- 3) reakcijas apstākļiem jābūt „maigiem” (temperatūrai, spiedienam, koncentrācijai), lai tie netraucētu jutīgo nekovalento sadarbību, kas veidojas molekulu saistīšanās procesā;
- 4) visām bibliotēkas komponentēm jābūt šķīstošām, jo mazšķīstoši savienojumi var novirzīt līdzsvara reakciju nešķīstošo komponentu veidošanās virzienā;
- 5) reakcijai jābūt apstādināmai – iesaldējamai, lai būtu iespējams komponentes izolēt un noteikt to sadalījumu līdzsvara brīdī;
- 6) ideālā variantā bibliotēkas komponentēm jābūt izoenerģiskām, lai neveidotos tikai daži savienojumi no vairākiem iespējamiem.

DKB izveidošanā apgriezeniskās reakcijas balstās uz trīs galvenajiem saišu veidiem: nekovalentās (ūdeņraža saites), koordinatīvās un kovalentās saites. Parasti vājas un nestabilas nekovalentās saites ļauj ātri sasniegt līdzsvaru, taču izveidotie produkti šķīdumā nav stabili,

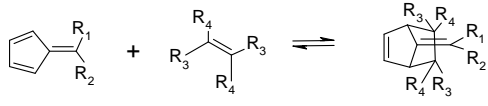
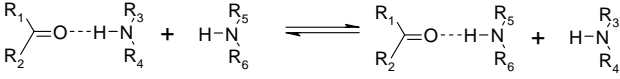
kā rezultātā ir grūti veikt to hromatogrāfisko analīzi, kā arī sarežģīti tos izolēt un izmantot tālākiem eksperimentiem. Turpretim kovalento saišu veidošanai un saraušānai parasti ir lēna kinētika, ko dažkārt paātrina, pievienojot katalizatoru. Bez tam, izolējot katalizatoru, ir iespējams apstādināt apmaiņas procesu, saistītie kompleksi var tikt izolēti un analizēti, bez riska, ka iestāsies jauns līdzsvars [1-3].

Apmaiņas reakcijas, kas tiek izmantotas DKB veidošanā, apkopotas 1.1. tabulā. DKĶ tiek izmantota acilgrupas pārnese, acetāla apmaiņas reakcijas, C=N apmaiņas reakcijas, kā arī citas apgriezeniskas kovalentās un nekovalentās saites veidošanas reakcijas.

1.1. tabula

DKĶ izmantotās līdzsvara reakcijas [1-5]

Reakciju tips	Reakcijas nosaukums	Reakcijas shematiskais attēlojums
Acilgrupas pārnese	pāresterificēšana	$R_1-C(=O)-OR_2 + R_3-C(=O)-OR_4 \xrightleftharpoons{\text{bāze}} R_1-C(=O)-OR_4 + R_3-C(=O)-OR_2$
	pārālesterificēšana	$R_1-C(=O)-O-CH=CH-R_2 + R_3-C(=O)-O-CH=CH-R_4 \xrightleftharpoons{\text{Pd(0)}} R_1-C(=O)-O-CH=CH-R_4 + R_3-C(=O)-O-CH=CH-R_2$
	pāramidēšana	$R_1-C(=O)-NH-R_2 + R_3-C(=O)-NH-R_4 \xrightleftharpoons{\text{proteāze vai metāla kat.}} R_1-C(=O)-NH-R_4 + R_3-C(=O)-NH-R_2$
	aldolu apmaiņa	$\text{aldol} + \text{Me-COO}^- \xrightleftharpoons{\text{aldolāze}} \text{aldol} + \text{Me-COO}^-$
	pārtioesterificēšana	$R_1-C(=O)-SR_2 + R_3-S-H \xrightleftharpoons{\text{bāze}} R_1-C(=O)-SR_3 + R_2-S-H$
	Maikla/ retro-Maikla reakcija	$R_1-CH=CH-C(=O)-R_2 + R_3-S-H \xrightleftharpoons{\text{bāze}} R_1-CH_2-CH(R_3)-C(=O)-R_2$
Acetāla apmaiņas reakcijas	acetāla apmaiņa	$R_1-C(OR)_2-R_2 + R_3-C(OR')_2-R_4 \xrightleftharpoons{\text{skābe}} R_1-C(OR)_2-R_2 + R_3-C(OR')_2-R_4$
	tioacetāla apmaiņa	$R_1-C(SR)_2-R_2 + R_3-C(SR')_2-R_4 \xrightleftharpoons{\text{skābe}} R_1-C(SR)_2-R_2 + R_3-C(SR')_2-R_4$
	pirazolotriazona metatēze	$\text{pirazolotriazona} + R_2-C(=O)-H \xrightleftharpoons{\text{skābe}} \text{pirazolotriazona} + R_1-C(=O)-H$
C=N apmaiņa	pāriminēšana	$R_1-CH=N-R_2 + R_3-CH=N-R_4 \xrightleftharpoons{\text{skābe}} R_1-CH=N-R_4 + R_3-CH=N-R_2$
	hidrazonu apmaiņa	$R_1-CH=N-NH-R_2 + R_3-CH=N-NH-R_4 \xrightleftharpoons{\text{skābe}} R_1-CH=N-NH-R_4 + R_3-CH=N-NH-R_2$
C=N apmaiņa	oksīmu apmaiņa	$R_1-CH=N-O-R_2 + R_3-CH=N-O-R_4 \xrightleftharpoons{\text{skābe}} R_1-CH=N-O-R_4 + R_3-CH=N-O-R_2$

Reakciju tips	Reakcijas nosaukums	Reakcijas shematiskais attēlojums
Citas apgriezenisko kovalento saišu veidošanas reakcijas	alkēnu metatēze	$R_1-CH=CH-R_2 + R_3-CH=CH-R_4 \xrightleftharpoons{\text{Grabsa kat.}} R_1-CH=CH-R_4 + R_3-CH=CH-R_2$
	alkīnu metatēze	$R_1-C\equiv C-R_2 + R_3-C\equiv C-R_4 \xrightleftharpoons{\text{Mo saturošs kat.}} R_1-C\equiv C-R_4 + R_3-C\equiv C-R_2$
	disulfīdu apmaiņa	$R_1-S-S-R_2 + R_3-S-S-R_4 \xrightleftharpoons{RS-} R_1-S-S-R_4 + R_3-S-S-R_2$
	Dīlsa-Aldera/ retro-Dīlsa-Aldera reakcija	
Nekovalento saišu veidošana	metāla – liganda apmaiņa	$[M(L_1)_n]^{m+} + nL_2 \rightleftharpoons [M(L_2)_n]^{m+} + nL_1$
	ūdeņraža saites apmaiņa	

Bibliotēkas komponentu sadalījumu un līdzsvara iestāšanos, kā arī amplifikāciju visbiežāk reģistrē ar kodolmagnētiskās rezonanses spektroskopiju (KMR) vai hromatogrāfijas metodēm (šķidrums, gāzu). Reakcijas līdzsvars iestājas brīdī, kad bibliotēkas komponentu sadalījuma attiecība kļūst nemainīga. Tā kā DKB ir termodinamiski kontrolēta, ir svarīgi pārlicināties vai izmantotajos reakcijas apstākļos reakcijas maisījums tiešām sasniedz līdzsvaru. Lai par to pārlicinātos, DKĶ izmanto vēl papildus līdzsvara noteikšanas metodes [1]:

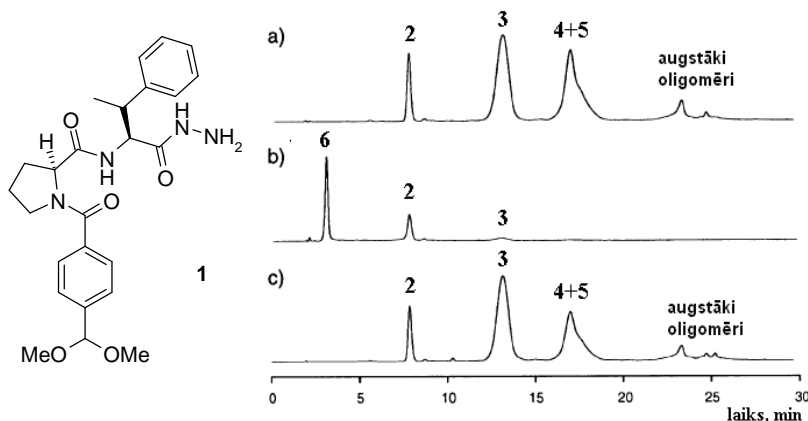
1) izveido divas vienādas bibliotēkas, katrai atsevišķai bibliotēkai izmantojot atšķirīgus sākuma substrātus – būvblokus. Iestājoties līdzsvaram, komponentu sadalījumam abās bibliotēkās jābūt vienādam: $A+BC \rightleftharpoons AC+B$ un $B+AC \rightleftharpoons BC+A$;

2) noskaidro bibliotēkas komponentu attiecību sadali, nomainot reakcijas apstākļus – temperatūru, koncentrāciju, spiedienu vai šķīdinātāja sastāvu. Pēc apstākļu atgriešanas sākotnējā stāvoklī, komponentu attiecībām jābūt tādām pašām kā pirms apstākļu izmaiņas. Pēc līdzīga principa reakcijas maisījumam var pievienot templātu, lai nobīdītu līdzsvaru. Izolējot templātu no reakcijas vides, komponentu attiecībām būtu jāatgriežas sākuma stāvoklī.

3) izolējot vienu komponenti no bibliotēkas, būtu jāveidojas tādām produktu maisījumiem ar komponentu sadalījumu, kas identisks pirms savienojuma izolēšanas. Šī metode piemērota tikai tad, ja bibliotēka satur izolētā savienojuma būvblokus.

To uzskatāmi parāda piemērs, kurā savienojums **1** nekovalentas mijiedarbības rezultātā pats ar sevi veido dimēru **2**, trimēru **3**, tetramēru **4** un pentamēru **5** (skat. 1.2.a att.). Reakcijas

līdzsvaru pārbauda, pievienojot 18-kraunu-6, kā rezultātā izveidojas hidrazīna krauna-ētera komplekss **6** (skat. 1.2.b att.). Maisījumu apstrādājot ar 3 ekvivalentiem KBr – sagraujot kompleksu, tika atgūts sākotnējais substrātu komponentu sadalījums (skat. 1.2.c att.) [14].



1.2.att. DKB hromatogrammas: a) līdzsvara stāvoklī, b) pēc 18-krauna-6 pievienošanas, c) pēc kompleksa **6** sagraušanas [14]

Viens no DKĶ lietojamo apgriezenisko reakciju kritērijiem ir iespēja apstādināt (iesaldēt) reakcijas, lai būtu iespējama komponentu sastāva noteikšana. To panāk, izmantojot vairākas metodes, no kurām biežāk lietotās ir katalizatora izolēšana no reakcijas vides, piemēram, šķērsmetatēzes reakcijā izolējot metāla katalizatoru [12], un komponentu pārvēršana formā, kas vairs nepiedalās līdzsvara reakcijā, piemēram, līdzsvarā esošu imīnu reducēšana par amīniem [1, 10, 15-17].

1.1.2. DKB izmantošana jaunu ligandu atklāšanā

DKĶ tiek izmantota jaunu zālvielu atklāšanā, izmantojot biomolekulas kā templātus, kas piesaista sev piemērotus ligandus no DKB.

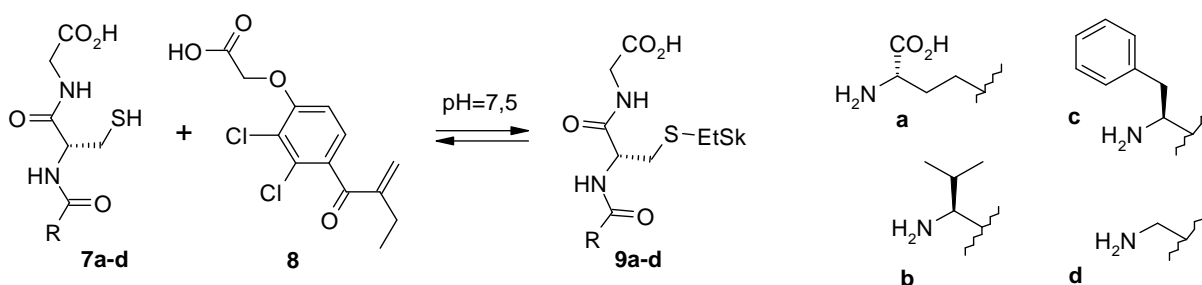
No visām zināmajām apmaiņas reakcijām tikai dažas ir piemērotas DKB, kur kā templātu izmanto biomolekulas, jo svarīgs nosacījums šādās bibliotēkās ir fizioloģiska vide – ūdens šķīdums, neitrāls pH, mērena temperatūra, kas nebojā biomolekulas struktūru. Šobrīd biomolekulu ligandu atklāšanā izmanto disulfīdu [18-20], imīnu [10, 15-16], hidrazonu [9], tioesteru apmaiņas reakcijas [21], kā arī aldolo reakciju un peptīdsaišu apmaiņas reakcijas [1].

Visbiežāk DKB pētījumos labākā liganda noteikšanai izmanto amplifikācijas metodi, kura ietver sākotnēji līdzsvara maisījuma izveidi un tā nobīdi labākā liganda veidošanās virzienā pēc templāta pievienošanas. Izmanto arī citus paņēmienus, lai noskaidrotu augstas afinitātes savienojumus maisījumos, kuros noris apgriezeniski procesi: pēc līdzsvara iestāšanās un templāta pievienošanas veic saistītā komponenta-templāta kompleksa izolēšanu no līdzsvara vides; nesaistīto komponentu degradāciju/sašķelšanu; vai izmanto dinamiskās dekonvolācijas metodi.

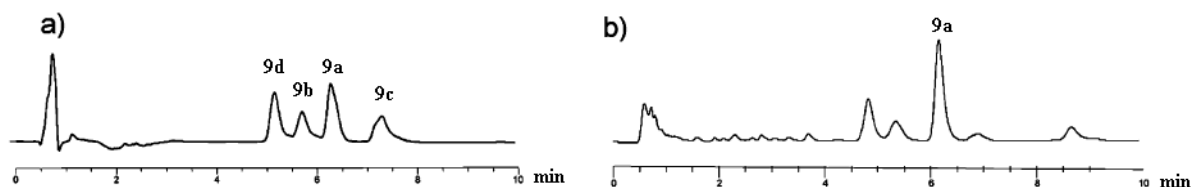
1.1.2.1. Amplifikācijas metode

Templātu (biomolekulu) pievieno līdzsvarā esošām bibliotēkas komponentēm. Kad templāts specifiski piesaistās pie piemērotākās komponentes, tā ir stabilizēta un līdzsvars nobīdās, izraisot saistītās komponentes koncentrācijas pieaugumu jeb amplifikāciju [1-3]. Ideālā gadījumā amplifikācija būs selektīva tai komponentei, kas saistās ar templātu visspēcīgāk, proti, komponente, kas būs nekovalenti saistīta ar templātu, būs stabilizēta un tendēta veidoties vairāk par citiem savienojumiem bibliotēkā.

Ļoti izteiktu amplifikāciju demonstrē piemērs, kurā, izveidojot tioesteru DKB no četriem tripeptīdiem **7a-d**, kas ir glutationa (γ -Glu-Cys-Gly, GSH, **7a**) analogi, un etakrīnskābes (EtSk, **8**) [21]:



Autori novēroja noteiktu produktu sadalījumu līdzsvara brīdī (skat. 1.3.a att.). Bibliotēkai pievienojot mērķa enzīmu glutationa-S-transferāzi (GST), pēc 2 dienām novēroja izteiktu labākā liganda **9a** amplifikāciju (skat. 1.3.b att.).

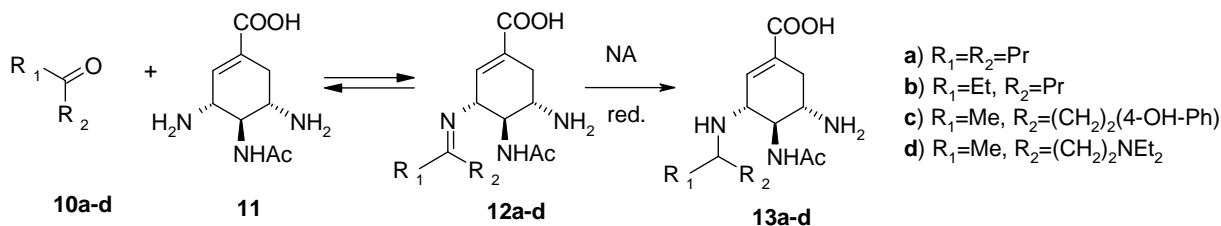


1.3. att. Amplifikācijas noteikšana tripeptīdu DKB ar AEŠH-UV metodi: a) DKB komponentu sadalījuma hromatogramma bez pievienota enzīma; b) DKB komponentu sadalījuma hromatogramma 2 dienas pēc enzīma pievienošanas līdzsvarā esošai bibliotēkai [21]

Demonstrētajā piemērā amplifikācija ir ļoti izteikta un līdzsvars praktiski pilnībā novirzās stabilākā – saistītā produkta veidošanās virzienā. Parasti lielākajā daļā eksperimentu stabilākais savienojums veidojas aptuveni par 30% vairāk un amplifikāciju tādā gadījumā ir grūtāk novērot [1].

Uzskatāms piemērs ir arī enzīma neiraminidāzes (NA) inhibitoru atklāšana. Šajā gadījumā imīnu **12a-d** dinamiskās kombinatoriālās bibliotēkas veido no ketonu **10a-d** un *N*-neaizvietota diamīna **11** būvblokiem. Līdzsvarā esošai bibliotēkai pievienojot NA, tika

noteikti pat vairāki aktīvi NA inhibitori (skat. 1.2. tab.), kuru intensitātes pieauga vairākkārtīgi, kā to norāda tabulā attainotie amplifikācijas faktori AF, kas ir attiecīgā savienojuma signāla (AEŠH) relatīvā intensitāte pirms un pēc enzīma pievienošanas [15].

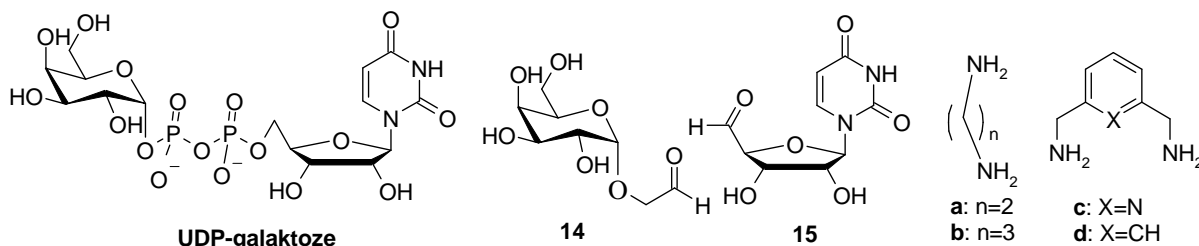


1.2. tabula

Amplifikācijas faktori (AF) neiramimidāzes ligandu DKB [15]

Substrāts	11	13a	13b	13c	13d
AF	0	>30	>90	84	zem noteikšanas robežas

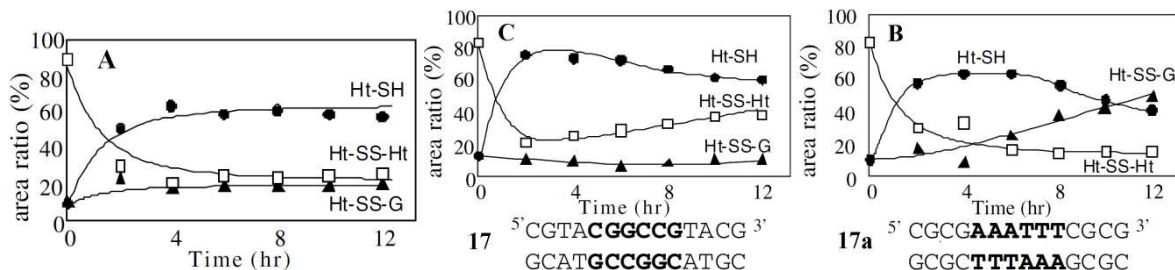
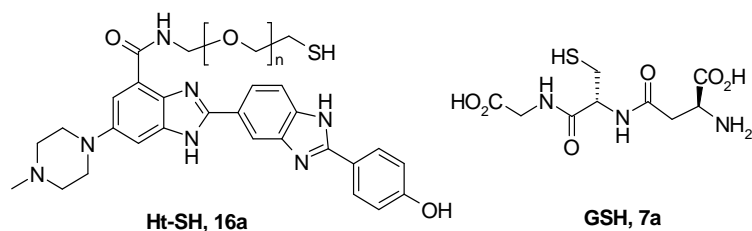
Līdzīgi ar AEŠH metodi pētīta imīnu **14a-d** un **15a-d** bibliotēka no aldehīdiem **14**, **15** un amīniem **a**, **b**, **c**, **d** divu galaktoziltransferāžu ligandu identificēšanai (α -1,3-GalT un β -1,4-GalT). Bibliotēkas komponentes veidotas kā UDP-galaktozes mimētiķi (skat. 1.4. att.).



1.4. att. Imīnu bibliotēkas substrāti un UDP-galaktoze [16]

Pēc līdzsvara iestāšanās divās atsevišķās bibliotēkās, pievienoti enzīmi α -1,3-GalT un β -1,4-GalT. Tad sagaidīts jauns komponentu sadalījums un veikta reducēšanas reakcija, lai iesaldētu līdzsvaru. α -1,3-GalT veicināja imīnu **14c** un **14d** amplifikāciju savukārt β -1,4-GalT tikai amīnu **a**, **b**, **c**, **d** amplifikāciju [16].

Iepriekš apskatītajos piemēros amplifikāciju demonstrē, salīdzinot hromatogrammas bibliotēkai ar un bez pievienota enzīma, vai izmantojot amplifikācijas faktoru – signālu intensitātes attiecības. Amplifikāciju iespējams attēlot arī grafiski, izmantojot komponentu signālu laukumu attiecības, kā tas demonstrēts DNS fragmentu ligandu identifikācijā (skat. 1.5. att.). Bibliotēka veidota, izmantojot disulfīdu apmaiņas reakciju no savienojuma **16a** (Ht-SH) atvasinājumiem un glutationa (GSH, **7a**), iegūstot gan homodisulfīdus (Ht-SS-Ht, G-SS-G), gan heterodisulfīdus (Ht-SS-G) [19].



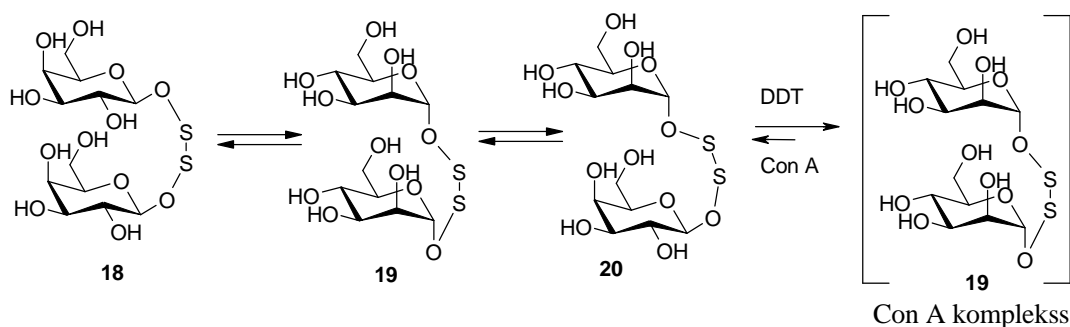
1.5. att. Bibliotēkas komponentu (Ht-SH, Ht-SS-Ht, Ht-SS-G) attiecību maiņa atkarībā no laika: a) bez pievienota DNS fragmenta; b) pēc 4 h līdzsvarā esošai bibliotēkai, pievienots DNS fragmentu 17; c) pēc 4 h līdzsvarā esošai bibliotēkai, pievienots DNS fragmentu 17a [19]

Grafiks (skat. 1.5.a att.) parāda, ka disulfīdu veidošanās līdzsvars ir iestājies, jo komponentu attiecība nemainās, 1.5.b un 1.5.c grafikos attiecīgi novēro saistītā liganda daudzuma palielināšanos attiecībā pret pārējiem [19].

1.1.2.2. Bibliotēkas veidošana mērķa enzīma klātbūtnē

Paralēli veic divas multikomponentu reakcijas – vienu bez pievienotas biomolekulas, otrai – biomolekulu pievieno uzreiz. Līdzsvara brīdī salīdzina komponentu sadalījumu abās bibliotēkās. Termodinamiskajos apstākļos biomolekula izvēlas un stabilizē tikai produktus ar augstāko afinitāti, kas noved pie to amplifikācijas salīdzinājumā ar bibliotēku, kurā biomolekula netiek pievienota. [18, 22-23].

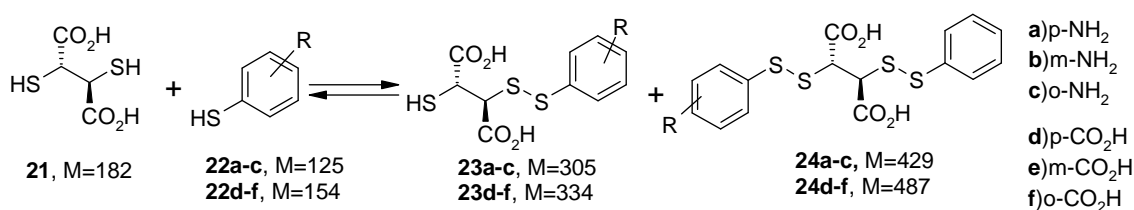
Piemēram, izmantojot disulfīdu apmaiņas reakciju, veidotas divas paralēlas ogļhidrātu tiolu atvasinājumu bibliotēkas lektīna Konkavalīna A (Con A) klātbūtnē, pievienojot nelielu daudzumu reducējošo savienojumu ditiotreitolu (DTT). Vienai no bibliotēkām tika pievienots Con A un pēc 14 dienām salīdzinot abu bibliotēku produktu sadalījumu, kā labākais Con A ligands noteikts disulfīds **19** [18]:



1.1.2.3. Enzīma – inhibitora kompleksa identificēšana ar MS metodi

Pēc līdzsvara iestāšanās un biomolekulas pievienošanas netiek novērota amplifikācija, bet gan, izmantojot masspektrometriju, pēc kompleksu masas reģistrē liganda – enzīma kompleksa veidošanās faktu [12, 20, 24].

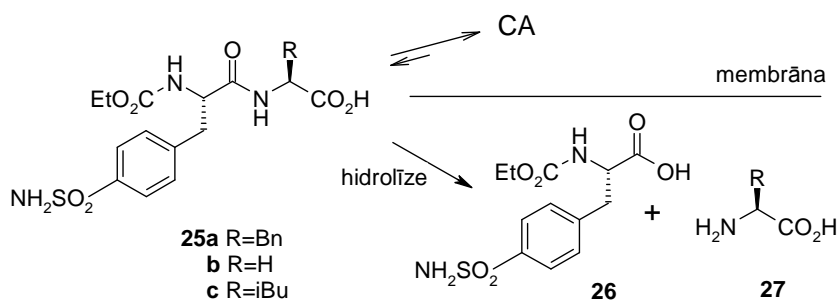
Piemēram, BcII metalo- β -laktamāzes inhibitoru bibliotēka veidota, izmantojot disulfīdu apmaiņas reakciju, atbilstošo enzīmu pievienojot jau reakcijas sākumā. Bibliotēkas analīzei izmantota masspektrometrijas metode, ar kuru nosaka enzīma – ligandu kompleksu masas [BcII+M], nevis novēro kāda komponenta amplifikāciju [20]:



Ar ESI-MS metodi noteiktas kompleksu masas: [BcII+305] un [BcII+334]. Tas nozīmē, ka komplekss veidojas ar heterosavienojumiem – dimēriem **23a-f** no kuriem viens ir ditiols **21**. Jāatzīmē, ka homodimēru vai trimēru **24a-f** veidošanos nenovēroja. Lielākais trūkums šai metodei ir izobāru savienojumu (savienojumu ar vienādu molmasu) noteikšana [20].

1.1.2.4. Papildus neatgriezeniskas reakcijas izmantošana

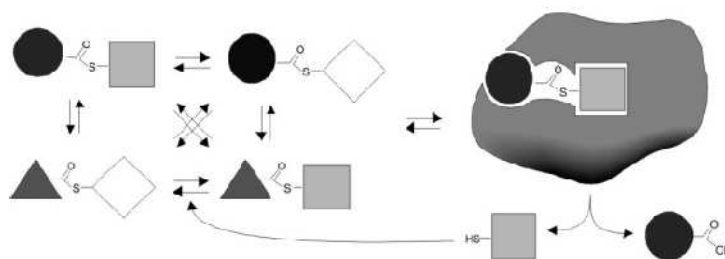
Pseido-dinamiskajā kombinatoriālajā ķīmijā (*p*DKĶ) papildus lieto kādu neapgriezenisku reakciju, lai sasniegtu augstāku selektivitāti labākā komponenta noskaidrošanā. Viens no *p*DKĶ piemēriem ir bibliotēkas komponentu selektīva šķelšana [11]. Šajā metodē visas bibliotēkas komponentes tiek lēnām šķeltas, izmantojot neapgriezenisku reakciju – hidrolīzi. Tā bibliotēkas komponente, kas tiek apgriezeniski saistīta ar templātu tiek pasargāta no hidrolīzes. Kā piemēru var minēt DKB, kas sastāv no ogļskābes anhidrāzes (CA), amīdu **25a-c** būvblokiem un cita enzīma, kas katalizē amīdu hidrolīzes reakciju. Templāts (CA) no hidrolīzes enzīma tiek atdalīts ar membrānu, kas nodrošina komponentu difūziju caur to:



Reakcijas gaita novērota ar AEŠH. Difūzija cauri membrānai ir ātruma limitējoša, tātad membrāna nepieļauj jebkādu hidrolīzes enzīma selektivitāti uz substrātiem, sagraušanas ātrumu nosaka tikai sadalījums starp saistītiem un nesaistītiem bibliotēkas komponentiem. Reakcijas norises laikā mazāk saistītās bibliotēkas komponentes tiek hidrolizētas, atstājot tās, kas labāk saistās ar CA, šis process ir savā ziņā līdzīgs kinētiskajai sadalīšanai [11].

Autori uzsver dažus potenciālos ierobežojumus šādas sistēmas izmantošanai. Pirmkārt, hidrolīzes enzīmam jābūt plašam aktivitātes spektram – tam jāspēj hidrolizēt vienādā mērā visas bibliotēkas komponentes. Otrkārt, jālieto stehiometriski templāta daudzumi, jo pretējā gadījumā amplifikācijas vietā notiks hidrolīze, rezultātā eksperimenta beigās var būt ļoti mazas bibliotēkas komponentu koncentrācijas. Treškārt, līdzsvara sistēmai no sākuma jāpievieno templāts un tikai tad to var pakļaut degradācijas procesam. Taču selektīva savienojumu šķelšana pēc amplifikācijas var akcentēt afinitātes atšķirības starp saistītajām bibliotēkas komponentēm [11].

Samērā interesanta pieeja tiek izmantota tioesteru apmaiņas DKB, kurā mērķa savienojums ir acetilholīnesterāze. Līdzsvara reakcijā piedalās tioesteri un tioli, taču nepiedalās karbonskābes. Ja pievienotā acetilholīnesterāze iedarbojās uz tioesteriem, tos hidrolizējot, tad izveidojies tiols atgriežas līdzsvara reakcijā, savukārt karbonskābe uzkrājas reakcijas vidē (skat. 1.6. att.). Nosakot, kura karbonskābe veidojas visvairāk, atrod acilgrupu, kura vislabāk mijiedarbojas ar enzīmu [25, 26].

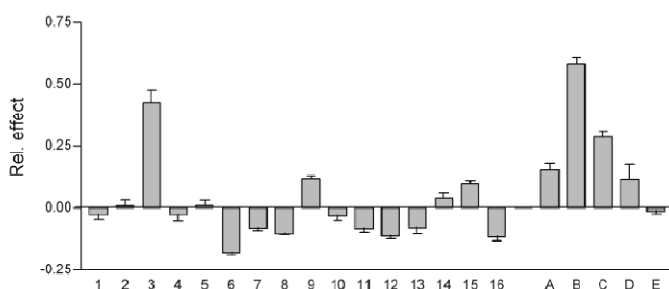


1.6. att. Neapgriezeniskas enzimatiskas reakcijas apvienošana ar apgriezenisko tioesteru ķīmiju, lai noskaidrotu substrātu afinitātes [25]

1.1.2.5. Dekonvolūcijas metode

Dinamisko dekonvolūcijas metodi visbiežāk izmanto, ja bibliotēka satur ļoti daudz komponentes un amplifikāciju, lielo komponentu skaita dēļ, nav iespējams reģistrēt. Metode balstās uz principu, ka netiek pievienota kāda komponente (būvbloks) atsevišķās subbibliotēkās. Subbibliotēkās veidojas cits komponentu attiecību sadalījums līdzsvarā, tam sekojoši novēros citu reakciju uz templātu. Tālāk, salīdzinot subbibliotēku un pamata bibliotēkas ietekmi uz templātu, secina, kurš ir labākais ligands [27-29].

Šo metodi demonstrē piemērs, kurā, izveidojot imīnu apmaiņas bibliotēku no 16 dažādiem hidrazīniem un 2 monoaldehīdiem un 3 dialdehīdiem, iegūta bibliotēka no 440 komponentēm. Pievienojot bibliotēkai mērķa enzīmu – HPr kināzi, konstatēts, ka bibliotēka inhibē enzīmu. Lai noskaidrotu spēcīgāko inhibitoru, pa vienam nepievienojot kādu no substrātiem izveidotas 21 subbibliotēka, kuru inhibēšanas spēja salīdzināta ar pamatbibliotēku (skat. 1.7. att.). Ja subbibliotēkā noteiktā HPr kināzes aktivitāte ir lielāka kā pamatbibliotēkā (grafiks ir vērsti pozitīvā virzienā), tad tas nozīmē, ka ir izolēts kāds no spēcīgākajiem inhibitoriem, un pretēji, ja subbibliotēka satur spēcīgāko inhibitoru, HPr kināzes aktivitāte samazināsies.



1.7. att. Dinamiskās dekonvolācijas metode: relatīvās HPr kināzes aktivitātes katrai subbibliotēkai salīdzinot ar pamatbibliotēku. 1-16 subbibliotēkā iztrūkst kāds no hidrazīniem, A-E iztrūkst kāds no aldehīdiem [27]

Kā redzams, tad vislielāko ietekmi uz HPr kināzes aktivitāti atstāj hidrazīni, kuri iztrūkst 3., 9., 14. un 15. subbibliotēkā un aldehīds, kura nav B bibliotēkā. Izveidojot atsevišķu aktīvāko savienojumu bibliotēku, arī noskaidrots, ka aktīvākais ir imīns, kas veidots no trešās subbibliotēkas iztrūkstošā hidrazīna un B subbibliotēkas aldehīda [27].

Izmantojot dekonvolācijas metodi un imīnu apmaiņas reakciju, šie paši autori arī noskaidrojuši acetilholīnesterāzes (AChE) inhibitorus 66 komponentu bibliotēkā [28]. Citi, savukārt, dekonvolācijas metodi izmantojuši Konkavalīna A (Con A) ligandu meklēšanai 474 imīnu bibliotēkā, kura veidota no 6 piranozes atvasinājumiem, kuri saturēja aldehīda daļu un 9 hidrazīnus [29].

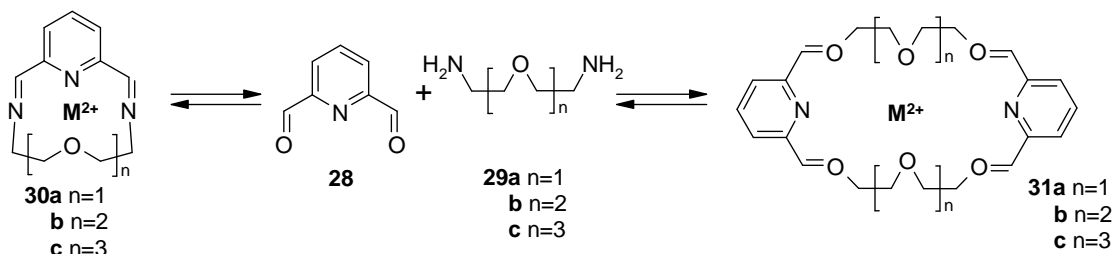
1.1.3. DKB izmantošana receptoru atklāšanā

DKB tiek izmantota kā alternatīva metode sintētisko receptoru struktūras noteikšanā. Receptora fragmenti tiek iesaistīti DKB un, izmantojot molekulas – ligandus, noskaidroti atbilstošākie savienojumi. Pēdējo desmit gadu laikā, izmantojot DKB, ir atklāti vairāki sintētiskie receptori, to skaitā:

- a) lineārie receptori, kas veidoti no monofunkcionalizētām komponentēm;
- b) makrocikliskie receptori, kas veidoti no bisfunkcionalizētām komponentēm;

c) kapsul-veidīgie receptori, kuros katra komponente satur vairāk kā divas grupas, kas piedalās apgriezenisku saišu veidošanā [1].

Piemēram, autori izmantojuši imīnu apmaiņas reakciju, lai veidotu makrociklu bibliotēku [1, 17]:

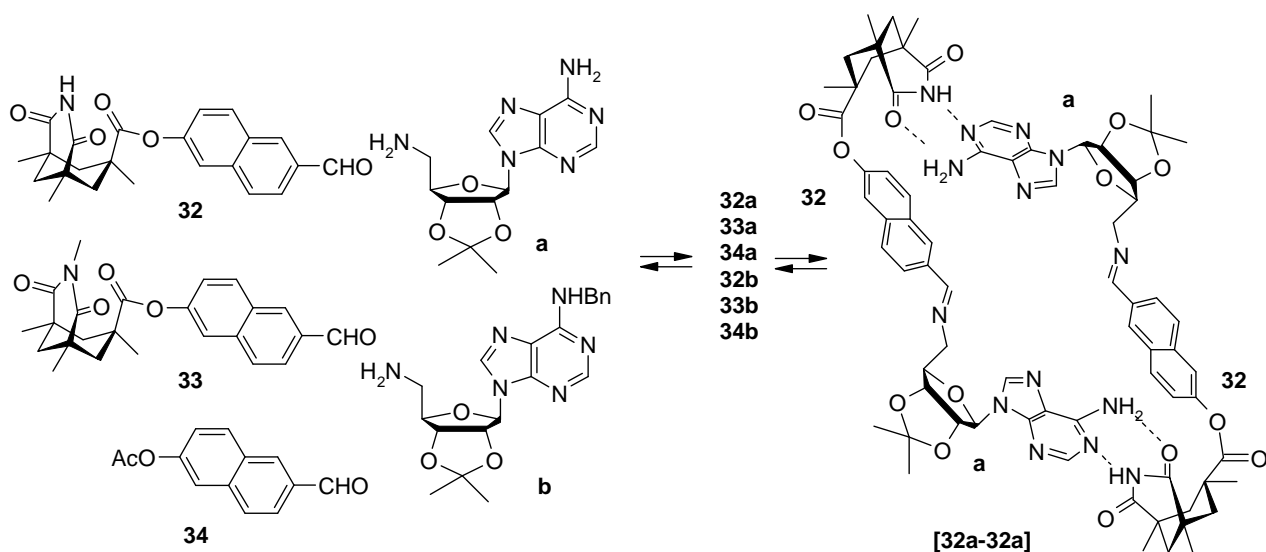


Kā templāts šādai bibliotēkai tiek pievienots metāla jons. Mg^{2+} jonu pievienošana veicināja mazāko ciklu amplifikāciju **30a-c**, turpretim lielāki joni, tādi kā Ca^{2+} vai Sr^{2+} , veicināja lielāko ciklu veidošanos **31a-c**. Bibliotēkas analizētas ar KMR, pirms analizēm apstādinot līdzsvaru, imīnus reducējot par amīniem [17].

1.1.4. DKB izmantošana agregātu un foldamēru atklāšanā

Dinamisko kombinatoriālo ķīmiju izmanto, lai noteiktu proteīnu, nukleīnskābju, kā arī sintētisko polimēru un oligomēru stabilāko telpisko struktūru. Šajās sistēmās netiek izmantotas templāta molekulas, molekulārā atpazīšana notiek iekšmolekulāri [1].

DKĶ izmanto tādu agregātu noteikšanai, kas veidojas nekovalenti mijiedarbojoties atsevišķām bibliotēkas komponentēm. Piemēram, DKB, kurā aldehīdi **32-34** un amīni **a,b** apgriezeniski veido imīnus **32a-b**, **33a-b**, **34a-b**, kuri ar ūdeņraža saitēm var saistīties paši ar sevi, veidojot dimērus. Kā stabilākais dimērs identificēts **[32a-32a]**. Šāda veida bibliotēkās, maina izejvielu attiecības, tādējādi panākot atšķirīgu agregātu veidošanos [30]:



1.2. Ogļskābes anhidrāze

Ogļskābes anhidrāze (CA), (sinonīmi: oglekļa anhidrāze; karbonāta hidrolāze; karbonāta dehidrogenāze; karboanhidrāze) pieder pie metaloenzīmu klases un kā enzīms pirmoreiz izolēts un raksturots 1933. gadā [31]. Sastopama kā eikariotu organismos, tā arī daudzos mikroorganismos. Ir zināmas vismaz piecas CA klases, kuras atšķiras ar aminoskābju secību [31-36]:

- 1) α -CA: zīdītāju organismos;
- 2) β -CA: lielākajā daļā prokariotu un augu hloroplastā;
- 3) γ -CA: baktērijās, kuras producē metānu – metanogēnos;
- 4) δ -CA: noteiktās fitoplanktona aļģēs (diatomos);
- 5) ζ -CA; baktērijās, dažos litotrofos organismos (producē enerģiju no neorganiskas izcelsmes vielām), un jūras cianobakterijās.

Mugurkaulniekos identificēti 16 (citur lit. 15) α -ogļskābes anhidrāzes izoenzīmi. Izoenzīmi atšķiras ar atrašanās vietu šūnā un katalītisko aktivitāti. Katalītiskie α -CA izoenzīmi šūnās atrodas:

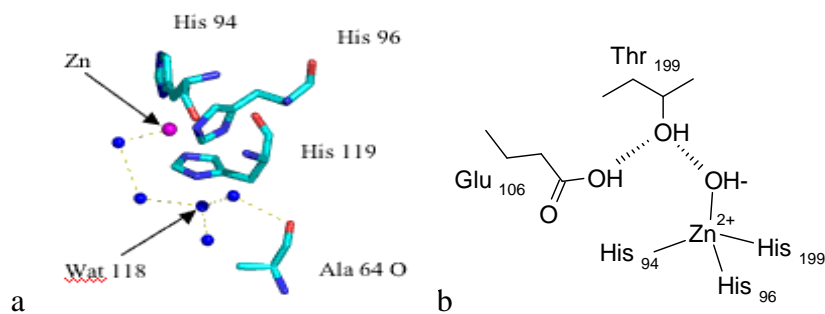
- 1) citosolā (CA I, CA II, CA III, CA VII un CA XIII);
- 2) saistīti pie membrānas (CA IV, CA IX, CA XII un CA XIV un CA XV), turklāt CA XV nav sastopama cilvēkos vai primātos, bet ir grauzējos vai citos augstākajos mugurkaulniekos. Membrānsaistītās CA IX un CA XII sastopamas audzēju šūnās;
- 3) mitohondrijos (CA VA un CA VB);
- 4) siekalu dziedzerī (CA VI) [31-36].

Trīs izoformas, kurām nav katalītiska funkcija sauc par CA-saistītiem proteīniem: CA VIII, CA X un CA XI [33].

1.2.1. Uzbūve

Visu α -ogļskābes anhidrāzes izoenzīmu uzbūve ir samērā līdzīga, taču tā atšķiras starp zīdītāju klasēm, piemēram, cilvēka cCA II un vērša vCA II aminoskābju sekvenca sakrīt par 87% [35].

Cilvēka cCA II ir metaloenzīms, kas sastāv no 260 aminoskābēm ($M=290097$ Da), kuras sakārtotas 10 β -sloksnēs un 7 α -spirālēs, centrā saistīts cinka jons (skat. 1.8. att.). Cinka jons atrodas 15 Å dziļā enzīma dobumā, ko koordinē trīs histidīna (His-94, His-96, His-119) imidazola gredzeni un hidroksīda jons (var būt ūdens molekulas formā, atkarībā no pH), veidojot tetraedrālu koordinācijas sistēmu.

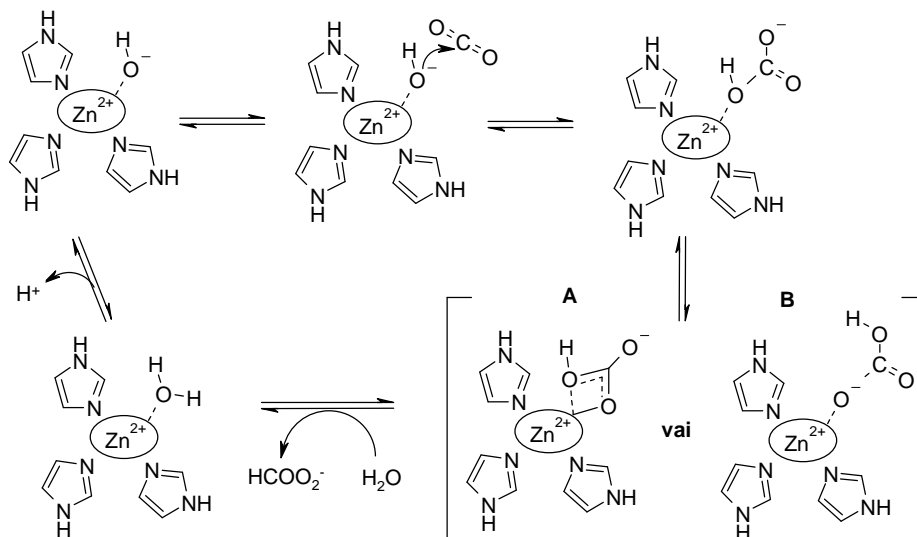


1.8. att. Ogļskābes anhidrāzes aktīvais centrs [8, 37]

Papildus cinka saistītais hidroksīdjons veido ūdeņraža saites ar tuvumā esošo treonīna (Thr-119) hidroksilgrupu un glutamīnskābes (Glu-106) karbonilgrupu (skat. 1.8.b att.). Enzīma dobums ir saistīšanās vieta CO₂ molekulai pirms katalītiskās reakcijas. Bez tam dobumā sastopamas arī vairākas ūdens molekulas (skat. 1.8.a att.), kuras piedalās hidratācijas procesā [7].

1.2.2. Funkcijas organismā

Visas izoformas piedalās dažādos procesos organismā. Cilvēkos CA sastopama dažādos audos, to skaitā, zarnu traktā, nervu sistēmā, nierēs, plaušās, ādā un acīs. Galvenā enzīma funkcija ir oglekļa dioksīda hidratācijas reakcijas katalīze par bikarbonāta jonu un protonu ($\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). Sākotnēji reakcijai tika piedāvāti divi mehānismi – *Lipscomb* [38] un *Linds kog*, kuri atšķiras ar pārejas stāvokli, kurā notiek H⁺ pārnese (skat. 1.9. att.). Vēlākajos pētījumos apstiprināts, ka ticamāks ir *Linds kog* piedāvātais mehānisms [39].



1.9. att. Piedāvātie CA katalīzes mehānismi: A) pentakoordinēts bidentāts starpprodukts (*Linds kog* meh.), B) iekšēja protona pārnese (*Lipscomb* meh.) [39]

Veicot CO₂ hidratācijas reakciju, CA tiek iesaistīta tādos fizioloģiskajos procesos kā elpošana, vides pH regulācija, osmotiskā spiediena regulācija un citos bioloģiskos procesos, kuros bikarbonāta jons nepieciešams kā substrāts.

Mazāk pētītas CA katalizētas reakcijas ir aromātisko un alifātisko karbonskābju (dažu sulfonskābju un fosforskābju) esteru hidrolīze, dažu halogēnu (2,4-dinitrofluorbenzola, benzoksikabronilhlorīda, sulfonilhlorīdu) hidrolīze, cianāta hidratēšana par urīnvielu un aldehīdu hidratēšana [8, 35].

Dažas CA izoformas veido atvasinājumus ar proteīniem un piedalās anjonu apmaiņas reakcijās, piemēram, Cl⁻/HCO₃⁻ anjonu apmaiņas proteīni un nātrija bikarbonāta transporta proteīni mijiedarbojas ar CA II un CA IV [34, 40].

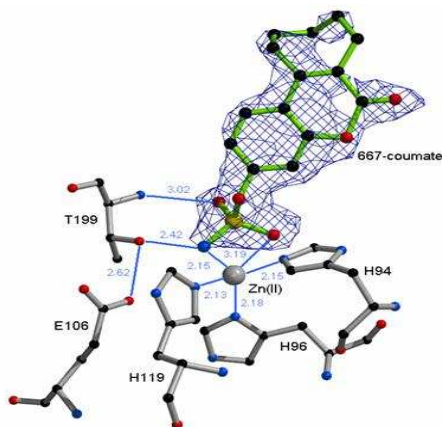
Divi izoenzīmi (CA IX un CA XII) lielā daudzumā sastopami audzēju epitēlija šūnās, kur, domājams, tās veicina vēža šūnu augšanu. Process saistīts ar vides pH regulāciju, jo audzēju šūnu vides pH ir par aptuveni 1 pH vienību skābāks.

Kā redzams CA izoenzīmi ir iesaistīti ne tikai fizioloģiskajos, bet arī patoloģiskajos procesos un to inhibitori arvien tiek pētīti jaunu zāļu atklāšanai, piemēram glaukomas ārstēšanai (CA II un CA XII ar sulfonamīda un sulfamāta inhibitoriem), ķermeņa masas regulēšanai (korpulencei) (CA II, CA VA un VB), kā pretkrampju līdzekļi epilepsijas un dažādos neiromuskulāras darbības traucējumos (CA VII un CA II), kā arī neskaitāmu audzēju ārstēšanā, kur iesaistīti membrānsaistītie CA IX un XII. Kā diurētiskie līdzekļi CA inhibitori tiek pētīti un lietoti jau 50 gadus.

1.2.3. Ogļskābes anhidrāzes ligandi un inhibitori

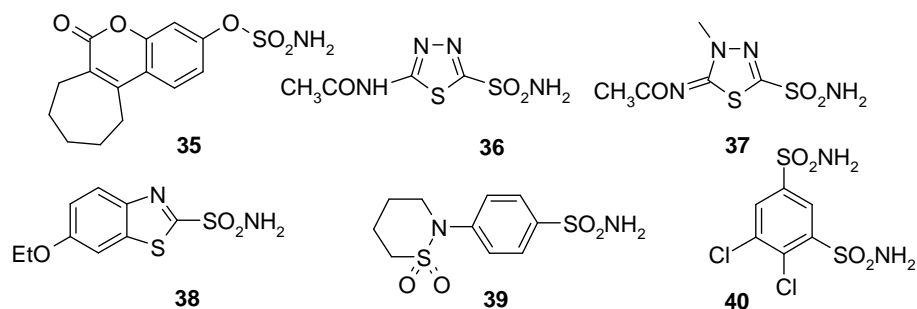
1.2.3.1. Sulfonamīda grupu saturošie inhibitori

Labāko dažādu CA izoformu inhibitoru pamatā ir sulfonamīda vai sulfamāta grupu saturoši atvasinājumi, kas koordinē cinka jonu enzīma aktīvajā centrā (skat. 1.10. att.).



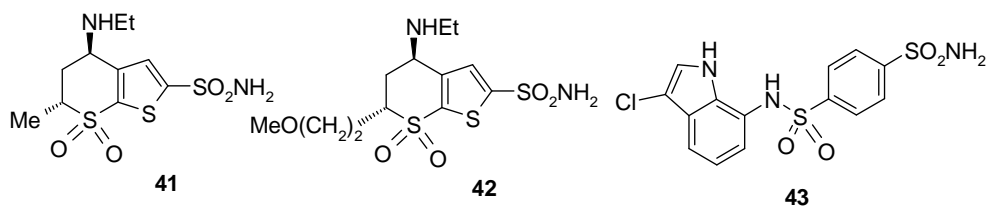
1.10. att. CA inhibitora kaumāta (35) sulfonamīda grupas koordinēšanās ar cinka jonu [41]

Plašāk pazīstamie anhidrāzes inhibitori ir acetazolamīds (**36**), metazolamīds (**37**), etoksiazolamīds (**38**), sultiāms (**39**), dihlorfenamīds (**40**), kaumāts (**35**) (skat. 1.11. att.). Acetazolamīds (**36**) tiek pārdots kā anti-glaukomas aģents ar pārdošanas nosaukumu *Diamox* un uzrāda katalītisko aktivitāti apgalbā no 5,7 nM (CA XII) līdz 200 μM (CA III).



1.11. att. Daži plašāk pazīstami CA inhibitori

Lielākā daļa šo atvasinājumu neuzrāda selektivitāti uz noteiktiem CA izoenzīmiem, piemēram, klasiskie inhibitori **36-40**, glaukomas ārstēšanā izmantotie sulfonamīdi (dorzolamīds (**41**) un brinzolamīds (**42**) un indisulāms (**43**)), ir ar izteiktu afinitāti uz 9 izoenzīmiem: CA II, VA, VB, VI, VII, IX, XII, XIII, XIV [33].



1.12. att. Glaukomas ārstēšanā izmantotie CA inhibitori

Kā redzams 1.3. tabulā pieminētajiem savienojumiem selektivitāte starp diviem izoenzīmiem ir samērā vidēja, vislabāko selektivitāti uzrāda indisulāms (**43**).

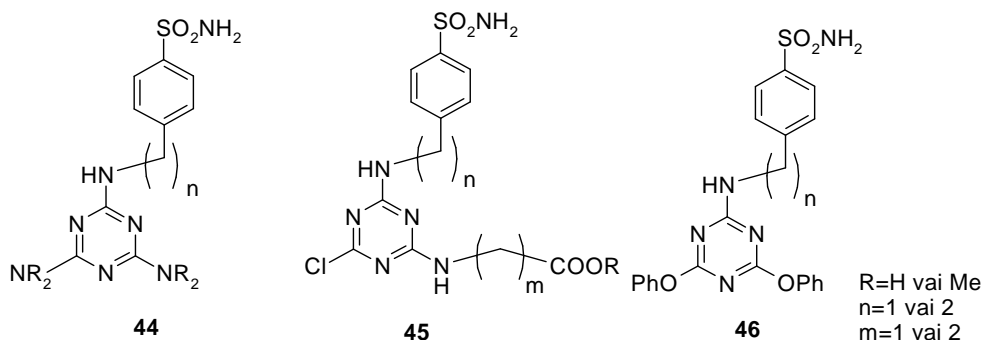
1.3. tabula

CA inhibitoru 38-45 aktivitāšu vērtības, noteiktas ar CO₂ hidratācijas metodi [42]

Nr.	Savienojums	K _I (nM)			Selektivitātes vērtība
		cCA I	cCA II	cCA IX	K _I (cCA II)/K _I (cCA IX)
1	acetazolamīds (36)	250	12	25	0,48
2	metazolamīds (37)	50	14	27	0,52
3	dihlorfenamīds (40)	25	8	34	0,23
4	dorzolamīds (41)	1200	38	50	0,76
5	brinzolamīds (42)	50 000	9	52	0,17
6	indisulāms (43)	Nav testēts	3	37	0,08

Viens no galvenajiem šī brīža uzdevumiem jauno CA inhibitoru meklējumos ir iegūt selektīvus CA IX, CA XII izoformu inhibitorus, kas iesaistās audzēja šūnu augšanas procesā, nodrošinot H⁺ jonus, hidratējot CO₂. Vides pH audzēju šūnās ir par – 0,5 līdz 1,0 pH vērtībām zemāks kā apkārtējos audos, un uzskata, ka CA IX izoenzīms nodrošina audzēja šūnām nepieciešamo skābo pH [42].

Ir sintezēti samērā selektīvi sulfonamīda grupu saturoši uz triazīna cikla bāzēti CA IX inhibitori **44-46**, un to inhibitoru aktivitātes noteiktas uz trīs CA izoformām cCA I, cCA II un cCA IX. Savienojumi sintezēti no cianūrhlorīda un sulfanilamīda atvasinājumiem.



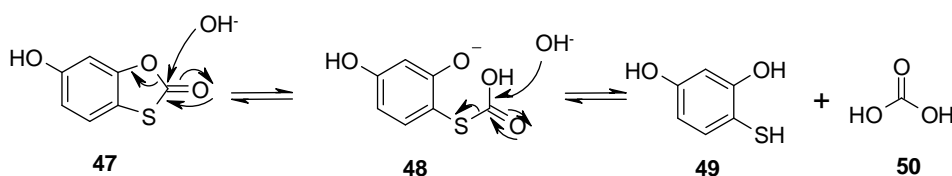
1.13. att. Selektīvi CA IX inhibitori

Jaunie triazīna atvasinājumi uzrāda K₁ vērtības uz cCA I 31–8500 nM skālā, cCA II 14–756 nM un cCA IX 1–640 nM. Pārsteidzoši, ka iegūtie triazīna grupu saturošie inhibitori uzrāda selektivitāti tieši uz CA IX. Šo savienojumu selektivitāte ir līdz pat 32 reizēm lielāka par klasiskajiem inhibitoriem acetazolamīdu (**36**) u. c. savienojumiem [42].

1.2.3.2. Citi ogļskābes anhidrāzes inhibitori

Ogļskābes anhidrāzes inhibēšanas procesā savienojums koordinējas ar cinka jonu, bloķējot iespēju pievienoties enzīma substrātam. Kā CA inhibitori var būt arī sulfāta, nitrāta un karbonāta anjoniem izostēriskie un izolektriskie anjoni, piemēram, hlorāts, perhlorāts, bromāts, jodāts, perjodāts, silikāts, bismutāts, vanadāts, molibdāts un volframāts. Tie tāpat kā CA katalizētās CO₂ hidratācijas produkts – bikarbonāta jons, spēj koordinēt cinku aktīvajā centrā [40].

Nedaudz savādāks CA II inhibēšanas mehānisms izpētīts tioksolona (**47**) gadījumā. Pētot mehānismu autori atklājuši, ka tioksolons (**47**), pievienojoties aktīvajā centrā, sākumā tiek hidrolizēts ar CA II pēc esteru hidrolīzes mehānisma, izveidojot 4-merkaptobenzil-1,3-diolu (**49**), kā starpsavienojums veidojas S-(2,4-tiofenil)hidrogēntiokarbonāts (**48**):



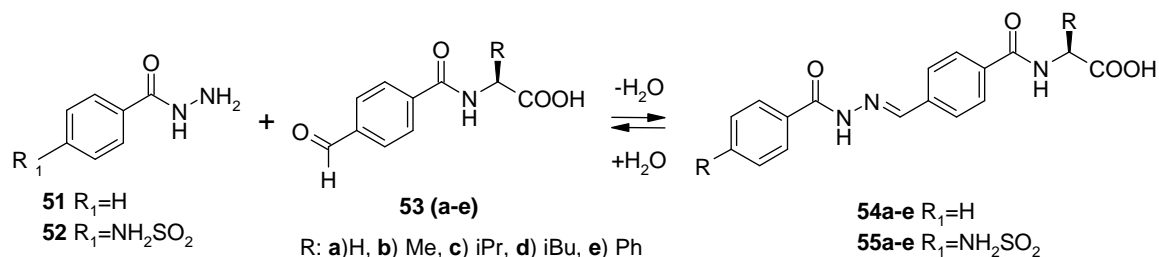
Hidrolīzes produkta **49** tiola grupa koordinējas ar cinka atomu, tādējādi kļūstot par inhibitoru. Tā kā šāda veida pre-inhibitoru mehānisms ir atkarīgs no esteru saites šķelšanas, tas specifiski atšķirībā no sulfonamīda savienojumiem, spēj inhibēt noteiktas CA izoformas, kas šķēļ estera saiti [32].

Organismos notiek dabīga CA aktivitātes regulācija. Ogļskābes anhidrāze ir tieši saistīta ar procesiem, kuros piedalās tās produkts – bikarbonāta jons, piemēram, oksaloacetāta pārvērtībās par piruvātu vai Ac-CoA, kā arī taukskābju sintēzē no Malonil-CoA tiek izdalīts CO₂, bet Ac-CoA sintēzē par malonil-CoA nepieciešams HCO₃⁻ jons. Nosauktajos procesos nepieciešama vismaz divu CA izoenzīmu klātbūtne: CA V mitohondrijos un CA II citosolā [34]. Veikti pētījumi par dažādu bioloģisko karboksilātjonu kā inhibitoru vai aktivatoru ietekmi uz CA. Noskaidrots, ka citosoliskā cCA I tiek stipri aktivēta ar acetāta, oksalāta, piruvāta, L-laktāta un citrāta joniem (K_A=0,1 μM), turpretim formiāts, malonāts, malāts un benzoāts ir vāji tās aktivatori (K_A=0,1-1 μM). Citosoliskā cCA II tika vāji inhibēta ar pētītajiem anjoniem (K_I=0,03-24 mM). Membrānsaistītā cCA IV visjutīgāk reaģē uz karboksilātiem K_I ap 99 nM citrātam un oksalātam, 2,8 μM malonātam, 14,5 μM piruvātam [34].

1.2.4. Ogļskābes anhidrāzes ligandu DKB

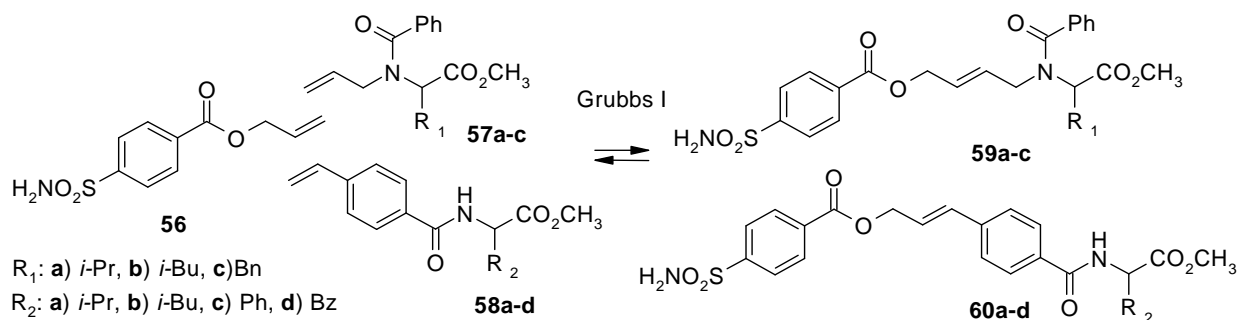
Dinamiskās kombinatoriālās bibliotēkas izmantotas arī ogļskābes anhidrāzes ligandu identificēšanai. Šādās DKB raksturīgs tas, ka komponentes visbiežāk satur CA atpazīšanas fragmentu – aromātisko sulfonamīdu. Reakcijas veic pH 6 līdz pH 7 robežās 37 °C temperatūrā, t.i., apstākļos, kas piemēroti CA darbībai.

Izmantojot hidrazīna apmaiņas reakciju, veidota DKB ar mērķa enzīmu – vCA II:



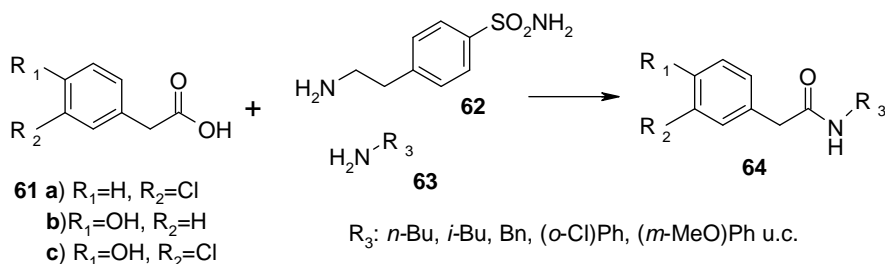
Bibliotēkas komponentes **52** modelētas, izmantojot aromātisko sulfonamīda daļu kā fragmentu, kas spēj saistīties ar CA un hidrazīna daļu, kas piedalās apmaiņas reakcijā. Paralēli veidotas divas bibliotēkas ar un bez vCA II pievienošanas. Abi iegūtie šķīdumi pētīti ar ESI FTICR MS, ar kuras palīdzību noteikti proteīna - ligandu kompleksi. Negatīvo jonu spektrā novērtotas 5 (savienojumu **55a-e**) inhibitoru - proteīnu kompleksu molmasas. Komponentes, kas nesaturēja aminosulfonilgrupu **54a-e**, kompleksus neveidoja [9].

Samērā līdzīga DKB veidota, izmantojot alkēnu šķērsmetatēzes reakciju.



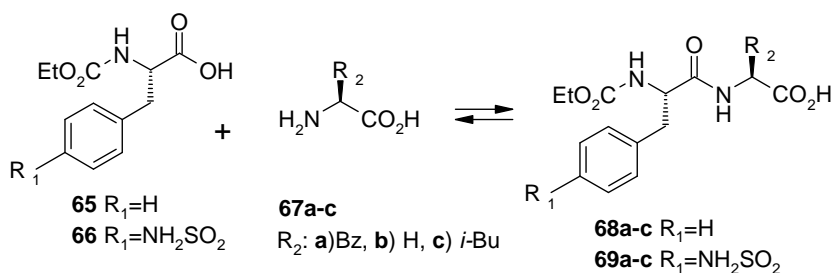
Arī šajā pētījumā izmantots aromātiskais sulfonamīds kā CA atpazīšanas fragments, bet apgrīzenisku reakciju nodrošināja terminālie alkēni. Reakcija tika veikta, izmantojot Grubbs I katalizatoru, tad līdzsvars iesaldēts, nofiltrējot katalizatoru un maisījums analizēts ar ESI MS negatīvo jonu skenēšanu, tādējādi noteikti saistīto ligandu – enzīma kompleksi [12].

Abās aprakstītajās reakcijās amplifikācija netiek novērota, tikai noteikts enzīma–liganda kompleksa veidošanas fakts. Būtībā šāda metode vairāk atbilst parastās kombinatoriālās ķīmijas principam, kur tiek iegūta savienojumu bibliotēka, neizmantojot apmaiņas reakciju. Piemēram, šie paši autori izveidojuši kombinatoriālo bibliotēku (bez dinamiska līdzsvara iestāšanās) no dažādām karbonskābēm **61a-c**, sulfonamīda **62** un dažādiem citiem amīniem **63**, iegūstot amīdu **64** bibliotēku:



Šādai bibliotēkai pievienota vCAII un, izmantojot ESI FTICR MS negatīvo jonu skenēšanu un skatoties enzīma – inhibitora kompleksu masas, noteikts amīds, kurš saistās ar enzīmu [24].

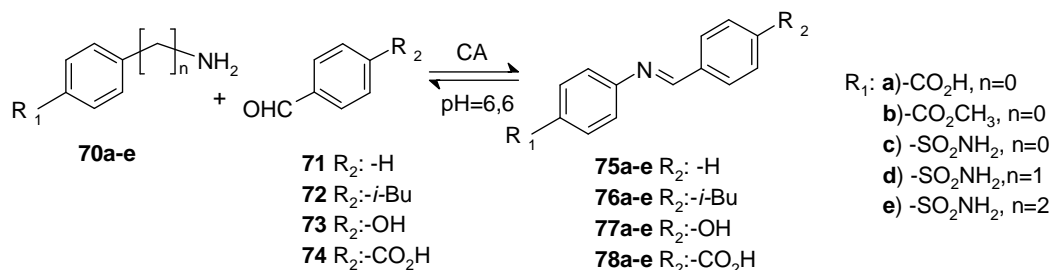
Ogļskābes anhidrāzes dinamiskā kombinatoriāla bibliotēka veidota, izmantojot pāramidēšanas reakciju:



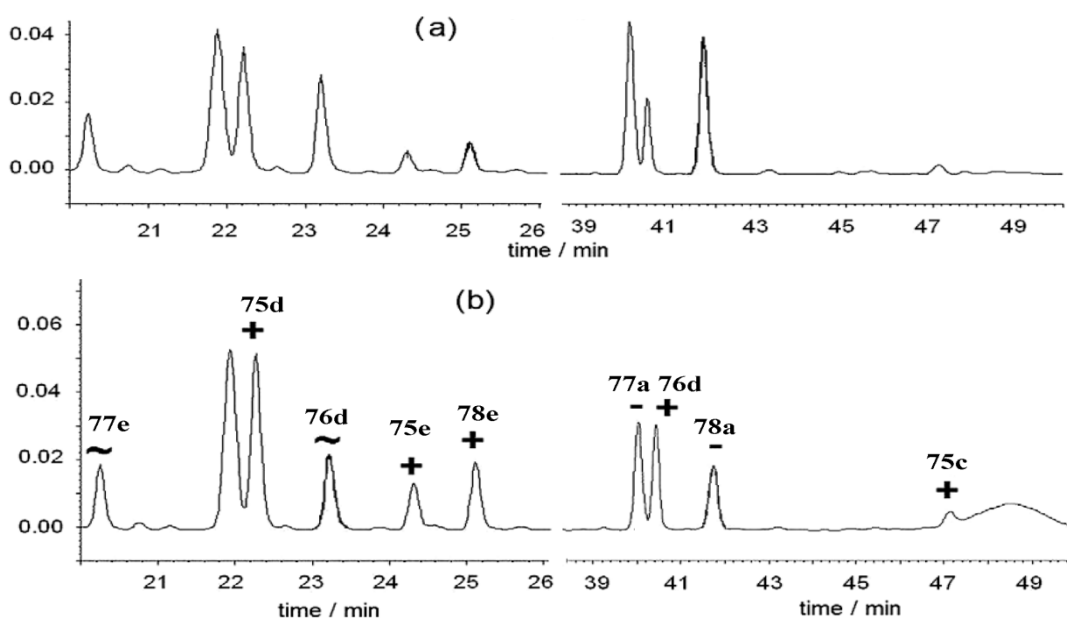
Pēc līdzsvara iestāšanās, šādai bibliotēkai pievienota ogļskābes anhidrāze, kā rezultātā novēro aminosulfonilgrupu saturošo amīdu **69a-c** amplifikāciju. Lai pastiprinātu

amplifikāciju, autori izmanto papildus reakciju, maisījumam pievienojot papildus enzīmu – proteāzi, kas veicina to amīdu hirolīzi, kas nav CA ligandi [11].

Vēl kāda DKB veidota no aldehīdiem **71-74** un amīniem **70a-e**, kas līdzsvarā veido imīnus **75-78(a-e)**:



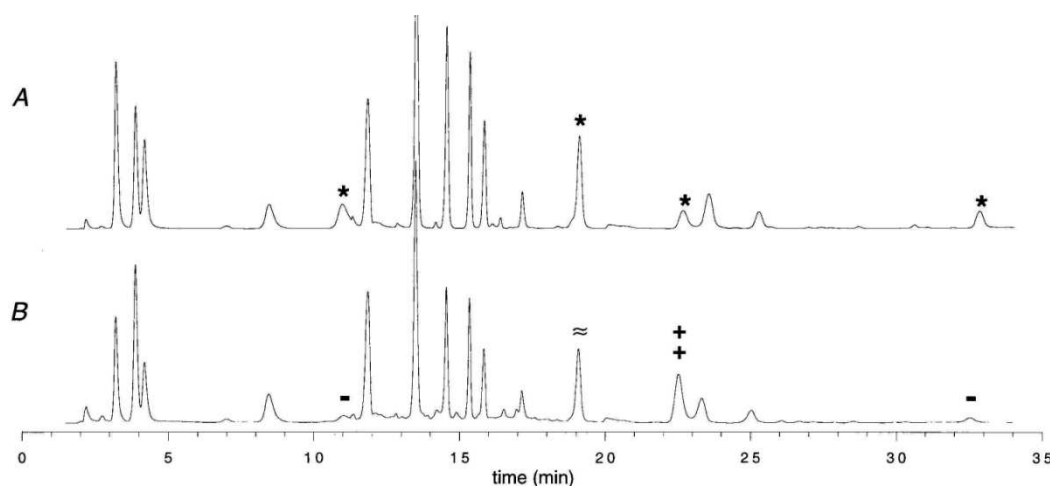
Līdzsvarā esošu reakcijas maisījumu sadala divās daļās un vienai daļai pievieno hCA II. Pirms hromatogrāfiskās analīzes tiek iesaldēts, pievienojot NaBH₄, kas iegūtos imīnus reducē līdz attiecīgajiem amīniem. Abi maisījumi analizēti ar šķidrums hromatogrāfiju. Maisījumam, kurā atradās enzīms, novēroja piecu imīnu **75d,c,e**, **78e**, **76d** amplifikāciju (skat. 1.13. att.) [10].



1.13.att. AEŠH hromatogrammas līdzsvarā esošai imīnu bibliotēkai, a) bez cCA II, b) ar pievienotu cCA II

Imīnu reakcija izmantota arī veidojot nedaudz citādāku DKB. Proti, enzīms tiek pievienots bibliotēkai pirms līdzsvara iestāšanās. Tad termodinamiskos apstākļos proteīns izvēlas un stabilizē tikai produktus ar augstāko afinitāti, kas tad arī noved pie to amplifikācijas un identifikācijas. Labu piemēru demonstrē viens DKĶ pētījums, kurā paralēli veic divas imīnu veidošanās reakcijas – vienu CA klātienē, otru bez CA. Pēc 14 dienām pievieno

NaCNBH₃, kas reakcijas līdzsvaru iesaldē, ļaujot veikt hromatogrāfisku analīzi (skat. 1.14. att.) [43].



1.14. att. a) Hromatogramma reakcijas maisījumam bez pievienotas CA, b) hromatogramma, kad reakcijas maisījumam pievienots ekvivalents enzīma daudzums [43]

Redzams, ka lielākā daļa komponentu abos reakcijas maisījumos veidojas vienādā daudzumā, taču ar „+” apzīmētais savienojums ir veidojas stipri vairāk reakcijas maisījumā, kuram pievienota CA. Šis savienojums arī noteikts kā labākais CA inhibitors [43].

1.3. Kolagenāze

Kolagenāzes pieder pie matricas metaloproteināzēm (MMP) – cinka jonu saturošām endopeptidāzēm. Endopeptidāžu funkcija organismā ir neterminālo aminoskābju peptīdsaites šķelšana. Tās šķel 3 dažāda tipa kolagēnu, želatīnu (denaturētu kolagēnu), dažādus audus un citus ārpusšūnas peptīdus. Katra MMP atpazīst noteiktu aminoskābju secību [44-46].

Zināmas vismaz 28 dažādas MMP klases, kuras iedala pēc to substrāta vai atrašanās vietas organismā (dažādās literatūrās tiek uzrādīts atšķirīgs MMP iedalījums) [44-46]:

1) Kolagenāzes: MMP1 (*Interstitial collagenase*), MMP8 (*Neutrophil collagenase*), MMP13 (*Collagenase 3*), MMP18 (*Collagenase 4*);

2) Stromelizīni: MMP3 (*Stromelysin 1*), MMP10 (*Stromelysin 2*), MMP11 (*Stromelysin 3*), MMP19, MMP20 (*Enamelysin*);

3) Želatināzes: MMP2 (*Gelatinase A*, 72 kD), MMP9 (*Gelatinase B*, 92 kD);

4) Membrānsaistītās kolagenāzes: MMP14 (MT1- MMP), MMP15 (MT2- MMP), MMP16 (MT3- MMP), MMP17 (MT4- MMP);

5) Citas: MMP7 (*Matrilysin*), MMP12 (*Macrophage elastase*).

Izdala 2 tipu kolagenāzes pēc to funkcijas organismā. Tips I no II atšķiras ar savu aktivitāti pret kolagēnu un sintētiskajiem peptīdiem. I tipam salīdzinot ar II ir lielāka aktivitāte pret kolagēnu un želatīnu, un zemāka pret īsākas ķēdes peptīdiem, taču katram MMP ir dažādi darbības ātrumi, piemēram, MMP-13 šķel II tipa kolagēnu desmit reizes ātrāk kā I tipa [44-46].

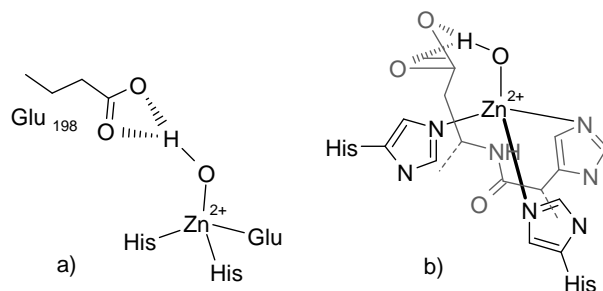
Kolagenāzes no *Clostridium histolyticum* (ChC) ir enzīmu maisījums, dažās literatūrās tiek pieskaitīts pie MMP8, citur apskatīts atsevišķi. Individuāli izolētas sešas dažādas kolagenāzes izoformas no ChC (α (M=68 kDa), β (115 kDa), γ (79 kDa), ϵ (130 kDa), δ un ζ) starp kurām ir gan I, gan II tipa enzīmi. I tipa ChC šķel I tipa kolagēnu netālu no terminālā C ar sekojošu protokolīzi pie terminālā N. II tipa ChC darbojas līdzīgi zīdītāju kolagenāzes dabībai – tie ir spējīgi šķelt pirmā tipa kolagēnu caur visām trīs ķēdēm makromolekulā attiecībā 1:3 [44].

1.3.1. Uzbūve un funkcijas organismā

Kolagenāzes savā starpā galvenokārt atšķiras ar skaitu un aminoskābju secību. Kolagenāžu molmasas variē no 68 kDa līdz pat 144 kDa. Kopīgi visām kolagenāzēm tāpat kā citām MMP raksturīga papildus kofaktoru - metālu jonu nepieciešamība struktūras stabilitātes nodrošināšanai. ChC satur vidēji 1 mol Zn uz molu proteīna (1 mol/mol) un kalcija saturs variē no 0,1 mol/mol α -kolagenāzei līdz 7 mol/mol δ -kolagenāzei. Kalcija jonu klātienē palielinās kolagenāzes aktivitāte un tiek uzskatīts, ka tie atvieglo enzīma piesaistīšanos pie kolagēna [44-47].

Kolagenāzes ir sekrēciju dziedzeri, kas spēj darboties ārpus šūnas. Zīdītāju organismā kolagenāzes šķel kolagēna trīskāršo spirāli 1:3 daļās. Pētījumi pierādījuši, ka kolagenāzes atritina kolagēna aminoskābju virknes spirāli pirms atsevišķu virkņu šķelšanas. Kolagēna makromolekulā atkārtojas secība: -R-Pro-X-Gly-Pro-, kur X ir neitrāla aminoskābe. Kolagenāze specifiski šķel -X-Gly- peptīdsaiti šajā sekvencē. Enzīms šādu secību atpazīst arī denaturētā kolagēnā un citos polipeptīdos [45].

Cinka jons kolagenāzes aktīvajā centrā tiek koordinēts trigonālas bipiramīdas veidā ar divām histidīna un vienu glutamāta molekulu vai trīs histidīna molekulām atkarībā no MMP. Kā ceturtais ligands ir ūdens vai hidroksīda molekula (atkarībā no pH), kas veic nuklefilo uzbrukumu karbonilgrupai peptīdsaites šķelšanas mehānismā. Papildus pie cinka saistītā ūdens molekula veido ūdeņraža saites ar blakus esošā glutamāta (Glu 198) karboksilāta daļu. Iespējams pat veidojas divas ūdeņraža saites. Tā saistītai ūdens molekulai tiek pastiprinātas nukleofilās īpašības, kas spēj šķelt peptīdsaiti (skat. 1.15. att.) [8].



1.15. att. Kolagenāzes aktīvā centra uzbūve: a) vispārīgais kolagenāžu aktīvā centra attēls [8] b) kolagenāzes 3 (MMP13) [6]

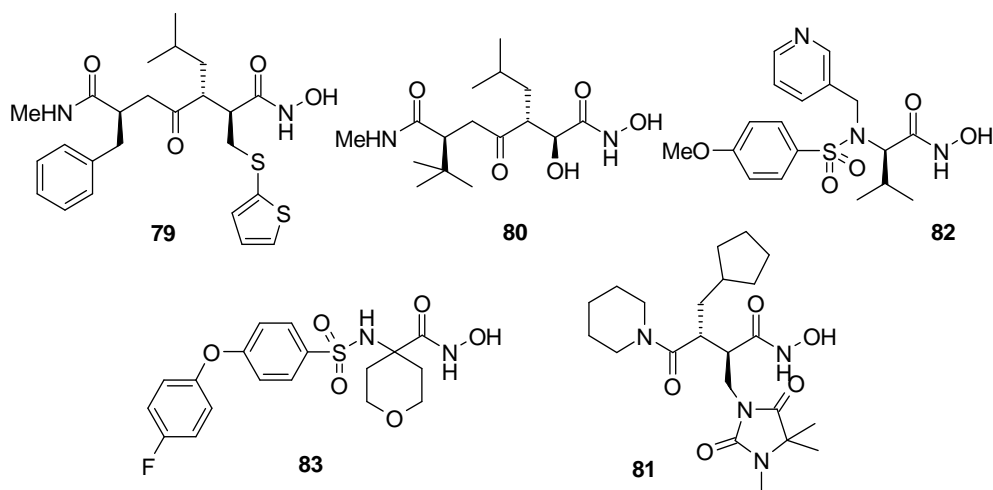
Kolagenāzes ir atbildīgas par normālu šūnu augšanu saistaudos, tomēr to pastiprināta darbība var izraisīt arī audzēju veidošanos. Paaugstināts kolagenāzes daudzums var veidoties, piemēram, iekaisumu un audzēju šūnu metastāžu gadījumā. MMP veicina vienu audu šūnu izplatīšanos uz blakus esošajiem audiem, kā tas normāli notiek ievainojumu dzīšanas procesā, embrionālo audu attīstībā, taču šis process arī sekmē audzēju šūnu metastāžu veidošanos [46, 48].

Nepareiza metaloproteināžu darbība izraisa ne tikai audzēju veidošanos, bet arī citas audu slimības, to skaitā, dažādas ādas slimības. Reimatisks artrīts veidojas keratinocīta trūkuma dēļ, kas saistīts ar I tipa kolagēna matricu, tā arī, piemēram, acs radzenes čūlas veidošanās ir pārmērīgas radzenes kolagenāzes darbības rezultāts [46, 48-49], tāpēc arvien tiek meklēti kolagenāžu darbības aktivitāti regulējoši savienojumi.

1.3.2. MMP inhibitori

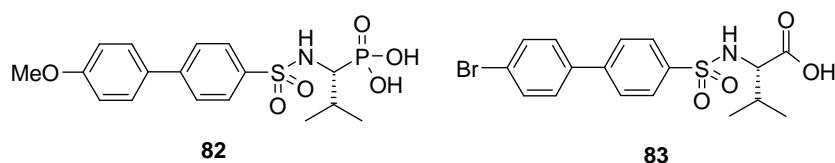
Metaloenzīmu un MMP inhibitoru darbība balstīta uz ūdens molekulas aizvietošanu enzīma aktīvajā centrā un koordinācijas spēju ar cinka jonu. Atkarībā no cinka helatējošās grupas, tos var iedalīt karboksilātos, hidroksamātos, tiolos, fosfora saturošos ligandos un sulfonamīdos [50]. MMP vispēcīgāk inhibē hidroksamāti, to koordinēšanās mehānismi tiks apskatīti 1.4. nodaļā [6, 8].

Zināmākie MMP inhibitori ir tādi hidroksamāti, kā *Batimastat* **79**, *Marimastat* **80** un tiem strukturāli ļoti līdzīgie, kā arī *Cipemastat* **81**, kuri jau šobrīd ir klīniskajos pētījumos. Pēdējos gados tiek sintezēti jauni hidroksamātu inhibitori, kas ir *N*-sulfonil- α -aminoskābju atvasinājumi **82**, **83**, kuri uzrāda lielāku selektivitāti starp metaloproteināzēm (skat. 1.16. att.) [50].



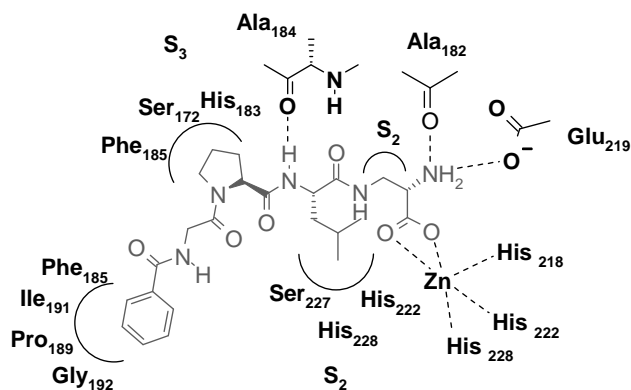
1.16. att. Hidroksamātu MMP inhibitori

Fosforu saturošie cinka metaloenzīmu ligandi, kā arī karboksilāti pēc struktūras ir līdzīgi hidroksamātiem. Arī fosfātu un karboksilātu „jaunās paaudzes” ligandi satur *N*-sulfonilfunkciju, kas paaugstina to selektivitāti pret noteiktām MMP un pastiprina koordinēšanās spēju (skat. 1.17. att.) [50-51].



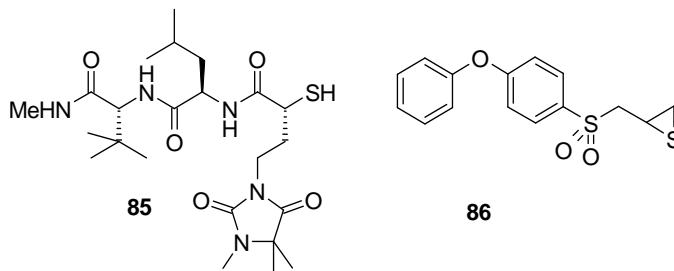
1.17. att. *N*-Sulfonilfosfāta un *N*-Sulfonilkarboksilātu tipa ligandi

Šāda veida savienojumu koordināciju enzīmu aktīvajā centrā labi demonstrē liganda **84** un MMP-1 kompleksa shematiskais attēlojums (skat. 1.18. att.), tiesa katra veida funkcionālā grupa (hidroksamāts, fosfāts, karboksilāts) atšķirīgi koordinē tieši cinka jonu [51].



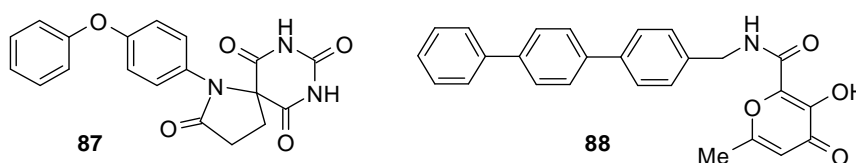
1.18. att. Liganda **84** – enzīma MMP-1 komplekss

Tiolu grupa ir viena no spēcīgākajām cinka jonu helatējošām grupām, bet tiolu inhibitoru lielākais mīnus ir to nestabilitāte gaisa klātbūtnē, kur tie viegli oksidējas. Dažu tiola funkciju saturošu MMP inhibitoru struktūrformulas attēlotas 1.19. attēlā.



1.19. att. Tiolu funkciju saturoši MMP inhibitori

Mazāk populāri ir uz pirimidīna un pirola bāzes veidoti inhibitori (skat. 1.20. att.). Pirimidīna atvasinājums **87** uzrāda aktivitāti uz MMP-13, MMP-2, MMP-9. Pirola atvasinājums **88** ir ļoti selektīvs tikai uz MMP-2.

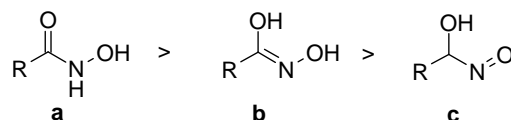


1.20. att. Pirimidīna un pirola atvasinājumi – MMP inhibitori

1.4. Hidroksāmskābes un to atvasinājumi

Hidroksāmskābēm pēdējos gados tiek pievērsta liela interese, jo tās uzrāda samērā plašu bioloģisko aktivitāšu loku un salīdzinoši zemu toksicitāti. Dabā sastopamo hidroksāmskābju un to atvasinājumu funkcija ir dzelzs jonu transportēšana caur šūnu membrānām [52].

Hidroksāmskābes var pastāvēt trīs tautomēro formu veidā (skat. 1.21. att.): a) *N*-hidroksilamīda forma, b) iminola forma (α -hidroksioksīms), c) nitrozo forma (nitrozo-spirts). Turklāt, amīda un iminola formai pastāv *E*- un *Z*- izomēri [53]. Tautomēro formu sadalījums var ietekmēt hidroksāmskābju ķīmiskās īpašības un bioloģisko aktivitāti, īpaši helatēšanas spēju. Ūdens vidē stabilākā ir *N*-hidroksilamīna tautomērā forma [54].



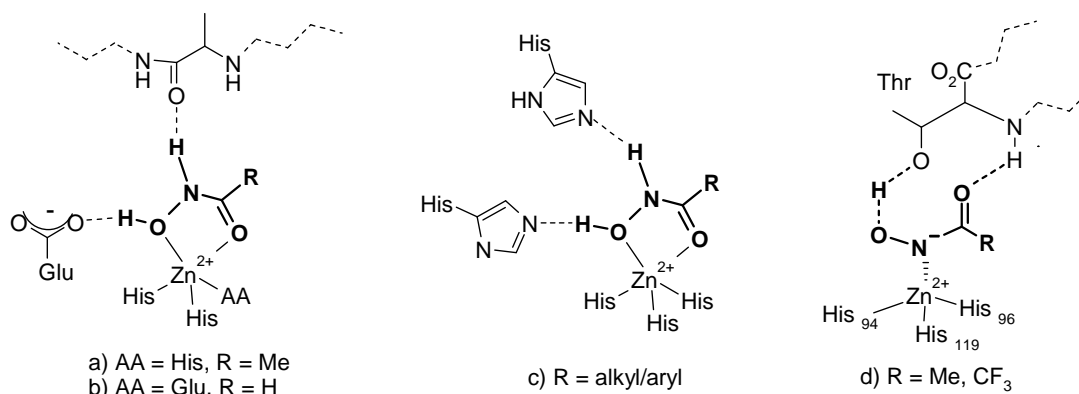
1.21. att. Hidroksāmskābju tautomērās formas, to stabilitātes samazināšanās secībā

Hidroksāmskābju bioloģiskā aktivitāte balstās uz to spēju koordinēt metāla jonus (visbiežāk Ni(II), Fe(II), Zn(II)) metaloproteīnu aktīvajā daļā. To inhibējošā aktivitāte ir

pārbaudīta uz tādiem proteīniem kā ogļskābes anhidrāze (CA), kolagenāze (ChC), termolizīns, aminopeptidāzes, botulīna neirotoksīns un citām metaloproteināzēm [52].

Ir noskaidrots, kā notiek hidroksāmskābju mijiedarbība ar metāliem, piemēram, Zn(II) metaloproteināzēs. Sākumā hirdoksāmskābe *O,O*-bidentāta veidā koordinējas pie Zn(II), kurš ieņem trigonālas bipiramīdas formu. Pēc tam veidojas ūdeņraža saite starp koordinētās hidroksāmskābes N-OH ūdeņradi un skābekļa atomu blakus esošajā glutamīnskābē. Pēdējais posms lielākajā daļā gadījumu ir vēl vienas ūdeņraža saites veidošanās starp hidroksāmskābes NH grupas ūdeņradi un netālu esošās aminoskābes skābekļa atomu. Rezultātā tiek iegūts enerģētiski izdevīgs pieclocekļa helāta komplekss (skat. 1.22.a, b att.) [6]. Šāda koordinācija novērota ogļskābes anhidrāzes, kolagenāzes un botulīna neirotoksīna serotipa A gadījumā.

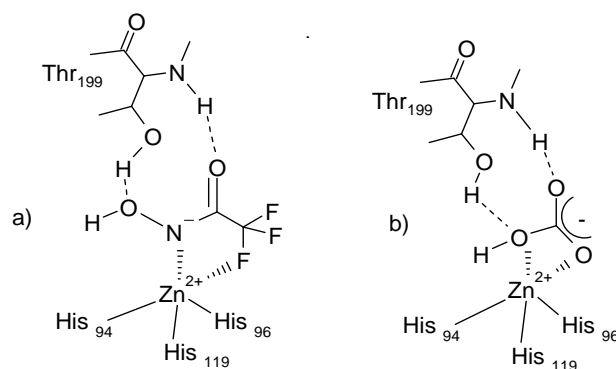
Cilvēka histona deacetilāzē (HDAC8) arī, hidroksāmskābei koordinējoties, veidojas *O,O*-bidentāta komplekss un ūdeņraža saites no katra NHOH protona ar diviem histidīna slāpekļa atomiem (skat. 1.22.c att.).



1.22. att. Hidroksāmskābju mijiedarbība ar Zn(II) metaloproteināzes fragmentu a) CA vai ChC, b) botulīna neirotoksīna serotips A, c) HDAC8, d) CA [6]

Ogļskābes anhidrāzi saturošā šķīdumā, hidroksāmskābes var veidot acetohidroksamāta ligandu, kas saistās pie Zn (II) ar deprotonēto slāpekļa atomu, kas ir īpašs hidroksamāta – metāla saistīšanas veids bioķīmijā (1.22.d att.). Parasti šāda koordinācija tiek novērota hidroksāmskābju – Ni (II) kompleksos [5, 7].

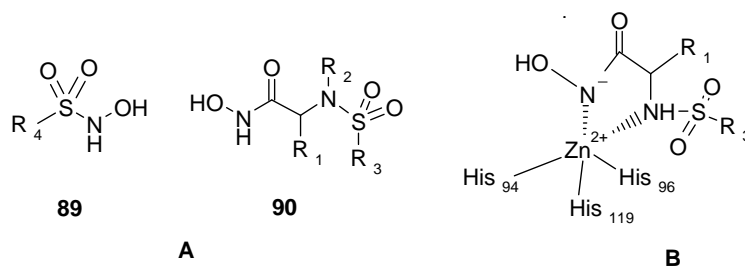
Šādu koordinācijas veidu pirmoreiz aprakstīja pētījumā par acetilhidroksāmskābes un trifluoracetilhidroksāmskābes koordinēšanos CA II aktīvajā centrā. Veicot abu hidroksāmskābju veidoto enzīma-inhibitora kompleksu rentgenstruktūranalīzes, noskaidrots, ka abas hidroksāmskābes neveido 5-locekļa kompleksu, kāds aprakstīts iepriekš, bet gan saistās ar cinku tieši ar jonizēto slāpekļa atomu (skat. 1.22.d un 1.23.a att.) [7].



1.23. att. Sematiska a) trifluorhidroksamāta un b) hidrogēnkarbonāta saistīšanās ar Zn jonu CA aktīvajā centrā [7]

Trifluoracetilhidroksāmskābes gadījumā papildus veidojas F–Zn koordinācija. Šāda kompleksa ģeometrija ir līdzīga trigonālai bipiramīdai, kur slāpekļa atoms un His-199 kalpo kā aksiālie ligandi, bet His-94, His-96 un flora atoms, kā ekvatoriālie ligandi. Gan acetilhidroksāmskābe, gan trifluoracetilhidroksāmskābe veido ūdeņraža saites ar Thr-199. Ļoti līdzīgu stāvokli var novērot enzīma-produkta (bikarbonāta) kompleksā 1.23.b att. [7].

Ņemot vērā, ka gan hidroksāmskābes, gan sulfonamīdgrupa spēj koordinēt cinka jonu aktīvajā centrā, sintezēti un pētīti savienojumi **89**. Autori arī pārbaudījuši *N*-sulfonilaminohidroksāmskābju **90** ar dažādiem aizvietotājiem R₁, R₂ un R₃, kuros iekļautas abas šīs grupas, spēju inhibēt dažādas metaloproteināzes, t.sk. CA un ChC (skat. 1.24. att.). Kopā iegūti un pārbaudīti vismaz 30 dažādi potenciālie inhibitori [8, 55].



1.24. att. a) Pētīto hidroksāmskābju **89** un *N*-sulfonilaminohidroksāmskābju **90** vispārīgā struktūra; b) paredzētā hidroksāmskābju koordinēšanās ar metāla jonu CA aktīvajā centrā [8]

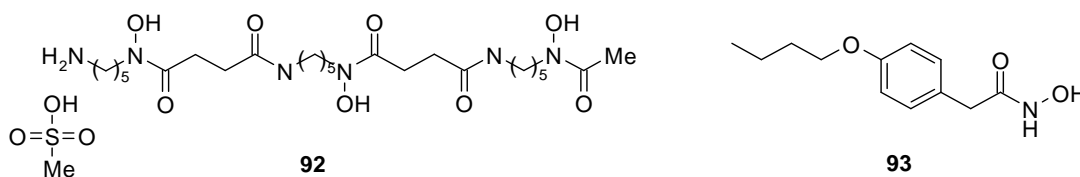
Autori pieņem, ka šādi savienojumi aktīvajā centrā koordinējas ar metāla jonu, izmantojot slāpekļa atomus, līdzīgi kā trifluoracetilhidroksāmskābe (skat. 1.24.b att.) [8]. Dažu iegūto savienojumu K_I uz CAII un ChC parādītas 1.4. tabulā.

***N*-Sulfonilaminohidroksāmskābju 90 inhibēšanas konstantes**

Nr.	R ₁	R ₂	R ₃	K _i (nM)	
				ChC	eCAII
1	H-	4-(NO ₂)-Bn-	4-MeO-Ph-	24	170
2	Me-	Bn-	C ₆ F ₅ -	6	84
3	<i>i</i> -Pr-	H-	4-MeO-Ph-	103	39
4	<i>i</i> -Bu-	Bn-	<i>n</i> C ₄ F ₉ -	8	116
5	Me-	2-Cl-Bn-	C ₆ F ₅ -	11	>200

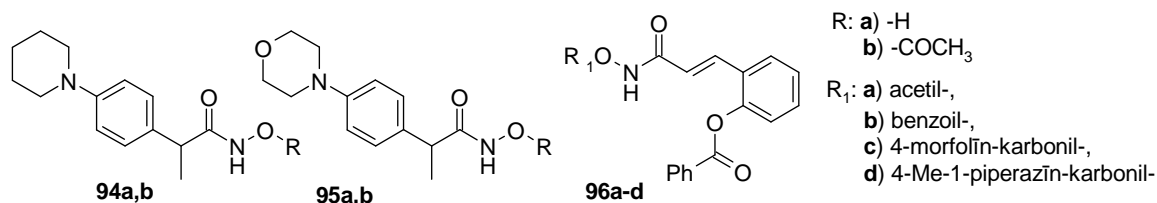
Savienojumu aktivitāte uz CA noteikta, izmantojot *p*-nitrofenilacetāta (*p*NFA) hidrolīzes reakciju kā konkurējošu reakciju enzīma aktīvajā centrā. Enzīms bez inhibitoru klātbūtnes *p*NFA hidrolizē ļoti strauji, taču, ja šķīdumā ir inhibitors, process norit daudzkārt lēnāk. Aktivitāti uz ChC nosaka, nosakot sintētiskā peptīda FLGPA (furlacriloil-Leu-Gly-Prop-Alanīns, **91**) šķelšanas ātrumus inhibitora klātienē [8,56].

Jau šobrīd hidroksāmskābes tiek izmantotas kā zāļvielas [52], piemēram, „Desferal” (**92**) tiek izmantots, lai izvadītu dzelzi no organisma vai „Bufexmac” (**93**) tiek izmantots kā pretiekaisuma līdzeklis.

1.25. att. „Desferal” (**92**) un „Bufexmac” (**83**) struktūras

Ne tikai hidroksāmskābes, bet arī to acilētie atvasinājumi – *N,O*-diacilhidroksilamīni tiek uzskatīti par potenciālām zāļvielu funkcionālo grupu sastāvdaļām.

Piemēram, dažādi hidroksilamīnu atvasinājumu, tai skaitā *N,O*-diacilhidroksilamīni **94b** un **95b** (skat. 1.26. att.) eksperimentos ar pelēm uzrāda pretiekaisuma un pretalerģijas īpašības [57]. Kanēļskābes *N*-hidroksilamīdi **96a-d** uzrāda aktivitāti gan uz grauzēju, gan uz cilvēka vēža šūnām [58].

1.26. att. Pētīto hidroksilamīnu un *N,O*-diacetilhidroksilamīnu struktūras [56]

2. REZULTĀTI UN TO IZVĒRTĒJUMS

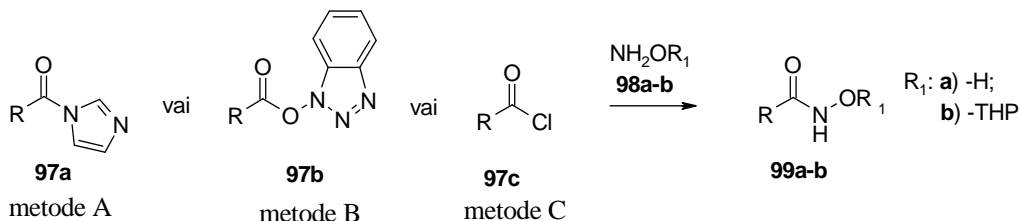
2.1. *N,O*-Diacilhidroksilamīnu DKB izveidošana un izpēte

2.1.1. DKB komponentu sintēze

Dinamisko kombinatoriālo bibliotēku izveidošanai nepieciešamās hidroksāmskābes tika sintezētas no aktivētām karbonskābēm (metodes A, B) un karbonskābju hloranhidrīdiem (metode C) reakcijā ar hidroksilamīnu vai *O*-tetrahidropiranil-aizsargātu hidroksilamīnu (*O*-THP). Karbonskābes tika aktivētas, izmantojot divus aktivējošos reaģentus – karbonildiimidazolu (CDI – metode A) un *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilkarbodiimīda hidrohlorīda (EDCI) un hidroksibenzotriazola (HOBT) maisījumu (metode B).

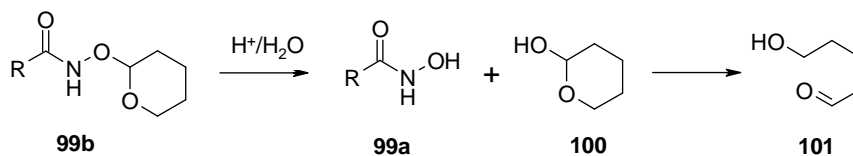
Tā kā DKB izveidei tika izmantotas ļoti mazas hidroksāmskābju koncentrācijas, tad mērķis bija iegūt hromatogrāfiski tīrus substrātus, lai novērstu sintēzes blakusproduktu iespējamo ietekmi uz pārācilēšanās reakcijas līdzsvaru un amplifikācijas noteikšanu.

Aktivētās karbonskābes **97a-b**, neizolējot tās no reakcijas vides, un karbonskābju hloranhidrīdi **97c** reaģēja ar hidroksilamīnu (**98a**) vai *O*-tetrahidropiranil-hidroksilamīnu (**98b**) kā nukleofīlu, veidojot attiecīgi hidroksāmskābes **99a** vai *O*-THP aizsargātas hidroksāmskābes **99b**:



Tetrahidropiranil-aizsarggrupa (THP) tiek izmantota, jo iegūtās *O*-THP aizsargātās hidroksāmskābes **99b** ir vieglāk attīrīt no aktivējošo reaģentu radītajiem piemaisījumiem.

Parasti THP-aizsarggrupa tiek nošķelta dažu stundu laikā skābos apstākļos (1 M HCl/dioksāns vai TFA/DCM) un iegūto hidroksāmskābi **99a** atdala no blakusproduktiem – skābes (izmantojot bāzisko ekstrakciju) un 5-hidroksipentanāla (**101**) (mazgājot ar ēteri):

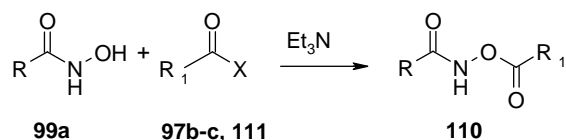


Iegūtās hidroksāmskābes **102** – **109**, to raksturojums un sintēžu iznākumi apkopoti 2.1. tabulā. Dēļ vairākkārtējas attīrīšanas un dažu hidroksāmskābju labās šķīdības ūdenī, izolētie un attīrītie hidroksāmskābju iznākumi svārstās no 26 līdz 85%.

Sintezētās hidroksāmskābes un to raksturojums

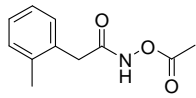
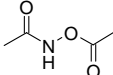
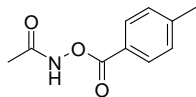
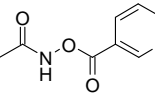
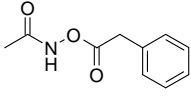
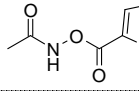
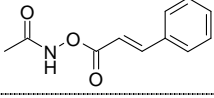
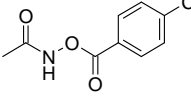
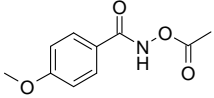
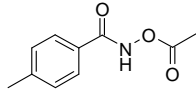
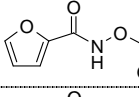
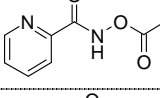
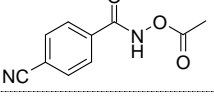
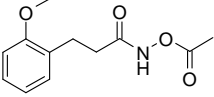
Nr.	Hidroksāmskābes struktūra	Sintēzes metode	Iznākums, %	AEŠH tīrība, %	T _k , °C	AEŠH t _R , min
102		A	41	99	157	7,4
103		A	28	99	145	8,3
104		A	28	99	121	2,6
105		A	47	98	-	4,0
106		A	26	92	132	6,5
107		A	85	97	130	9,5
108		C	THP: 36 HS: 59	98	-	5,1
109		C	THP: 52 HS: 73	99	172	7,8

Acilētās hidroksāmskābes jeb *N,O*-diacilhidoksilamīni **110** ir otra komponente dinamisko kombinatoriālo bibliotēku izveidē. Diacilētie hidroksilamīna atvasinājumi iegūti, acilējot hidroksāmskābes **99a** bāziskā vidē ar atbilstošo karbonskābes hloranhidrīdu **97c** (metode A) vai etiķskābes anhidrīdu (**111**) (metode B), kā arī izmantojot ar EDCI un HOBT aktivētas karbonskābes (**97b**) (metode C):



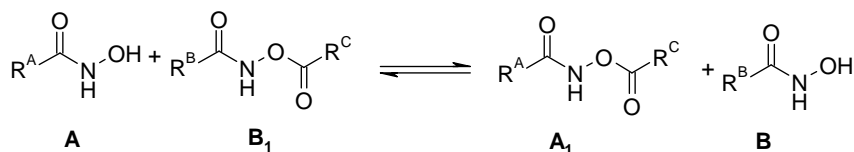
Iegūtās acilētās hidroksāmskābes **112a**, **113a-g**, **102-107a**, to raksturojums un sintēžu iznākumi apkopoti 2.2. tabulā. Sintēžu iznākumi svārstas no 10 – 97%. Kā blakusprodukts sintēzes gaitā visbiežāk veidojās *N,N,O*-triacilēts hidroksilamīns.

Sintezētie *N,O*-diacilhidroksilamīni un to raksturojums

Nr.	<i>N,O</i> -Diacilhidroksilamīna struktūra	Sintēzes metode	Iznākums, %	AEŠH tūriņa, %	T _k , °C	AEŠH t _R , min
112a		B	83	99	106	10,9
113a		B	20	98	-	2,3
113b		A	17	99	144	10,7
113c		A	96	99	-	3,0
113d		A	54	96	110-116	9,9
113e		A	10	97	92	5,9
113f		B	61	98	167-169	11,2
113g		A	66	99	143	11,3
102a		B	56	99	98	9,9
103a		B	76	97	115	10,6
104a		B	97	93	-	6,6
105a		B	23	97	-	8,6
106a		B	48	97	132	9,6
107a		B	41	97	124	11,5

2.1.2. *N,O*-Diacilhidroksilamīnu pārācilēšanās reakcijas izpēte DKB izveidei

Darba mērķis ir izpētīt *N,O*-diacilhidroksilamīnu **A**₁, **B**₁ pārācilēšanās reakciju, kā potenciālo apgriezenisko reakciju dinamiskās kombinatoriālās ķīmijas pētījumiem ūdens vidē:



Ūdens vidē kā blakusreakcija iespējama *N,O*-diacilhidroksilamīnu **A**₁, **B**₁ hidrolīze, kā arī deprotonētu *N,O*-diacilhidroksilamīnu **A**₁, **B**₁ Losena pārgrupēšanās.

Lai pārbaudītu reakcijas piemērotību DKB izveidei, tika analizētas literatūrā [1] minētās prasības un tās attiecinātas uz acilgrupas pārneses reakciju:

1) Reakcijai jābūt apgriezeniskai pieņemamā laika skalā. Ja komponentēm būs atšķirīgs blakusreakciju ātrums, nenovēros līdzsvara iestāšanos, tāpēc maksimāli būtu jācenšas samazināt *N,O*-diacilhidroksilamīnu hidrolīzes ātrumus un jāizvairās no bāziskiem apstākļiem, kas veicinātu pārgrupēšanos.

2) Līdzsvara reakcijai jābūt savietojamai ar templāta, respektīvi, enzīma pievienošanas apstākļiem. Tāpēc nepieciešams reakciju pētīt ūdens vidē vai buferšķīdumā, enzīmam piemērotos pH apstākļos, istabas vai fizioloģiskajā temperatūrā.

4) Visām bibliotēkas komponentēm jābūt šķīstošām analizējamajā vidē. Tā kā daudzu organisko savienojumu šķīdība ūdenī ir visai ierobežota, tad tās uzlabošanai pievieno nelielu daudzumu DMSO. Darbā ar enzīmiem maksimālais pieļaujamais DMSO daudzums ir 5% no šķīduma tilpuma [10].

5) Reakcijai jābūt apstādināmai – iesaldējamai, lai būtu iespējama komponentu izolēšana un analīze, taču tā kā nav pētītas acilhidroksāmskābju pārācilēšanās un blakusreakciju apstādināšanas metodes, tad reakciju maisījumiem uzņemtas hromatogrammas pēc noteikta laika bez papildus komponentu izolēšanas vai apstrādes.

2.1.2.1. Analīzes metodes izvēle

Reakcijas gaitas pētījumiem un līdzsvara noteikšanai visbiežāk izmanto kodolmagnētisko rezonansi vai šķidruma hromatogrāfiju. Izvērtējot abas metodes [59], secināts, ka AEŠH ir piemērotāka metode reakcijas gaitas novērošanai, jo:

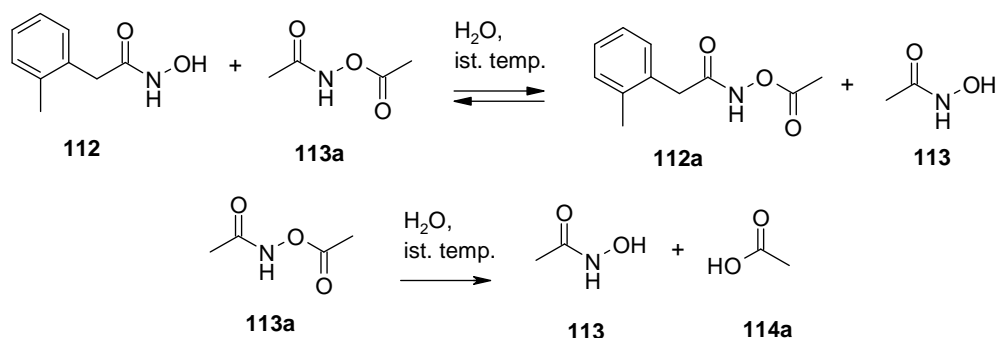
1) vairāku bibliotēkas komponentu gadījumā KMR spektru interpretācija kļūtu sarežģītāka daudzo signālu dēļ, turpretim AEŠH katra komponente dod tikai vienu signālu. Turklāt, enzīms pirms analīzēm būtu jāizolē no reakcijas vides, lai izvairītos no enzīma signāliem spektrā;

2) izmantojot KMR nepieciešami vismaz 3 mg katras komponentes, bet AEŠH nepieciešams mazāk kā 1 mg. Līdzsvara brīdī templāts (proteīns) tiek pievienots ekvimolārā daudzumā, tāpēc vēlams šķīdumus gatavot mazākās koncentrācijās, kas samazinātu pētījumu izmaksas;

3) kā būtisku faktoru jāmin arī aparatūras pieejamība, kas AEŠH gadījumā ir daudz atbilstošāka šāda veida pētījumiem.

Tā kā AEŠH par kustīgo fāzi izmanto ACN/buferšķīdums (mazas koncentrācijas skābes šķīdumus (0,1% H₃PO₄)), tad bija nepieciešams izpētīt, vai eluenta sistēmas pH izmaiņa neietekmē pāracilēšanās reakcijas līdzsvaru, jo hromatogrammas tiek uzņemtas neapturot reakciju, bez jebkādas papildus komponentu izolēšanas vai apstrādes.

Tam nolūkam divas vienādi pagatavotas pāracilēšanās reakcijas un hidrolīzes reakcijas (substrātu sākotnējā koncentrācija 0,5 mg/mL) tika analizētas, kā kustīgo fāzi izmantojot gan ACN/0,1% H₃PO₄, gan ACN/H₂O:



Ar hromatogrāfiskajiem pētījumiem tika pierādīts, ka analīzes gaitā izmantotās kustīgās fāzes pH būtiski neietekmē pāracilēšanās un hidrolīzes reakciju ātrumus (skat. 2.3. tab. 1.-2. un 4.-5. rinda). Vērā ņemams fakts ir tas, ka, ja reakcijas veic 0,1% fosforskābes šķīdumā (pH=2), pāracilēšanās reakcija praktiski nenotiek (skat. 2.3. tab. 3. rinda), taču hidrolīzes reakcijas ātrums būtiski netiek ietekmēts (skat. 2.3. tab. 6. rinda). Tādējādi vides skābuma palielināšana varētu tikt izmantota, lai apturētu pāracilēšanās reakciju.

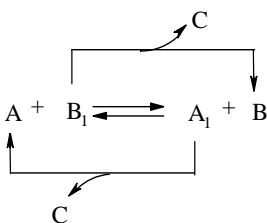
2.3. tabula

ACN/H₂O un ACN/0,1%H₃PO₄ gradientu sistēmu salīdzinājums

Nr.	Šķīdinātājs	AEŠH kustīgā fāze	Hidroksāmskābes 112 konversija, %					
			5 min	30 min	2 h	3 h	6 h	24 h
1	H ₂ O	ACN/0,1% H ₃ PO ₄	0	15	45	51	53	47
2	H ₂ O	ACN/H ₂ O	0	16	37	49	50	47
3	0,1 % H ₃ PO ₄	ACN/0,1% H ₃ PO ₄	0	0	0	0	0	3
			Acilhidroksāmskābes 113a konversija, %					
			5 min	2 h	4 h	24 h		
4	H ₂ O	ACN/0,1% H ₃ PO ₄	6	9	11	32		
5	H ₂ O	ACN/H ₂ O	6	9	10	30		
6	0,1 % H ₃ PO ₄	ACN/0,1% H ₃ PO ₄	6	10	12	36		

2.1.2.2. Reakcijas dinamikas pētījumi

Ja nenotiktu blakusreakcijas, reakcijas līdzsvars izpaustos kā nemainīga visu bibliotēkas komponentu koncentrācija laikā, taču pētāmajā reakcijā viens no hidrolīzes produktiem ir hidroksāmskābe (skat. 2.1. att. **A**, **B**), kas no jauna piedalās pāracilēšanās reakcijā. Šajā gadījumā hidroksāmskābju (**A**, **B**) koncentrācija reakcijas gaitā pieaug, bet *N,O*-diacilhidroksilamīnu (**A**₁, **B**₁) koncentrācija samazinās.



2.1. att. **Hidroksāmskābju pāracilēšanās reakcijas vispārēja shēma**, **A**, **B** – hidroksāmskābes, **A**₁, **B**₁ – *O*-acilhidroksāmskābes, **C** – no acilgrupas veidojusies karbonskābe

Citas literatūras apskatā (skat. 1.1.1. nod.) aprakstītās līdzsvara iestāšanās noteikšanas un pārbaudes metodes (izveidojot divas vienādas bibliotēkas ar atšķirīgiem sākuma substrātiem, nomainot reakcijas apstākļus, vai izolējot vienu substrātu) blakusreakciju dēļ pētāmajai reakcijai nav iespējams izmantot.

Ja hidrolīzes ātrumi ir salīdzinoši nelieli un abiem *N,O*-diacilhidroksilamīniem salīdzināmi, ir iespējams reģistrēt *N,O*-diacilhidroksilamīnu savstarpējo dinamisko mijiedarbību un līdzsvaru, tāpēc reakcijas gaitas attēlošanai un dinamikas noteikšanai tika izmantots tikai *N,O*-diacilhidroksilamīnu (**A**₁, **B**₁) koncentrāciju attiecības, neņemot vērā hidroksāmskābju (**A**, **B**) daudzumus.

N,O-Diacilhidroksilamīnu (**A**₁, **B**₁) savstarpējais līdzsvars būs iestājies tad, ja attiecība:

$$\frac{[B_1]}{[A_1]} \text{ vai } \frac{[A_1]}{[B_1]} = \text{konst.}, \quad (2.1.)$$

kur [A₁], [B₁] ir *N,O*-diacilhidroksilamīnu koncentrācijas reakcijas maisījumā, kļūs konstanta laikā.

Vairākkomponentu bibliotēkās *N,O*-diacilhidroksilamīnu savstarpējo dinamiku var aplūkot kā katra atsevišķa *N,O*-diacilhidroksilamīna koncentrācijas [A_n] attiecību pret kopējo reakcijas maisījumā esošo *N,O*-diacilhidroksilamīnu koncentrāciju summu $\sum[X_n]$ laikā:

$$\omega_{\text{konc.}} = \frac{[A_n]}{\sum[X_n]}, \quad (2.2.)$$

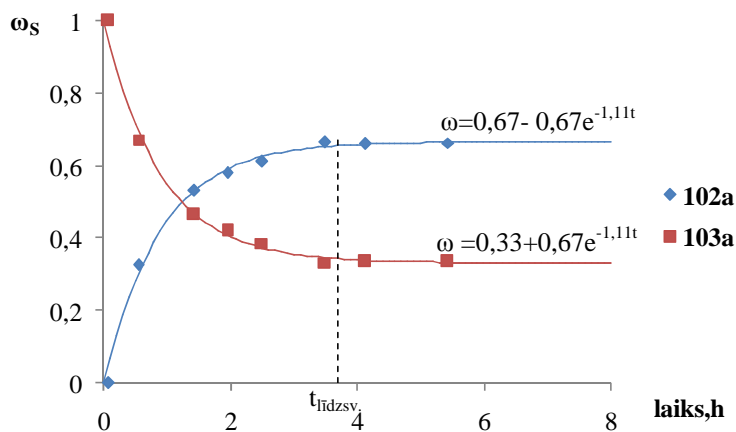
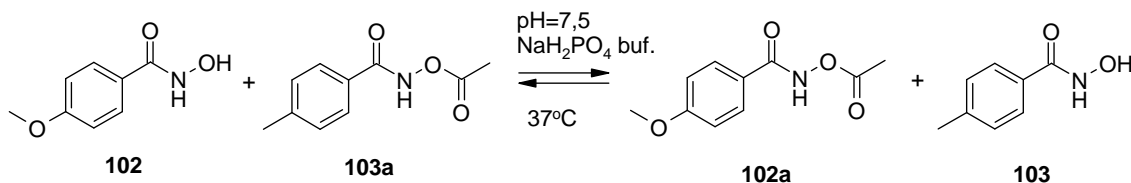
kur $\omega_{\text{konc.}}$ – koncentrāciju attiecības.

Darbā aprēķinos izmantoti *N,O*-diacilhidroksilamīnu AEŠH absorbciju hromatogrammu signālu laukumi, kuri ir proporcionāli maisījumā esošo vielu koncentrācijām, līdz ar to *N,O*-diacilhidroksilamīnu savstarpējo dinamiku var attēlot kā ω_S izmaiņu laikā:

$$\omega_S = \frac{S_{HS-Ac}}{\sum(S_{nHS-Ac})}, \quad (2.3.)$$

kur S_{HS-Ac} – katra atsevišķa *N,O*-diacilhidroksilamīna hromatogrammas laukums, $\sum(S_{nHS-Ac})$ reakcijas maisījumā esošo *N,O*-diacilhidroksilamīna hromatogrammu laukumu summa.

Piemēram, reakcijas, kur hidroksāmskābe **102** reaģē ar *N,O*-diacilhidroksilamīnu **103a**, acilēto komponentu attiecības laikā attēlotas 2.2. attēlā.



2.2. att. *N,O*-Diacilhidroksilamīnu savstarpējās dinamikas grafiska attēlošana un līdzsvara noteikšana

Praktiski iegūtos punktus grafikā var aprakstīt, izmantojot eksponentes vienādojumu, kurš optimizēts, izmantojot *Solver* funkciju *MS Excel* programmā.

N,O-Diacilhidroksilamīna **103a**, kurš tiek pievienots reakcijas sākumā, hromatogrammas signāla laukuma attiecību pret abu *N,O*-diacilhidroksilamīnu laukumu summu iegūtos punktus laikā apraksta vienādojums:

$$\omega = \omega_\infty + (\omega_0 - \omega_\infty)e^{-kt}, \quad (2.4.)$$

kur, $\omega_\infty = \frac{[S_{103a}]}{S_{102a} + S_{104a}}$ – līdzsvara brīdī, $\omega_0 = \frac{[S_{103a}]}{S_{102a} + S_{103a}}$ – reakcijas sākumā, t – laiks, k –

N,O-diacilhidroksilamīnu savstarpējā līdzsvara konstante.

Bet *N,O*-diacilhidroksilamīna **102a**, kurš reakcijā veidojas, signāla laukuma attiecības pret abu diacilhidroksilamīnu summu iegūtos punktus laikā apraksta vienādojums:

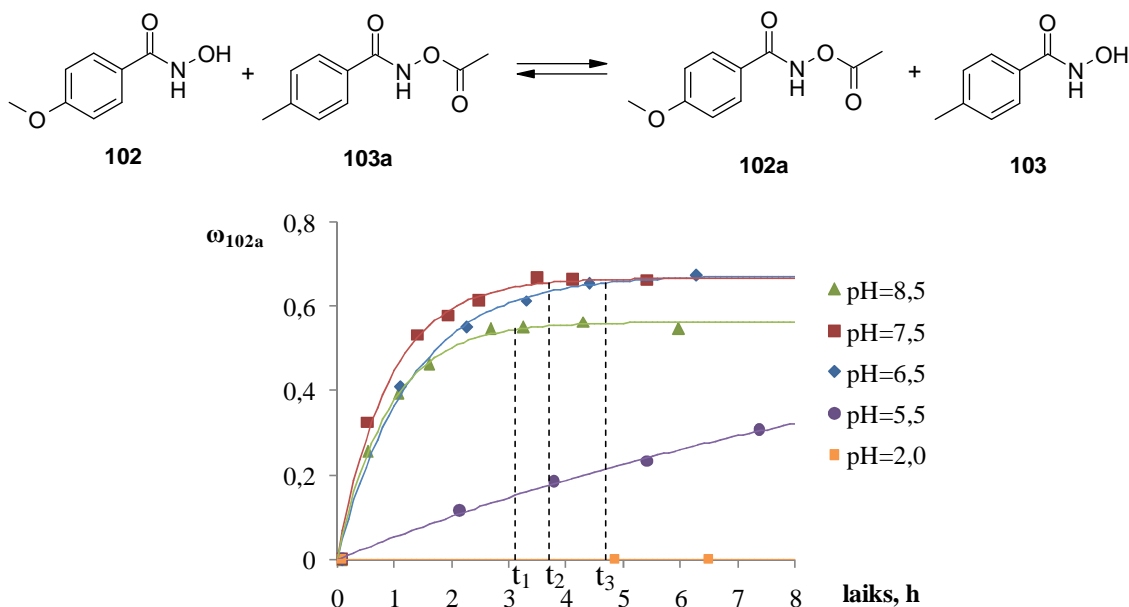
$$\omega = \omega_{\infty} - \omega_{\infty} e^{-kt}. \quad (2.5.)$$

No teiktā izriet, ka reakcijas dinamiku ir iespējams raksturot, izmantojot tikai *N,O*-diacilhidroksilamīnu savstarpējās attiecības laikā. Teorētiski šāda vienādojuma gadījumā reakcijas līdzsvars iestājas laikā t_{∞} , taču DKĶ pētījumiem *N,O*-diacilhidroksilamīnu savstarpējā dinamika ir pietiekama, jeb nosacīts *N,O*-diacilhidroksilamīnu savstarpējais līdzsvars būs, kad $\omega = \omega_{\infty}$, jeb konkrētajā piemērā, kad $\omega = 0,67$. Pievienojot enzīmu šādai dinamiskai sistēmai, labākā liganda amplifikācijas radītās līdzsvara izmaiņas būs uzskatāmas un kvantitatīvi novērtējamas. Nosacītu līdzsvaru var aptuveni novērtēt pēc grafika, nolasot $t_{\text{līdzsv.}}$, kad $\omega = 0,66$ (vizuāli, līkne kļūst paralēla x asij). Apskatītajā reakcijā $t_{\text{līdzsv.}} = 3,7$ h.

2.1.2.3. Reakcijas apstākļu izvērtēšana ūdens šķīdumos

Vides pH ietekme uz pāracilēšanās ātrumu

Funkcionāliem bioproteīniem atbilstošu vidi nodrošina, izmantojot buferšķīdumus. Reakcijas vides pH ietekme uz līdzsvara iestāšanās ātrumu reakcijā starp hidroksāmskābi **102** un acilēto hidroksāmskābi **103a** noteikta NaH_2PO_4 buferšķīdumos ar dažādām pH vērtībām (kā pH 2 izmantots 0,1 % H_3PO_4 šķīdums).

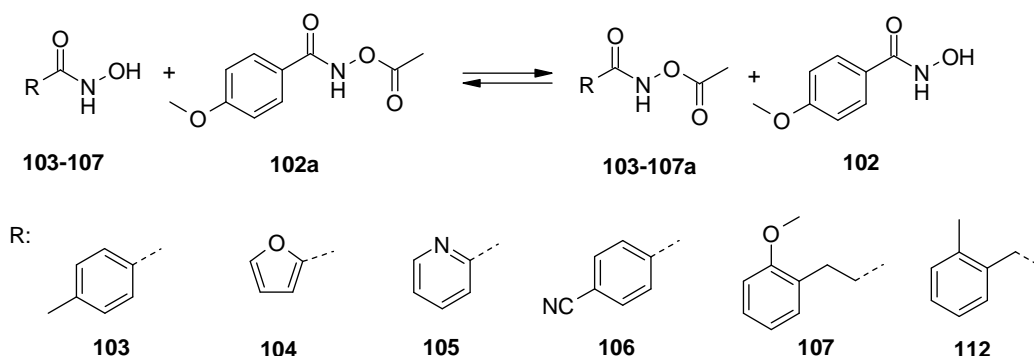


2.3. att. Reakcijas vides pH ietekme uz pāracilēšanās reakcijas līdzsvara iestāšanās ātrumu (37 °C, c=0,2 mM)

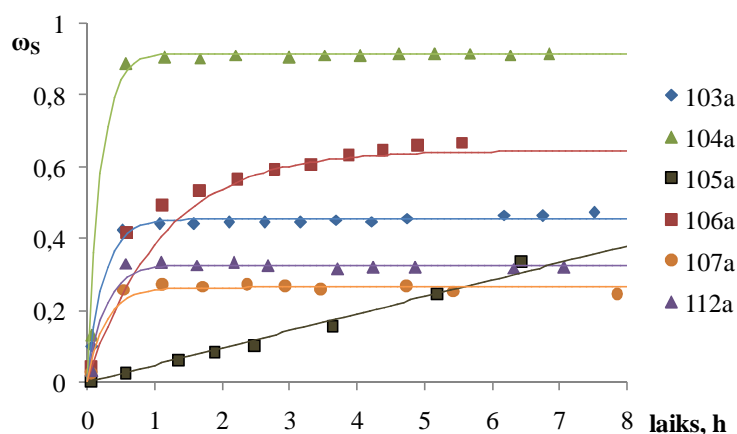
Kā redzams 2.3. grafikā, jo zemāka pH vērtība, jo līdzsvars iestājas lēnāk: $t_{\text{līdzsv.}(1)}(\text{pH } 8,5) > t_{\text{līdzsv.}(2)}(\text{pH } 7,5) > t_{\text{līdzsv.}(3)}(\text{pH } 6,5) > t_{\text{līdzsv.}}(\text{pH } 5,5) \gg t_{\text{līdzsv.}}(\text{pH } 2,0)$. Sasniedzot pH 2,0 pāracilēšanās netiek novērota.

Pāracilēšanās reakcija ar strukturāli atšķirīgām komponentēm

Līdzsvara iestāšanās pētījumi amonija acetāta buferšķīdumā (pH=7,2) istabas temperatūrā veikti, izmantojot divkomponentu sistēmas ar dažādām hidroksāmskābēm **103**-, **112** un diacilhidroksilamīnu **102a**:



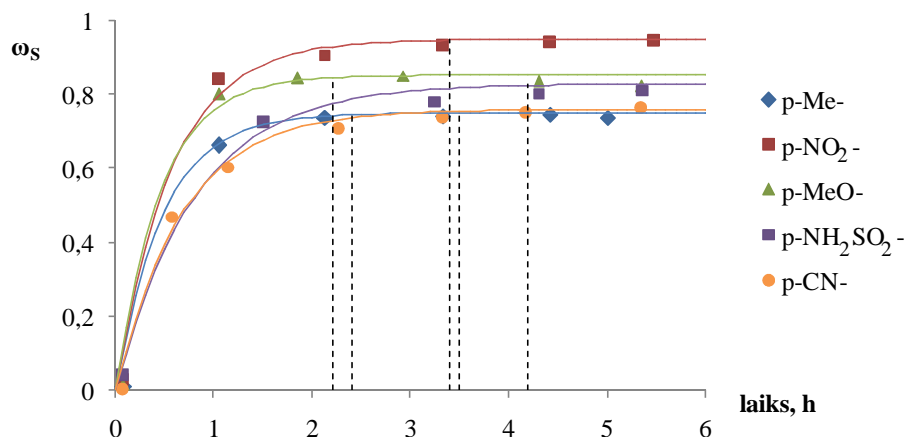
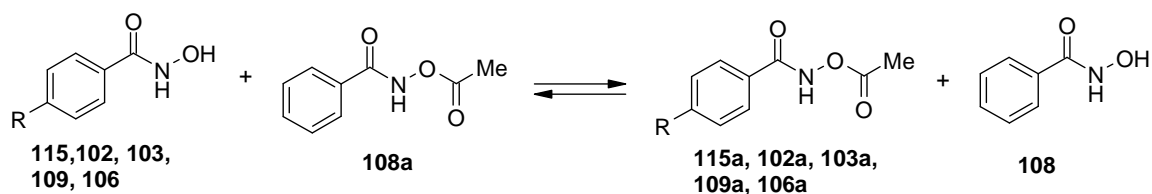
Kā redzams 2.4. attēlā, līdzsvars iestājas apmēram pēc 1 h, ja ar *O*-acetil-4-metoksi-fenilhidroksāmskābi (**102a**) reaģē hidroksāmskābes **103**, **104**, **107** un **112**.



2.4. att. Divkomponentu sistēmu dinamikas pētījumi, izmantojot dažādus substrātus (ist. temp., c=0,5 mg/mL, pH=7,2 CH₃COONH₄ buf.)

Atsevišķi jāizceļ *O*-acetil-4-cianofenilhidroksāmskābes (**106a**) un piridīna grupu saturošās hidroksāmskābes **105** pāracilēšanās reakcija, kur līdzsvara iestāšanos 8 h laikā nenovēro. To var izskaidrot ar to, ka tiešās un/vai apgriezeniskās pāracilēšanās reakcijas ātrums ir lēnāks kā *N,O*-diacilhidroksilamīnu hidrolīzes ātrums. Šo efektu var pastiprināt atšķirīgais *N,O*-diacilhidroksilamīnu hidrolīzes ātrums un/vai hidroksāmskābju atšķirīgā nukleofilitāte.

Vienādos reakcijas apstākļos, izveidojot divkomponentu sistēmas no *O*-acetilfenilhidroksāmskābes (**108a**) un atšķirīgi *para*-stāvoklī aizvietotām hidroksāmskābēm **115** (R: -SO₂NH₂), **102** (R: -OMe), **103** (R: -Me), **106** (R: -CN) un **109** (R: -NO₂), tika pārbaudīta aizvietotāju elektronisko efektu ietekme uz līdzsvara iestāšanās laiku.

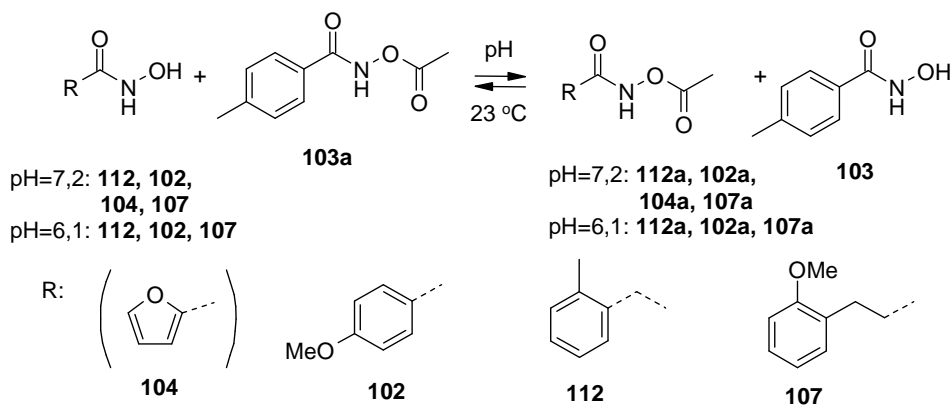


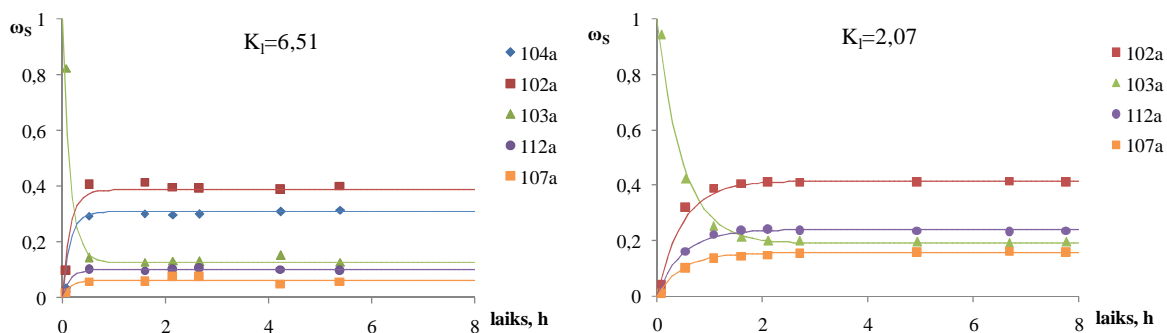
2.5. att. Divkomponentu sistēmu dinamikas pētījumi (37 °C, c=0,5 mM, pH=6,5 NaH₂PO₄ buf.)

No 2.5. attēla secināms, ka aizvietotāja daba (ED vai EA) ietekmē līdzsvara iestāšanās ātrumu. Savienojumu ar EA grupām (*p*-NO₂ (**109**), *p*-SO₂NH₂ (**115**), *p*-CN (**106**)) reakcijās *N,O*-diacilhidroksilamīnu savstarpējais līdzsvars iestājas pēc 3,5 līdz 4,2 stundām, atšķirībā no savienojumu ar ED grupām (*p*-MeO (**102**) *p*-Me (**103**)), kuru reakcijās diacilhidroksilamīnu nosacīts līdzsvars tiek sasniegts pēc 2 – 2,5 stundām.

Pārcilēšanās reakcija vairākkomponentu sistēmā

Līdzsvara iestāšanās vairākkomponentu bibliotēkā, kas sastāv no hidroksāmskābēm **112**, **102**, **104**, **107** un *O*-acil-4-metilfenilhidroksāmskābes **103a** uzskatāmi parādīta 2.6. attēlā.





2.6. att. Vairākkomponentu bibliotēkas dinamikas pētījumi (ist. temp., $c=0,5$ mg/mL): a) pH=7,2 NaH_2PO_4 buf.; b) pH=6,1 NaH_2PO_4 buf.

Grafikos (skat. 2.6. att.) redzams, ka nosacīts līdzsvars, reakciju veicot pH=7,2, iestājās aptuveni pēc stundas, un aptuveni pēc 2 stundām, ja pH=6,1. Tāpat redzams, ka *N,O*-diacilhidroksilamīnu **104a**, **102a**, **103a**, **112a**, **107a** hromatogrammu signālu laukumu attiecības 8 stundu laikā praktiski nemainās, ilgākā laikā *N,O*-diacilhidroksilamīnu koncentrācija bibliotēkā hidrolīzes dēļ samazinās un nav iespējama hromatogrammu precīza integrēšana. Izvēlēto substrātu hromatogrāfiskie signāli nepārklājas, tāpēc ir iespējama katra komponenta identifikācija, kā tas ir redzams attēlotajās AEŠH hromatogrammās pie viļņu garuma 210 nm (hromatogrammas skat. 1. pielikumā).

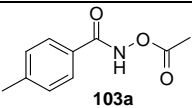
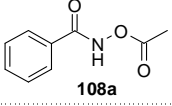
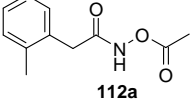
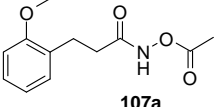
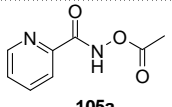
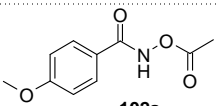
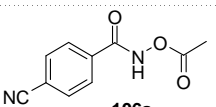
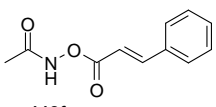
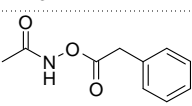
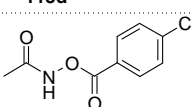
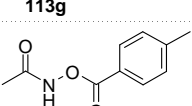
N,O-Diacilhidroksilamīnu blakusreakcijas ūdens vidē

Lai novērtētu *N,O*-diacilhidroksilamīnu blakusreakciju intensitāti, tad 2.4. tabulās tika apkopotas 13 *N,O*-diacilhidroksilamīnu konversijas pēc 3 – 6 h. Datu iegūšanai *N,O*-diacilhidroksilamīni ($c=0,2$ mM) tika maisīti NaH_2PO_4 buferšķīdumā (pH=7,0) 37 °C temperatūrā. AEŠH analīze veikta uzreiz pēc diacilhidroksilamīna iešķīdināšanas buferšķīdumā un pēc noteikta laika, abas hromatogrammas salīdzinātas, lai noskaidrotu diacilhidroksilamīna konversiju dotajos apstākļos.

Jāpiebilst, ka ne visus blakusproduktus iespējams identificēt hromatogrāfiski, piemēram, savienojums neabsorbē UV gaismu 210 un 254 nm, t_R sakrīt ar DMSO iznākšanas laiku ($t_R=2$ min), jeb tukšo/brīvo tilpumu.

Apskatot iegūtos datus redzams, ka, ja hidroksāmskābe acilēta ar acetil-grupu (skat. 2.4. tab. 1.–7. rinda), tad hidrolīze 4 stundu laikā ir aptuveni 10–50%. Ar dažādiem acilētājiem acilētas acetilhidroksāmskābes (**113b,d,f,g**) konversija 4 stundu laikā ir 2 līdz 20% (skat. 2.4. tab. 8.–11. rinda).

O-Acilhidroksāmskābju konversija

Nr.	Acilhidroksāmskābe	t_R	Laiks	Konv.,%	Hidroksāmskābes t_R	Karbonskābes t_R	Pārgrupēšanās produkti, t_R , %
1	 103a	10,5	3 h	38	8,2	nav redzama	15,0, <0,5%
2	 108a	8,9	4 h	23	5,0	nav redzama	13,8, <0,5%
3	 112a	10,6	4 h	16	8,4	nav redzama	nav novēroti
4	 107a	11,2	4 h	20	9,4	nav redzama	nav novēroti
5	 105a	8,4	4 h	10	4,0	nav redzama	nav novēroti
6 ¹	 102a	9,9	3 h	53	7,5	nav redzama	12,9, <0,5%
7 ¹	 106a	9,6	4 h	19	6,5	nav redzama	nav novēroti
8	 113f	11,1	5 h	4	nav redzama	11,8	nav redzami
9	 113d	9,9	4 h	20	nav redzama	10,2	nav redzami
10	 113g	11,3	4 h	9	nav redzama	12,5	nav redzami
11	 113b	10,8	4 h	2	nav redzama	11,7	nav redzami

N,O-Diacilhidroksilamīniem **102a**, **103a**, **108a** reakcijas vidē nedaudz veidojas pārgrupēšanās produkti, taču to daudzums ir ļoti mazs, zīmju veidā redzami mazāk par 0,5% produkta. Jāpiebilst, ka no acilētas acetilhidroksāmskābes **113b,d,f,g** veidotos pārācilēšanās produktus, tāpat, kā pašu acetilhidroksāmskābi AEŠH sistēmā visticamāk arī neredzēs, jo tie

¹ Savienojumu koncentrācija: c=0,5 mg/mL,

neabsorbēs UV gaismu (skat. 2.4. tab. 8.–11. rinda). Taču tā kā pašas acilētās acetilhidroksāmskābes konversija apskatītajā laikā ir maza, tad, ja arī pārgrupēšanās produkti veidojas, tad to daudzums ir niecīgs.

Kopumā jāsecina, ka no izmantotajiem savienojumiem ātrāk hidrolizējas acetil-grupu saturošās hidroksāmskābes, taču katram individuālam substrātam reakcijas ātrums ir atšķirīgs un noteiktas kopsakarības nav saskatāmas.

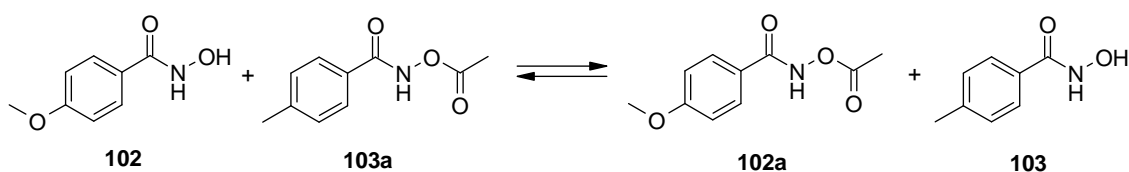
Veiktie pētījumi ir pierādījuši, ka *N,O*-diacilhidroksilamīnu pārecilēšanās reakcija ir piemērota DKB izveidei, taču reakcijas norise ir stipri atkarīga no substrātiem un reakcijas apstākļiem:

- 1) reakcija ir apgriezeniska ūdens vidē istabas un 37 °C temperatūrā;
- 2) pārecilēšanās reakcijas ātrums ir atkarīgs vides no pH (jo skābāka vide, jo *N,O*-diacilhidroksilamīnu savstarpējais līdzsvars iestājas vēlāk, turklāt, ja pH=2, tad pārecilēšanās netiek novērota);
- 3) pārecilēšanās reakcija ir atkarīga arī no izvēlētajiem substrātiem, ja acilēto komponentu iespējamās blakusreakcijas notiks salīdzinoši ātrāk par pārecilēšanos, reakcijas līdzsvaru nenovēros;
- 4) blakusreakcijas (hidrolīzes) ātrums ir atkarīgs no izvēlēta substrāta, izmantotās *O*-acetilhidroksāmskābes hidrolizējas ātrāk;
- 5) Losena pārgrupēšanās apskatītajos piemēros praktiski netiek novērota, dažos gadījumos pārgrupētie produkti tiek reģistrēti tikai zīmju veidā.

Tā kā pirmajos pētījumos tika pierādīts, ka *N,O*-diacilhidroksilamīnu pārecilēšanās reakcija ir piemērota DKB izveidei un tika izstrādāta metode reakcijas gaitas pētīšanai, tad tālāk tika pētīta pārecilēšanās reakcijas piemērotība noteiktu bioloģisku mērķu (enzīmu) ligandu identificēšanai.

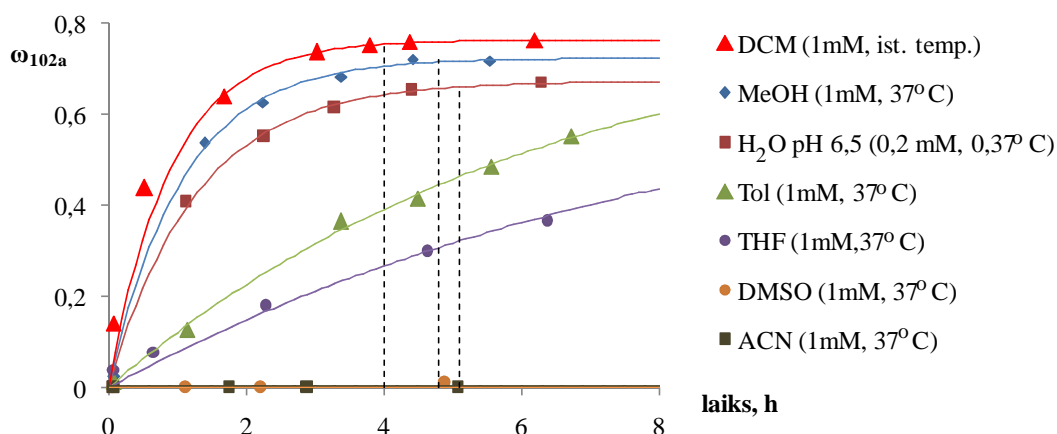
2.1.2.4. Pārecilēšanās reakcija dažādos šķīdinātājos

Tika veikti arī hidroksāmskābes **102** un acilētās hidroksāmskābes **103a** pārecilēšanās reakcijas pētījumi neūdens vidēs, par šķīdinātājiem izmantojot gan polāru protonu MeOH un H₂O (pH 6,5 NaH₂PO₄ buf.) gan polārus aprotonus DMSO, ACN, vidēji nepolārus aprotonus DCM, THF gan arī nepolāru aprotonu šķīdinātāju toluolu (Tol):



Grafikā 2.7. redzams, ka ACN un DMSO pāracilēšanās praktiski nenotiek. THF un toluolā reakcija noris, bet līdzsvara iestāšanos 8 h laikā nenovēro.

MeOH un DCM gadījumā līdzsvara iestāšanās laiks ir salīdzināms ar ūdens vidē novēroto (apm. pēc 4 līdz 5 h). Turklāt DCM nenoris acilēto komponentu hidrolīze, un acilēto komponentu koncentrācija laikā nesamazinās. Turpretim MeOH notiek esteru veidošanās, līdz ar to acilēto savienojumu daudzums laikā samazinās un pēc 8 h vairs nav iespējama acilēto savienojumu hromatogrammu precīza integrēšana.



2.7. att. Pāracilēšanās reakcija dažādos šķīdinātājos (ACN un DMSO pirms AEŠH analīzes r.m. atšķaida 1:10 ar H₂O. THF, Tol, MeOH, DCM pirms AEŠH analīzes r.m. ietvaicē ar argona plūsmu, atšķaida ar 1mL H₂O)

Veiktie pētījumi parāda, ka pāracilēšanās reakcijas norise ir atkarīga no izvēlētā šķīdinātāja, taču iegūtie dati nav pietiekoši, lai precīzi raksturotu šķīdinātāju ietekmi. Iespējams tikai aptuveni izvērtēt kopsakarības starp izmantotajiem šķīdinātājiem:

1) pāracilēšanās reakcija praktiski nenotiek polāros aprotonos šķīdinātājos (DMSO, ACN), savukārt polāros protonos (H₂O un MeOH) izteiktas ir gan pāracilēšanās, gan hidrolīzes (metanolīzes) reakcijas.

2) iespējams, ka šķīdinātāju ūdeņraža saišu akceptorās īpašības palēnina reakcijas norisi, jo šķīdinātājos ar izteiktām H-saišu akceptorām īpašībām (DMSO, ACN) reakcija nenotiek, ar vājākām H-saišu akceptorām īpašībām (THF) reakciju tomēr novēro.

3) šķīdinātājos ar H-saišu donorajām īpašībām (H₂O, MeOH) pāracilēšanās un līdzsvara iestāšanās notiek ātri, bet novēro arī blakusreakcijas (hidrolīzi, metanolīzi).

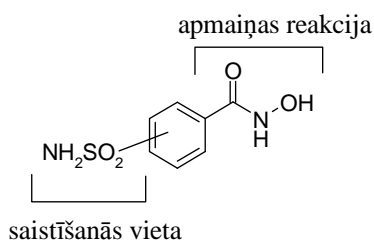
Neūdens vidē pāracilēšanās reakciju var izmantot metālu ligandu identifikācijai vai stabilāko molekulu kompleksu noteikšanai.

2.2. DKB izveide ogļskābes anhidrāzes (CA) ligandu identificēšanai

2.2.1. CA atpazīšanas fragmentu saturošu DKB komponentu sintēze

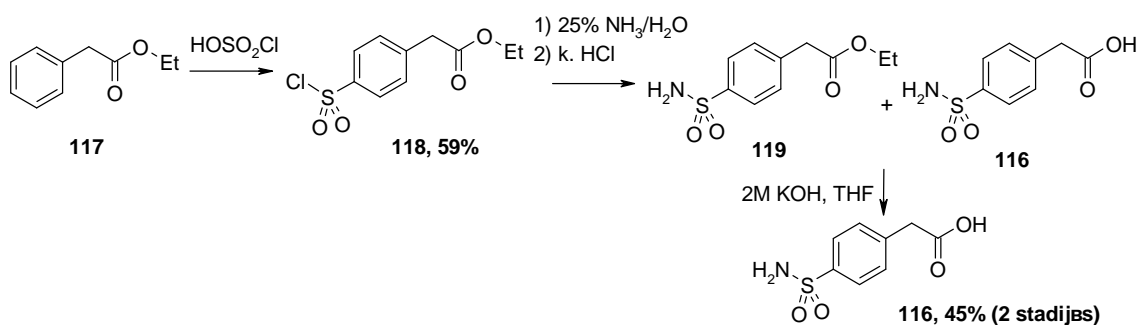
Kā viens no darba uzdevumiem ir izveidot *N,O*-diacilhidroksilamīnu DKB ūdens vidē un pārbaudīt tās piemērotību ogļskābes anhidrāzes CA ligandu identificēšanai.

Šim nolūkam hidroksāmskābes molekula tika modificēta, iekļaujot tajā aminosulfonilgrupu (NH_2SO_2), kas ir CA atpazīšanas fragments – pēc literatūras [9-12, 43, 60] parauga, atstājot nemainīgu hidroksāmskābes daļu, kas piedalās apmaiņas reakcijā (skat. 2.8. att.).

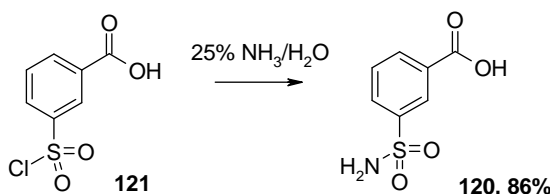


2.8. att. (Aminosulfonil)fenilhidroksāmskābe CA ligandu bibliotēkas izveidei

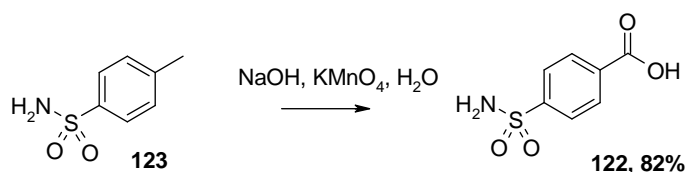
Karbonskābe **116** sintezēta pēc vispārīgas aromātisko sulfonamīdu savienojumu iegūšanas metodes. Sākotnēji veikta 2-feniletiķskābes etilestera **117** aromātiskā gredzena sulfohlorēšana *para*-pozīcijā ar hlorsulfonskābi, iegūtais sulfonilhlorīds **118** tālāk likts reakcijā ar amonjaka ūdens šķīdumu, veidojot aminosulfonilfunkciju. Bāziskos apstākļos tika novērota daļēja estera hidrolīze, tāpēc 2-(*p*-aminosulfonil-)feniletiķskābes esteris (**119**) netika attīrīts, bet pakļauts pilnīgai estera hidrolīzei ar kālija hidroksīdu, lai iegūtu nepieciešamo karbonskābi **116**:



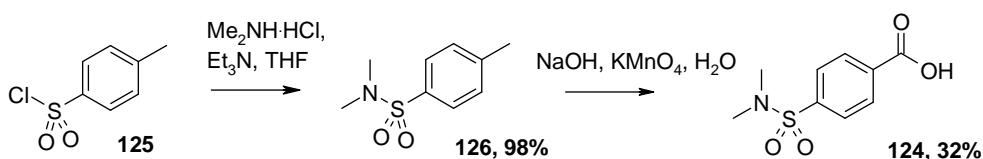
Sulfonilhlorīda reakcija ar amonjaku izmantota arī *m*-aminosulfonilbenzoscābes (**120**) iegūšanai no komerciāli pieejamās *m*-hlorsulfonilbenzoscābes (**121**):



p-Aminosulfonilbenzoscābe (**122**) iegūta no *p*-toluolsulfonamīda (**123**), oksidējot metilgrupu ar kālija permanganātu bāziskos apstākļos:



p-*N,N*-Dimetilaminosulfonilbenzoscābe (**124**) sintezēta no *p*-toluolsulfonilhlorīda (**125**). Sākotnēji sulfonilhlorīda **125** reakcijā ar dimetilamīnu iegūst *p*-toluol-*N,N*-dimetilsulfonilamīdu (**126**). Tālāk pēc jau apskatītās shēmas metilgrupa tika oksidēta ar kālija permanganātu līdz karbonskābei **124**:



Iegūtās aminosulfonilgrupu saturošās karbonskābes **116**, **120**, **122**, **124** tālāk pārvērstas par atbilstošajām hidroksāmskābēm, izmantojot 2.1.1. nodaļā aprakstītās metodes. Sintēžu iznākumi un analīžu dati apkopoti 2.5. tabulā.

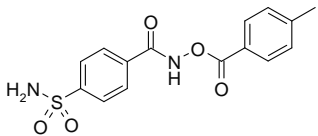
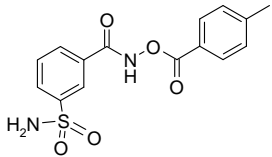
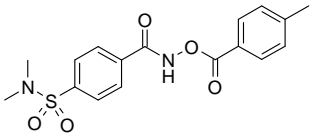
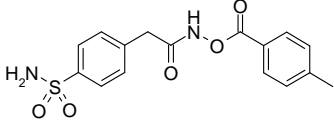
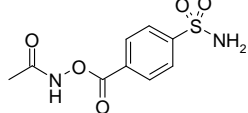
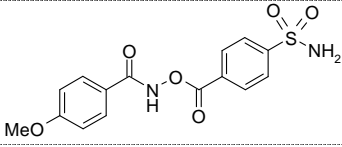
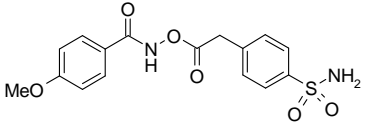
2.5. tabula

Sintezētās hidroksāmskābes un to raksturojums

Nr.	Hidroksāmskābes struktūra	Sintēzes metode	Iznākums, %	AEŠH tīrība, %	T _k , °C	AEŠH t _R , min
115		B	THP: 74 HS: 65	97	152	2,8
127		B	THP: 30 HS: 45	98	>140 sadalās	9,4
128		B	THP: 85 HS: 59	99	154	2,8
129		B	THP: 77 HS: 73	98	>146 sadalās	6,8

Savienojumu acilatvasinājumi sintezēti, izmantojot 2.1.1. nodaļā aprakstītās metodēs. Sintēžu iznākumi un analīžu dati apkopoti 2.6. tabulā.

Sintezētie *N,O*-diacilhidroksilamīni un to raksturojums

Nr.	<i>N,O</i> -Diacilhidroksilamīns	Sintēzes metode	Iznākums, %	AEŠH tīrība, %	T _k , °C	AEŠH t _R , min
115b		A	67	99	185	12,1
128b		A	68	99	>186 sadālās	12,2
127b		A	95	99	148	13,7
129b		A	10	99	169	11,7
113h		C	21	97	n/n	7,2
102h		C	96	98	>140 sadālās	11,4
102l		C	24	98	147	11,1

2.2.2. *N,O*-Diacilhidroksilamīnu DKB izpēte CA klātbūtnē

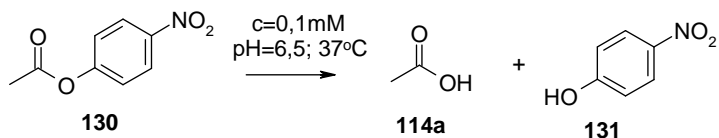
Iegūtās aminosulfonilgrupu saturošās hidroksāmskābes, liekot reakcijās ar dažādu acilgrupu saturošiem *N,O*-diacilhidroksilamīniem, ir iespējams iegūt virkni atšķirīgu aminosulfonilgrupu saturošu *N,O*-diacilhidroksilamīnu vienā bibliotēkā.

Līdzsvarā esošai bibliotēkai, pievienojot CA, būtu jānovēro līdzsvara nobīde un amplifikācija tā aminosulfonilsavienojuma virzienā, kurš ir CA labākais ligands.

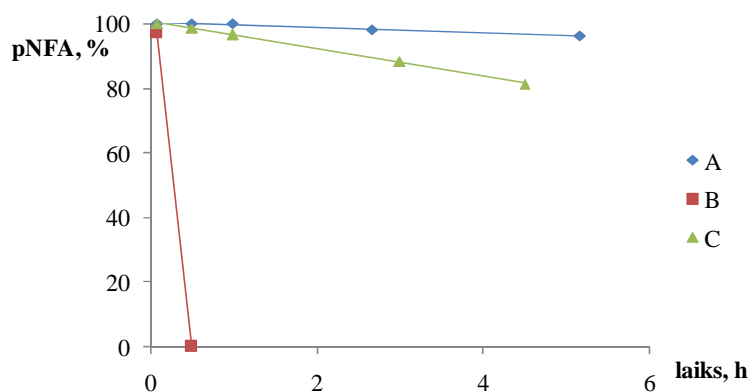
Balstoties uz literatūras datiem, kā vide *N,O*-diacilhidroksilamīnu DKB pētījumiem CA ligandu identificēšanai tika izvēlēts 0,02 M KH₂PO₄/NaOH buferšķīdums ar pH 6,5 [10]. Pētāmo vielu un CA koncentrācijas šķīdumos tika pagatavotas 0,1 mM. Ņemot vērā, ka pētāmo savienojumu šķīdība ūdenī ir ierobežota, tad tās uzlabošanai, šķīdumam tika pievienots DMSO (<5%) [10]. Šādos apstākļos CA nevar notikt agregācijas vai destrukcijas process un tās katalītiskās īpašības netiek traucētas.

Pētījumos izmantots α -CA izoenzīmu maisījums (tālāk tekstā CA). Piegādātāji nenorāda precīzu izoenzīmu attiecību maisījumā, tāpēc sākotnēji tika noteikta α -CA aktivitāte.

Ogļskābes anhidrāzes aktivitātes noteikšanai izmanto *p*-nitrofenilacetāta (*p*NFA, **130**) hidrolīzes reakciju [8, 56]:



*p*NFA saitās CA aktīvajā centrā, kur tiek katalītiski hidrolizēts. Hromatogrāfiski sekojot līdzī reakcijai, redzams, ka *p*NFA bez CA klātbūtnes hidrolizējas lēni (skat. 2.9. att. A), savukārt 10 mol% CA klātbūtnē reakcija tiek katalizēta un noris daudz ātrāk (skat. 2.9. att. B) [8, 56]. Ja šķīdumā tiek pievienots CA inhibitors – acetazolamīds (**36**), hidrolīzes ātrums samazinās (skat. 2.9. att. C), jo acetazolamīds un *p*NFA šķīdumā savstarpēji konkurē uz vietu enzīma aktīvajā centrā.



2.9. att. *p*NFA konversija (%) hidrolīzes reakcijā. Reakcijas apstākļi: A) bez piedevām; B) šķīdumā 0,01 mM CA, C) šķīdumā 0,01 mM CA un 0,1 mM acetazolamīds (**36**)

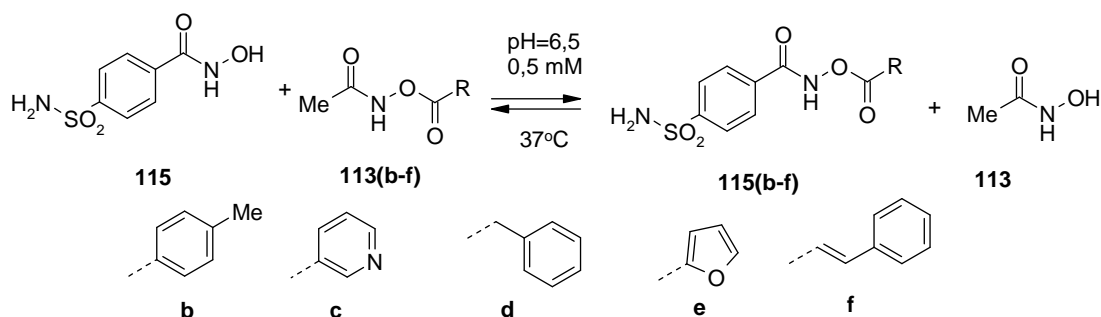
Augstāk minētie eksperimenti pierādīja, ka izvēlētie reakcijas apstākļi ir piemēroti CA aktivitātes pētījumiem. Ņemot vērā, ka eksperiments viegli paveicams ķīmijas laboratorijā, to var izmantot kā ekspresmetodi arī citu savienojumu inhibitorās aktivitātes noteikšanai.

Jāpiebilst, ka izmantotais ogļskābes anhidrāzes izoenzīmu maisījums AEŠH apstākļos dod platu signālu no 9. līdz 10. min (skat. 2. pielikumu).

2.2.2.1. Aminosulfonilgrupu saturošu hidroksāmskābju DKB izveide CA ligandu identificēšanai

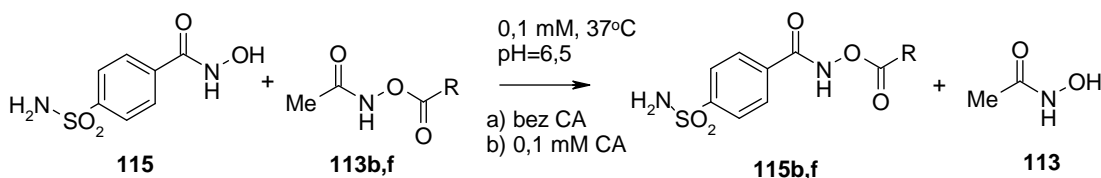
Veidojot divkomponentu DKB sistēmas, kurā viena aminosulfonil-hidroksāmskābe **115** reaģē ar vienu acilētu acetilhidroksāmskābi **113(b-f)**, tika noteikti AEŠH iznākšanas laiki katrai vidē veidotajai acilētajai *p*-aminosulfonilbenzohidroksāmskābei **115(b-f)** (skat. 3. pielikumu).

Savienojumu **115(a-e)** identifikācija veikta, izveidoto bibliotēku paralēli analizējot AEŠH/MS apstākļos.

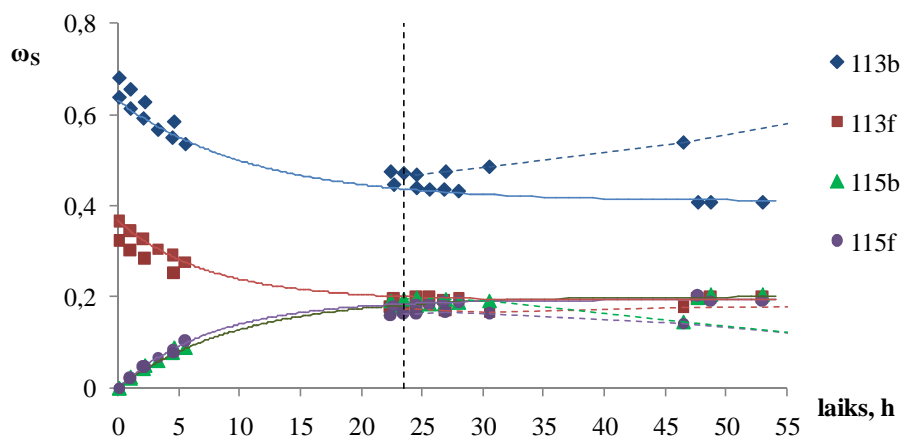


Pētot vienas aminosulfonilgrupu saturošas hidroksāmskābes **115** reakcijas ar dažādiem *N,O*-diacilhidroksilamīniem ilgākā laika skalā gan divkomponentu, gan vairākkomponentu bibliotēkās tika noskaidrots, ka reakcijas līdzsvars tādās bibliotēkās iestājas pēc aptuveni 24 līdz 30 stundām [61].

Izmantojot substrātus, kuru iznākšanas laiki AEŠH nepārklājās savā starpā un ar CA veidoto signālu, tika izveidota vairākkomponentu dinamiskā bibliotēka, CA darbībai nepieciešamajos apstākļos 37°C, pH 6,5 NaH₂PO₄ buferšķīdumā. Ar mērķi noskaidrot ogļskābes anhidrāzes (CA) ietekmi uz reakcijas līdzsvaru, tika veidotas divas paralēlas bibliotēkas no aminosulfonilgrupu saturošas hidroksāmskābes **115** un *N,O*-diacilhidroksilamīniem **113b**, **113f** un pēc 24 h, kad bibliotēkā praktiski iestājies līdzsvara stāvoklis, tika pievienots ekvimolārs CA daudzums:

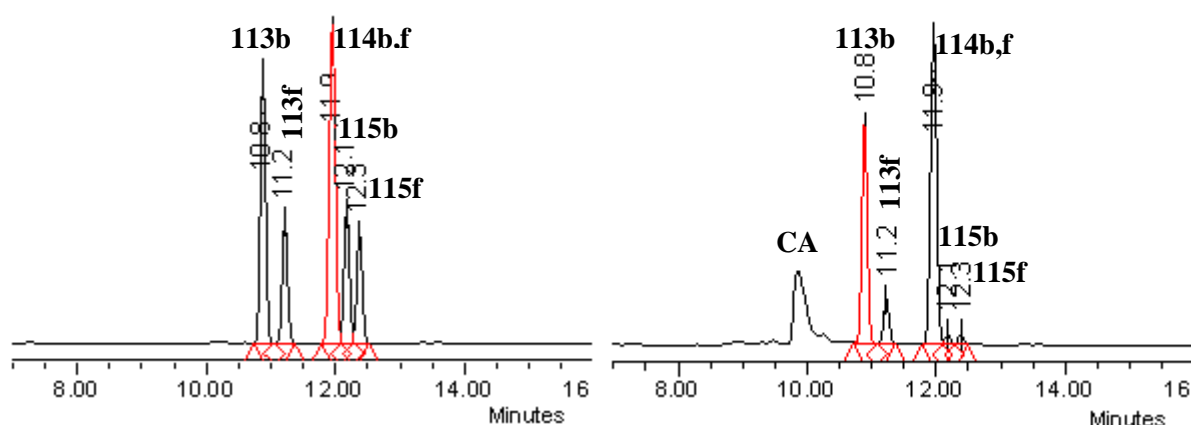


Iegūtie *N,O*-diacilhidroksilamīnu dinamikas novērojumu grafiki redzami 2.10. attēlā.



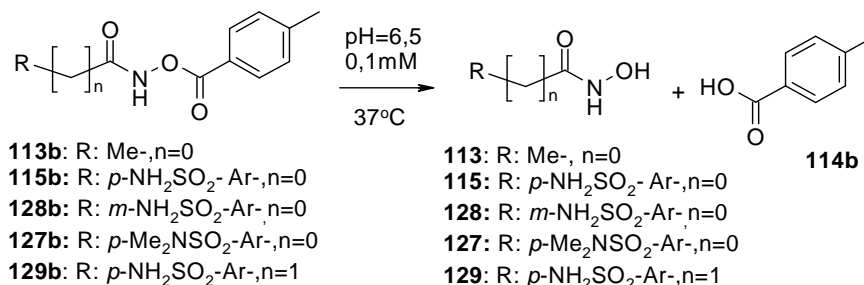
2.10 att. CA ietekme uz *N,O*-diacilhidroksilamīnu savstarpējo dinamiku (CA pievienota pēc 23,5 h; ar raustītu līniju norādītas izmaiņas no līdzsvara bibliotēkā ar pievienotu CA)

Apskatot grafiku, var redzēt, ka CA izraisa nobīdes komponentu attiecībās, tātad bibliotēkā esošie substrāti tiek ietekmēti. Samazinās aminosulfonilgrupu saturošo *N,O*-diacilhidroksilamīnu **115b** un **115f** saturs bibliotēkā, tādējādi pieaug *N,O*-diacilhidroksilamīna **113b** attiecība pret pārējām acilētajām komponentēm. Ja salīdzina hromatogrammas abām paralēlajām bibliotēkām (skat. 2.11. att.), var redzēt, ka būtiski ir samazinājies aminosulfonilgrupu saturošo *N,O*-diacilhidroksilamīnu **115b** un **115f** daudzums bibliotēkā un pieaudzis hidrolīzes produktu – karbonskābju **114b** un **114f** daudzums maisījumā. Līdz ar to tika izvirzīta teorija, ka CA klātbūtnē aminosulfonilgrupu saturošie *N,O*-diacilhidroksilamīni hidrolizējas ātrāk.



2.11. att. AEŠH trīs-komponentu bibliotēkas hromatogrammas pēc 72 h: a) bez pievienotas CA, b) ar pievienotu CA. Redzams, ka pieaugusi hidrolīzes produktu karbonskābju (**114b** un **114f**) signāla intensitāte (abu karbonskābju iznākšanas laiki AEŠH pārklājas)

Lai pārbaudītu vai ogļskābes anhidrāze paātrina *N,O*-diacilhidroksilamīnu hidrolīzi tika pētītas trīs CA aktīvajā centrā koordinēties spējīgu, aminosulfonilgrupu saturošu savienojumu **115b**, **128b**, **129b** hidrolīzes, un divu *N,O*-diacilhidroksilamīnu **113b** un **127b**, nekoordinējošu savienojumu hidrolīzes ar un bez reakcijas maisījumam pievienota enzīma.



Apskatot aminosulfonilgrupu saturošo *N,O*-diacilhidroksilamīnu hidrolīzi CA klātbūtnē un bez CA, redzams, ka gan *para*-, gan *meta*-aminosulfonil-aizvietoto savienojumu **115b** un **128b** hidrolīze enzīma klātienē noris ātrāk (skat. 2.7. tab. 1., 2. un 3., 4. rinda).

CA ietekme uz aminosulfonilgrupu saturošu *N,O*-diacilhidroksilamīnu hidrolīzes ātrumu

Nr.	0,05 mM CA	Acilhidroksāmskābes 115b konversija, %					
		5 min	2 h	7 h	24 h	26 h	55 h
1	nav	0	1	2	6	6	13
2	ir	0	1	4	24	27	68
		Acilhidroksāmskābes 128b konversija, %					
		5 min	2 h	5 h	25 h	27 h	72 h
3	nav	0	1	1	7	7	14
4	ir	0	4	8	40	42	71
		Acilhidroksāmskābes 127b konversija, %					
		5 min	1 h	4 h	26 h	54 h	
5	nav	0	0	1	4	4	
6	ir	0	1	1	4	5	
		Acilhidroksāmskābes 129b konversija, %					
		5 min	6 h	24 h	49 h	72 h	
7	nav	0	0	1	1	2	
8	ir	0	1	1	2	3	
		Acilhidroksāmskābes 113b konversija, %					
		5 min	2 h	5 h	21 h	26 h	50 h
9	nav	2	2	2	5	6	12
10	ir	1	3	2	6	6	13

Pārbaudot tāda *para*-aminosulfonil-aizvietota savienojuma hidrolīzi, kuram starp saistīšanās vietu un hidrolīzes vietu ir par vienu $-\text{CH}_2-$ vairāk (**129b**), noskaidrots, ka CA šāda substrāta hidrolīzi nekatalizē (skat. 2.7. tab. 7., 8. rinda).

Ja substrātam sulfonamīdgrupā $-\text{NH}_2$ (savienojums **115b**) aizvieto pret $-\text{NMe}_2$ (savienojums **127b**), proti pret grupu, kas nespēj koordinēt cinka jonu enzīma aktīvajā centrā, tad CA neietekmē šāda substrāta hidrolīzi (skat. 2.7. tab. 5., 6. rinda). Savukārt, pārbaudot aminosulfonilgrupu nesaturošo *N,O*-diacilhidroksilamīna **113b** hidrolīzi CA klātbūtnē, redzams (skat. 2.7. tab. 9., 10. rinda), ka enzīma CA klātbūtne neietekmē tā hidrolīzes ātrumu.

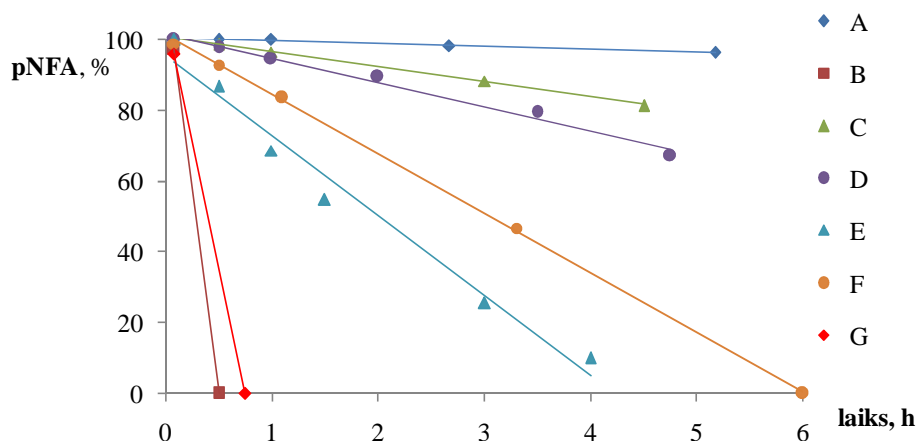
Izvērtējot rezultātus par *N,O*-diacilhidroksilamīnu hidrolīzi CA klātbūtnē, tika izvirzīta hipotēze, ka aminosulfonilgrupu saturošie *N,O*-diacilhidroksilamīni saistās CA aktīvajā centrā, kur tie tiek hidrolizēti. Enzīms nekatalizē tādu *N,O*-diacilhidroksilamīnu hidrolīzi, kas nesaistās CA aktīvajā centrā. Turklāt svarīga ir aminosulfonilgrupas (cinku saistošās grupas) attālums no koordinācijas vietas līdz hidrolīzes centram, jo *para*-aminosulfonil-aizvietota *N,O*-diacilhidroksilamīna **115b** ($n=0$) hidrolīze tiek paātrināta, bet homologiska *N,O*-diacilhidroksilamīna **129b** ($n=1$) hidrolīze netiek novērota.

Literatūrā jau minēts, ka viena no ogļskābes anhidrāzes funkcijām dzīvajos organismos ir aromātisko un alifātisko karbonskābju esteru un dažu halogēnu hidrolīze, taču šīs reakcijas

nav plaši pētītas [8, 35]. CA ietekme uz acilētu hidroksāmskābju hidrolīzi līdz šim nav aprakstīta.

Lai pārbaudītu, vai savienojumi saistās CA aktīvajā centrā, tika izmantota *p*NFA hidrolīzes metode. Tika pārbaudīta *N,O*-diacilhidroksilamīnu **115b**, **129b**, **127b** un hidroksāmskābes **115** klātbūtnes ietekme uz *p*NFA hidrolīzi (skat. 2.12. att.). Reakcijas apstākļi:

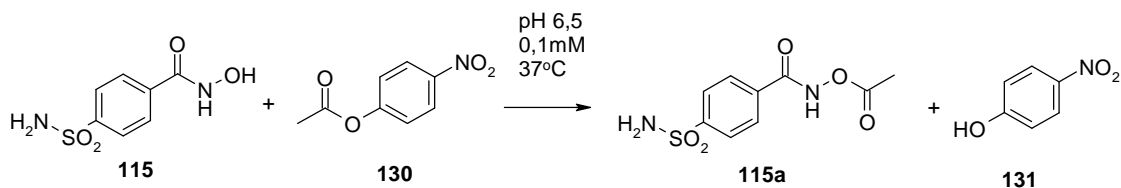
- A) bez piedevām;
- B) 0,01 mM CA
- C) 0,01 mM CA un 0,1 mM acetazolamīds (**36**)
- D) 0,01 mM CA un 0,1 mM *p*-NH₂SO₂Ph-aizvietots *N,O*-diacilhidroksilamīns **115b**;
- E) 0,01 mM CA un 0,1 mM *p*-NH₂SO₂Ph-aizvietota hidroksāmskābe **115**;
- F) 0,01 mM CA un 0,1 mM *p*-NH₂SO₂PhCH₂-aizvietots *N,O*-diacilhidroksilamīns **129b**;
- G) 0,01 mM CA un 0,1 mM *p*-Me₂NSO₂Ph-aizvietots *N,O*-diacilhidroksilamīns **127b**.



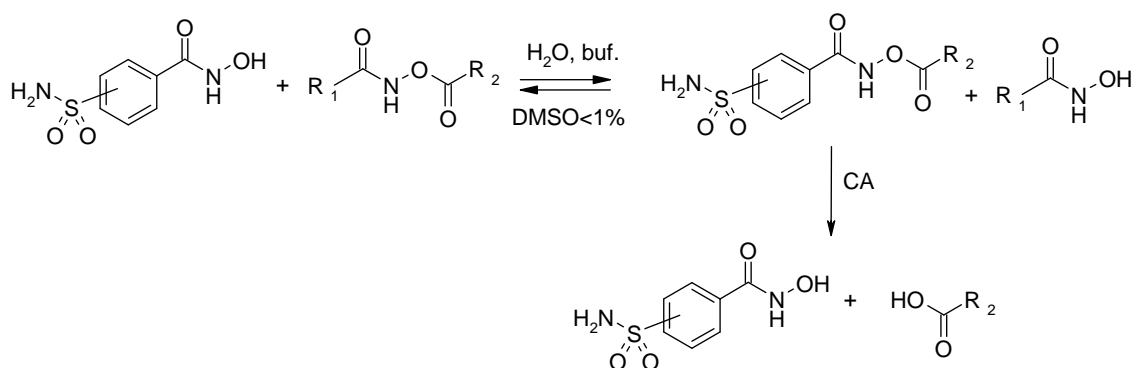
2.12. att. *p*NFA konversija (%) hidrolīzes reakcijā

Kā redzams 2.12. attēlā, tad NH₂SO₂Ph- grupu saturošie savienojumi, līdzīgi kā zināmais CA inhibitors acetazolamīds, samazina *p*NFA hidrolīzes ātrumu, tātad konkurē uz vietu CA aktīvajā centrā.

Diemžēl parādītais grafiks, nedod informāciju par to, cik spēcīgs inhibitors ir katrs substrāts, jo hidrolīzes ceļā reakcijas vidē veidojas hidroksāmskābe, piem., **115**, kas arī reaģē ar *p*NFA (**130**), paātrinot, tā konversiju par *p*-nitrofenolu (**131**):



Apkopojot iegūtos rezultātus, var secināt, ka, izmantojot amplifikācijas metodi, nav iespējams noteikt labāko CA ligandu bibliotēkā, kas veidota no darbā izmantotajām aminosulfonil-hidroksāmskābēm un to *O*-acilatvasinājumiem. Amplifikācijas metode nav piemērojama, jo *N,O*-diacilhidroksilamīni saistās CA aktīvajā centrā, kur enzīms katalizē to hidrolīzi:



Līdz ar to, *N,O*-diacilhidroksilamīnu daudzums reakcijas maisījumā CA klātbūtnē strauji samazinās un to amplifikācija netiek novērota.

Līdzīga situācija novērota tioesteru bibliotēkā [26], kurā enzīms – acetilholīnesterāze hidrolizē labākos ligandus (skat. 1.1.2. nodaļu). Rakstā autori noteikuši karbonskābju daudzuma pieaugumu bibliotēkā, kas neatgriezeniski rodas labākā liganda hidrolīzes reakcijā. Šajā gadījumā nevar noteikt labāko tiola fragmentu tioesteru bibliotēkā, jo atbrīvotais tiols atgriežas apmaiņas reakcijā, kur ātri tiek atgūts iepriekšējais bibliotēkas komponentu sadalījums.

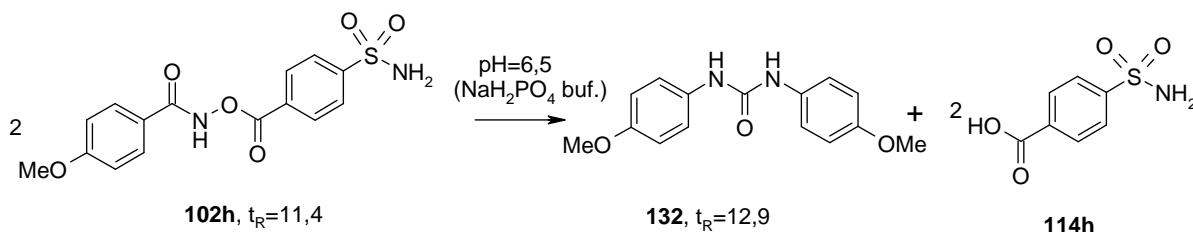
Atšķirībā no tioesteru bibliotēkas, līdzsvara iestāšanās diacilhidroksilamīnu bibliotēkās ir lēnāka par saistīšanos enzīmu un hidrolīzi. Tomēr tas dod iespēju pārācilēšanās rezultātā izveidot statistisku bibliotēku, kurā labākā liganda abas daļas nosaka saistīšanās spēju aktīvajā centrā, tādā gadījumā tiks novērota liganda īpatsvara samazināšanās bibliotēkā, pievienojot enzīmu. Taču tā kā CA hidrolīzes reakcijai nepieciešami noteikti strukturālie nosacījumi (piemērs ar $-\text{CH}_2-$, **129a**), ne visi savienojumi, kas ir enzīma ligandi hidrolizēsies. Daudz piemērotāk šo reakciju būtu pētīt enzīmiem ar hidrolītisku funkciju, piemēram, peptidāzēm.

2.2.2.2. Aminosulfonil-acilgrupu saturošu *N,O*-diacilhidroksilamīnu DKB izveide CA ligandu identificēšanai

Lai izvairītos no CA katalizētas *N,O*-diacilhidroksilamīnu hidrolīzes, kur nepieciešama diezgan noteikta substrātu ģeometrija, tika pārbaudīta tādu *N,O*-diacilhidroksilamīnu izmantošanas iespēja bibliotēku izveidē, kur aminosulfonilgrupa atrodas acildaļā.

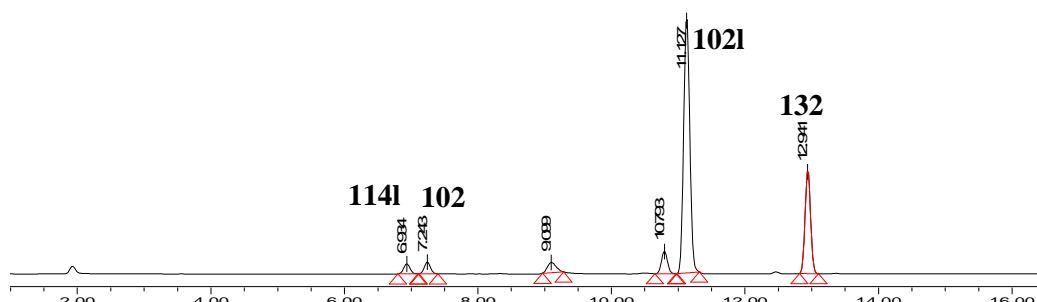
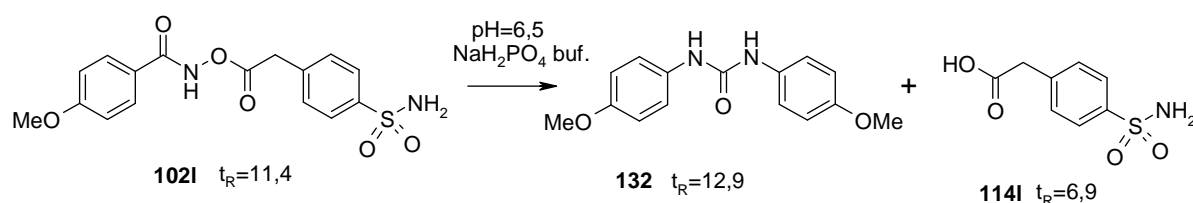
Sākotnēji tika izveidotas vairākas divkomponentu bibliotēkas no *N,O*-diacilhidroksilamīna **113h** un dažādām hidroksāmskābēm **102-104**, **107**, **109**, **112**, lai noteiktu

Lai pierādītu pārgrupēšanās produkta struktūru, *N,O*-diacilhidroksilamīns **102h** tika izturēts bibliotēkas veidošanas apstākļos 24 h, tad reakcijas maisījums ekstrahēts ar EtOAc un savienojumi atdalīti ar kolonnas hromatogrāfijas palīdzību:



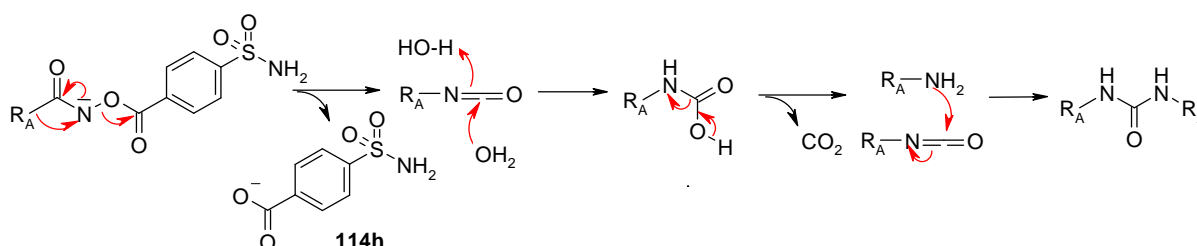
Isolētā savienojuma – urīnvielas atvasinājuma **132** struktūra pierādīta ar ¹H KMR un AEŠH/MS. Arī iznākšanas laiks AEŠH sistēmā sakrīt ar divkomponentu bibliotēkā novēroto.

Acilgrupu pagarinot par vienu –CH₂–, arī tika novērota pārgrupēšanās produktu veidošanās (skat. 1.14. att.)



2.14. att. AEŠH hromatogramma pēc 1 h, *N,O*-diacilhidroksilamīna **102l** ($t_R=11,4$) hidrolīzes/pārgrupēšanās reakcijas novērošanai: redzami produkti – karbonskābe **114l** ($t_R=6,9$), hidroksāmskābe **102** ($t_R=7,4$), pārgrupētais produkts **132** ($t_R=12,9$)

Iepriekš izmantotajos substrātos (ar aminosulfonilfunkciju nesaturēšām acilgrupām) pārgrupēšanās produktu daudzums nebija būtisks (mazāk par 0,5% 4 stundu laikā). Ar *p*-aminosulfonilbenzoylgrupu pārgrupēšanās noris stipri ātrāk, jo pārgrupēšanās ceļā veidotā *p*-aminosulfonilbezoscābe **114h** ir labāka aizejošā grupa, salīdzinot ar citām līdz šim apskatītajām:



Tika arī apskatīta **102h** pārgrupēšanās reakcija dažādos pH. Ogļskābes anhidrāzes bibliotēkas izveidei nepieciešamajos apstākļos pH=6,5 līdz 7,5 pārgrupēšanās notiek ļoti ātri (skat. 2.9. tab 2., 3. rinda), jau pēc pusstundas pārgrupētā produkta daudzums sasniedz aptuveni 40%.

2.9. tabula

***N,O*-Diacilhidroskilamīna 102h pārgrupēšanās produkta 132 veidošanās dažādos pH**

Nr.	Vides pH	Pārgrupēšanās produkta 132 saturs, %					
		5 min	30 min	1 h	2 h	3 h	4h
1	5,5	4	8	11	21	32	34
2	6,5	4	37	42	43		
3	7,5	4	42	46	47		

Pie zemākām pH vērtībām (pH 5,5), pārgrupēšanās noris stipri lēnāk (skat. 2.9. tab. 1. rinda), kas ir saprotams, jo Losena pārgrupēšanos katalizē bāziska vide. Taču pie zemākām pH vērtībām CA zaudē savu aktivitāti; pH 5 tās aktivitāte samazinās par 50% no sākotnējās [33]. Līdz ar to jāsecina, ka darbā apskatīto aminosulfonilgrupu saturošo acilgrupu izmantošana nav piemērota CA ligandu bibliotēkas izveidei.

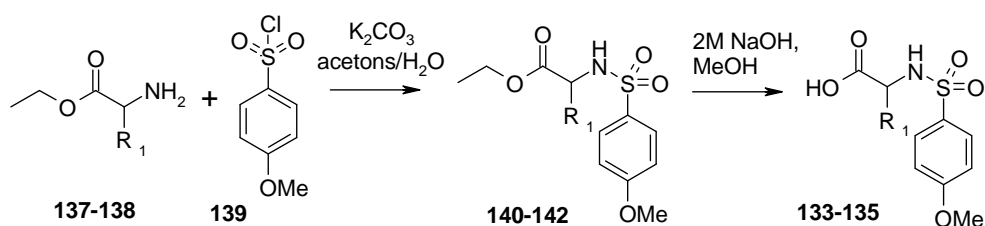
2.3. DKB izveide kolagenāzes (ChC) ligandu identificēšanai

2.3.1. ChC atpazīšanas fragmentu saturošu DKB komponentu sintēze

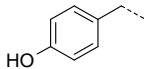


Kā otrs mērķa enzīms darba izstrādē izvēlēts kolagenāze (ChC), līdz ar to darba uzdevums ir izveidot un pārbaudīt *N,O*-diacilhidroskilamīnu DKB piemērotību šī enzīma ligandu identificēšanai.

Pēc literatūras [8, 55] zināms, ka dažādas *N*-sulfonilaminoskābes un *N*-sulfonilaminohidroksāmskābes ir labi kolagenāzes (ChC) inhibitori. Ar mērķi izveidot modeļsavienojumus DKB ChC ligandu identificēšanai, tika sintezēti L-tirozīna, L-fenilalanīna un L-leicīna atvasinājumi pēc literatūrā [55] dotā apraksta.

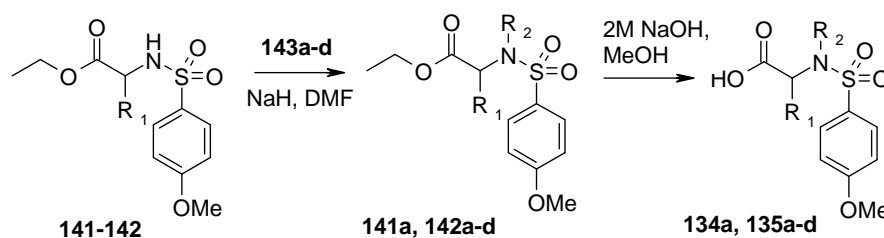
N-(*p*-Metoksifenil-)sulfonilaminoskābes **133-135** iegūtas atbilstošo aminoskābju esteru **137-138** reakcijā ar *p*-metoksisulfonilhlorīdu (**139**). Sintēžu rezultāti apkopoti 2.10. tabulā.



N-(*p*-Metoksifenil-)sulfonilaminoskābju sintēžu rezultāti

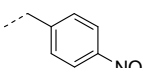
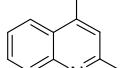
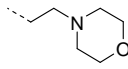
Nr.	R ₁	Aminoskābe	Esteris: iznākums, %		Karbonskābe: iznākums, %	
1		L-tirozīns	140	56	133	35
2		L-fenilalanīns	141	73	134	76
3		L-leicīns	142	73	135	96

N,N-Diaizvietotas sulfonilaminoskābes **134a**, **135a-d** iegūtas, alkilējot atbilstošo *N*-(*p*-metoksifenil-)sulfonilaminoskābes esteru **141**, **142** ar atbilstošo alkilētāju (**143a-b**). Sintēžu rezultāti apkopoti 2.11. tabulā.



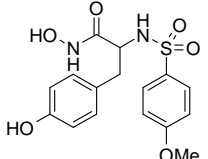
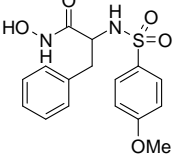
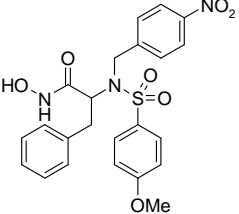
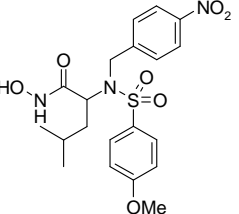
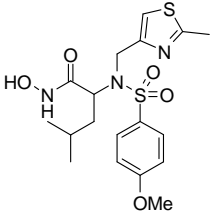
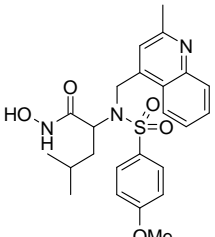
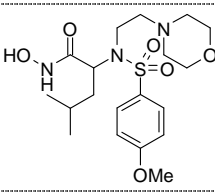
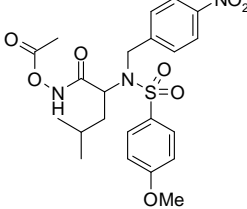
2.11. tabula

N,N-Diaizvietotu sulfonilaminoskābju sintēžu rezultāti

Nr.	R	X	Izejviela	Esteris: iznākums, %		Karbonskābe: iznākums, %	
1		Br-	141	141a	77	134a	99
2	142		142a	96	135a	74	
3		Cl-	142	142b	64	135b	92
4		Cl-	142	142c	62	135c	98
5		Cl-	142	142c	53	135c	92

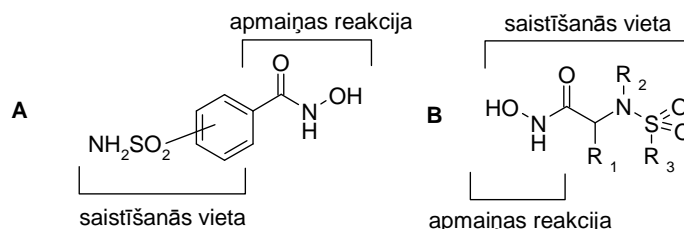
Iegūtie L-leicīna **135a-d**, L-tirozīna **133** un L-fenilalanīna **134**, **134a** atvasinājumi tālāk pārvērsti par atbilstošajām hidroksāmskābēm un to acilatvasinājumiem, izmantojot 2.1.1. nodaļā apskatītās metodes. Sintēžu rezultāti apkopoti 2.12. tabulā.

Sintezētas *N*-sulfonilaminohidrokskāmskābes, to acilatvasinājumi un raksturojums

Nr.	Savienojuma struktūra	Sintēzes metode	Iznākums, %	AEŠH tīrība, %	T _k , °C	AEŠH t _R , min
144		B	THP: 89 HS: 21	96	>146 sadalās	9,5
145		B	THP: 96 HS: 20	99	-	9,9
146		B	THP: 75 HS: 30	99	-	14,2
147		B	THP: 75 HS: 86	99	156	14,1
148		B	THP: 95 HS: 60	99	-	12,7
149		B	THP: 85 HS: 86	99	64	9,5
150		B	THP: 84 HS: 78	96	54	8,4
147a		B	78	97	-	15,2

2.3.2. *N,O*-Diacilhidroksilamīnu DKB izpēte ChC klātbūtnē

Sintezētās *N*-sulfonil-aminohidroksāmskābes atšķirībā no ogļskābes anhidrāzes bibliotēku izveidē izmantotajiem savienojumiem, kuros hidroksāmskābes daļa tika izmantota tikai kā apmaiņas reakcijas nodrošinātājs, ar kolagenāzi saistītos tieši ar hidroksāmskābes funkciju (skat. 2.15. att.).



2.15. att. Hidroksāmskābes: a) CA ligandu bibliotēkas izveidei, B) ChC ligandu bibliotēkas izveidei

Tas nozīmē, ka, pievienojot ChC līdzsvarā esošai acilētu hidroksāmskābju bibliotēkai, tam acilētajam komponentam, kura atbilstošā hidroksāmskābe vislabāk saistītos ar enzīmu, vajadzētu samazināties attiecībā pret pārējiem.

Pēc literatūras [55] zināms, ka ChC maksimālā aktivitāte ir pie pH=7,5 37 °C temperatūrā, turklāt, enzīma aktivitātes nodrošināšanai un struktūras saglabāšanai šķīdumā, nepieciešama 0,1 mol Ca²⁺ jonu pievienošana uz 1 mol enzīma, tādēļ, balstoties uz literatūras datiem, reakciju veikšanai izmantots 0,05M tris(hidroksimetil)aminometāna hidrohlorīda buferšķīdums (Tris-Cl) ar pH vērtību 7,5 un 3,6 mM CaCl₂ piedevu.

Pētījumos izmantota komerciāli pieejamā kolagenāze (*crude Collagenase from Clostridium histolyticum*) jeb vairāku enzīmu maisījums, kuru molmasa ir 68 līdz 125kDa (tālāk tekstā ChC), to skaitā, kolagenāze (7 dažādi gan I, gan II tipa proteīni), nespecifiskas proteāzes, klostripēns (*clostripain*), neitrāla proteāze un aminopeptidāze. Precīzs kolagenāzes saturs maisījumā netiek norādīts. Izmantotais enzīmu maisījums AEŠH sistēmā veido platu signālu no 8 līdz 10 min (skat. 4. pielikumu). Tā kā liela daļa sintezēto hidroksāmskābju t_R ir tieši norādītajā laikā, tas būtiski samazina izmantojamo substrātu izvēli. Ņemot vērā, ka nebija īsti zināms, kas veido platu signālu hromatogrammā, tad, lai atbrīvotos no tā, tika veikti vairāki mēģinājumi sekojošos apstākļos:

1) ChC, hidroksāmskābi **147** un acilētu hidroksāmskābi **127b** saturošais šķīdums tika paskābināts līdz pH=2 (enzīmu struktūra sabrūk), kā rezultātā signāla intensitāte nedaudz samazinājās.

2) ChC un hidroksāmskābi **103** saturošu šķīdums tika filtrēts caur filtru (poru izmērs 10 kD – enzīms paliek uz filtra) – signāla intensitāte būtiski samazinājās, bet joprojām nebija iespējams veikt precīzu integrēšanu (skat. 4. pielikumu).

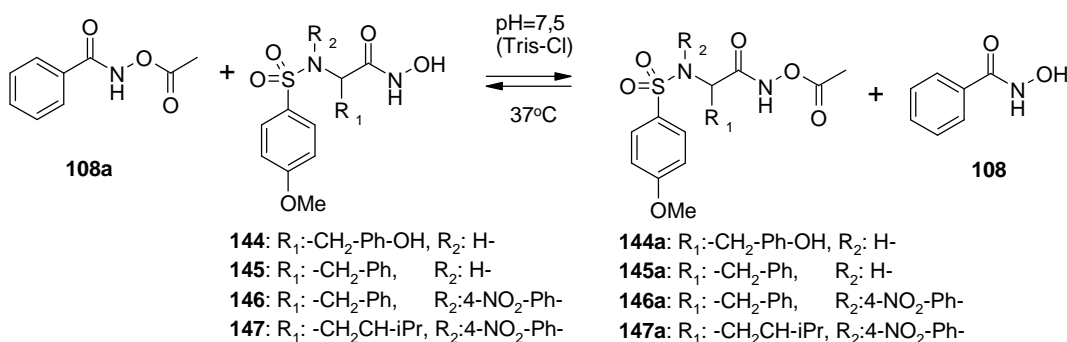
3) Šķīdums tika maisīts 2 min ar aktivētu ogli, tad filtrēts caur cellītu (polāras vielas adsorbējas uz ogles virsmas) – gan hidroksāmskābes, gan acilētas hidroksāmskābes daļēji adsorbējās uz ogles virsmas un to signāli samazinājās.

4) Šķīdums tika filtrēts caur nelielu daudzumu silikagēla. Uz silikagēla palika gan plato signālu veidojošās vielas, gan hidroksāmskābe, gan acilētā hidroksāmskābe.

Pēc veiktajiem eksperimentiem tika secināts, ka plato signālu AEŠH sistēmā veido gan enzīms, gan arī kādas citas vielas (<10 kD), kas ir enzīmu maisījumā, jo filtrējot daļēji izdevās samazināt signāla intensitāti. Tā kā selektīvi no signālu veidojošām vielām atbrīvoties neizdodas, tika nolemts, modeļ-DKB izveidei izmantot tādas hidroksāmskābes un acilhidroksāmskābes, kuru t_R nepārklājas ar enzīma maisījuma radīto.

Lai pārbaudītu, vai izmantojot amplifikācijas metodi iespējams noteikt labāko enzīma ligandu bibliotēkā, tika izveidota bibliotēka, kurā vienlaikus ar strukturāli atšķirīgām hidroksāmskābēm ir viens ar ChC saistīties spējīgs savienojums – *N*-sulfonil-amino-hidroksāmskābe.

Sākotnēji tika izveidotas vairākas divkomponentu sistēmas, izmantojot *N,O*-diacilhidroksilamīnu **108a** un dažādas *N*-sulfonil-aminohidroksāmskābes **144-147**, lai noskaidrotu jauno acilēto savienojumu **144-147a** iznākšanas laikus (t_R) AEŠH sistēmā (paralēli savienojumus identificējot ar AEŠH/MS):



Taču, līdzīgi kā izmantojot diacilhidroksilamīnu **102h**, **102l** CA bibliotēkas veidošanā (skat. 2.2.2. nodaļu), arī savienojumu **144-147a** gadījumā tika novērota pārgrupēšanās produktu veidošanās. Turklāt, veidojās vairāki pārgrupēšanās produkti, no kuriem viens bija pārsvarā katrā divkomponentu sistēmā (skat. 2.13. tab.). Pēc 2 h pārgrupētā produkta daudzums bibliotēkā bija 6 – 12%, un to daudzums ar laiku pieauga.

ChC bibliotēkas izveidošanai izmantoto savienojumu t_R laiki AEŠH sistēmā

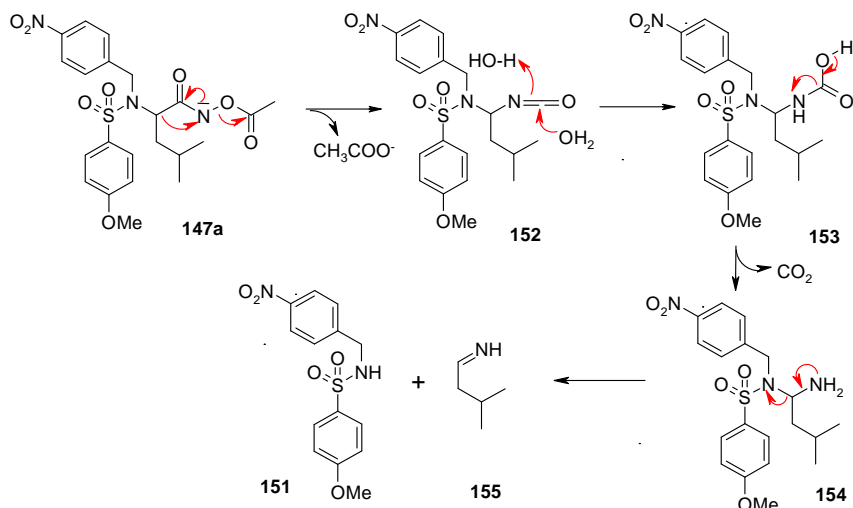
Nr.	Hidroksāmskābe, t_R		<i>N,O</i> -Diacilhidroksilamīns, t_R		Pārgrupēšanās produkts, % (pēc 2 h), t_R	
1	144	9,5	144a	10,8	6	8,4
2	145	9,9	145a	nav novērots	8	8,4
3	146	14,3	146a	15,3	7	13,7
4	147	14,1	147a	15,2	12	13,7

AEŠH/MS pārgrupēšanās produktu molekulārie joni neatbilda nevienam iespējamajam Losena pārgrupēšanas procesā veidotajam produktam. Pēc t_R AEŠH sistēmā bija skaidrs, ka tā ir mazāka/hidrofīlāka molekula par izmantoto *N*-sulfonil-aminohidroksāmskābi. Turklāt, savienojumiem **144** un **145**, kuriem pie slāpekļa ir H- atoms, pārgrupētā produkta laiki sakrīt ($t_R=8,4$). Savienojumiem **146** un **147**, kuri pie slāpekļa ir *p*-nitrobenzoil-aizvietoti, pārgrupētā pamatprodukta t_R laiki ir vienādi (13,7 min).

Jāpiebilst, ka izmantojot citas *O*-acetil-hidroksāmskābes **103a**, **107a** *O*-acetilbenzoilamīda (**108a**) vietā, tika novērota tādu pašu pārgrupēšanās produktu veidošanās. Izmantojot citas acilgrupas (4-Me-benzoil (**113b**), furanoil- (**113e**) u.c.), pāracilētie produkti pat netika novēroti (līdzīgi, kā 2.13. tab. 2. rindā), jo, acīmredzot, acilētais savienojums uzreiz pēc izveidošanās vidē pārgrupējas.

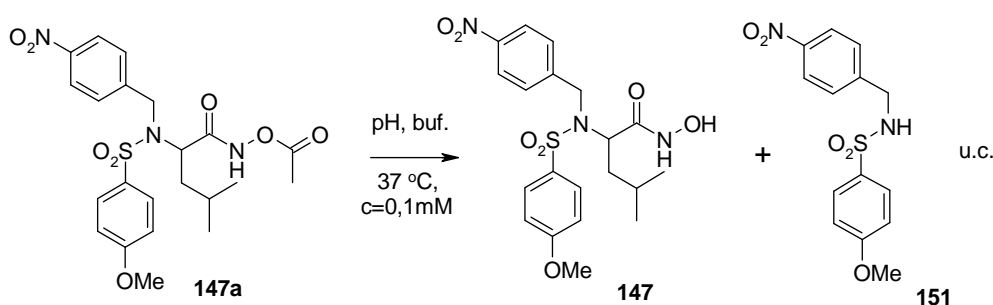
Lai noskaidrotu pārgrupēšanās produkta struktūru, atsevišķi tika sintezēta acilhidroksāmskābe **147a**. Iegūtais savienojums maisīts Tris-Cl buferšķīdumā 3 dienas, tad reakcijas maisījums ekstrahēts un savienojumi atdalīti ar kolonnu hromatogrāfijas palīdzību. Kā galvenais produkts tīrā veidā izolēts sulfonamīds **151**, kura struktūra pierādīta ar ^1H KMR, turklāt LC/MS apstākļos molekulārais jons nav redzams. Tā iznākšanas laiks AEŠH sistēmā ir 13,7 min, kas sakrīt ar iepriekš novēroto.

Sulfonamīda **151** iespējamais veidošanās mehānisms:



Sākumā ar *O*-acetil-*N*-*p*-nitrobenzil-*N*-sulfonil-aminohidroksāmskābi **147a** notiek Losena pārgrupēšanās, pēc dekarboksilēšanās izveidotais diamīns **154** ir nestabils un sadalās, veidojot *N*-*p*-nitrobenzil-*p*-metoksifenilsulfonamīdu (**151**). Otrs produkts imīns **155** ūdens vidē hidrolizējas. Pēc analogijas principa *O*-acetil-*N*-*H*-*N*-sulfonil-aminohidroksāmskābes **144a** un **145a**, pārgrupēšanās rezultātā veido *p*-metoksifenilsulfonamīdu (**156**), kura $t_R=8,4$ min. Pārējie pārgrupēšanās starpprodukti AEŠH sistēmā tiek reģistrēti, bet to daudzums attiecībā pret sulfonamīdiem **151** un **156**, nestabilās struktūras dēļ, ir niecīgs un tos izolēt tīrā veidā neizdevās.

Tika pārbaudīta arī *N*,*O*-diacilhidroksilamīna **147a** pārgrupēšanās dažādos pH (skat. 2.14. tab.):



2.14. tabula

N-*p*-Nitrobenzil-*p*-metoksifenilsulfonamīda (**151**) % saturs reakcijā pēc 1 h, dažādos pH

vides pH	5	6	6,5	7	7,5
151, % pēc 1 h²	10	31	42	39	40

Kā redzams tabulā, tad vides paskābināšana samazina pārgrupēšanās ātrumu, taču pārgrupētā produkta saturs arī pie pH 5 saglabājas augsts (10%). ChC maksimālā aktivitāte ir pH 6,3 – 8,8 (produkta pavadošā informācija), tās aktivitāte pie pH 5 samazinās par 30% [44] Bibliotēkas šādā pH vērtībā vēl būtu iespējams veidot, taču pie zemākiem pH tās aktivitāte strauji sarūk un sāk notikt enzīma destrukcijas procesi.

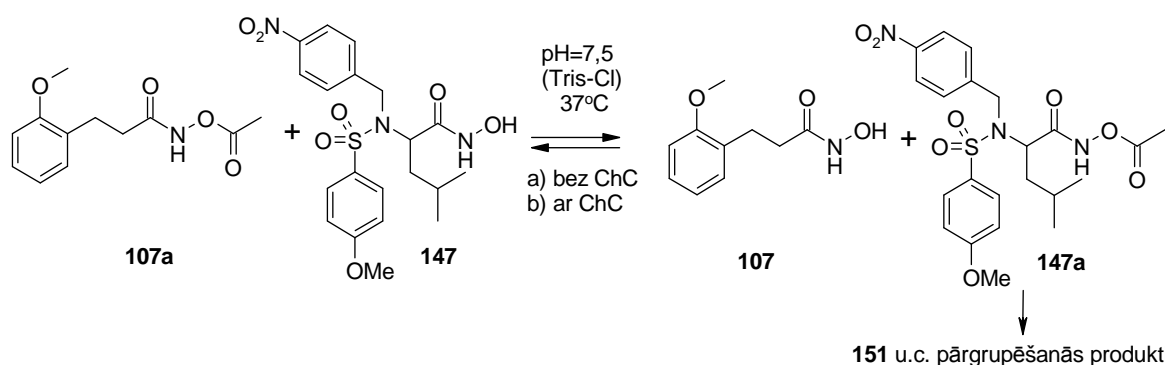
No iegūtajiem rezultātiem par acilētu *N*-sulfonil-aminohidroksāmskābju **144-147** reakcijām ūdens vidē, var secināt, ka, izmantojot šos savienojumus, nav iespējams veikt reakcijas līdzsvara pētījumus, jo substrāti pakļauti pārgrupēšanās reakcijām un līdzsvars tādos gadījumos sistēmā neiestājas. Līdz ar to amplifikācijas metode labākā ChC liganda identificēšanai *N*-sulfonil-aminohidroksāmskābju bibliotēkā nav piemērota, tāpēc turpmāk nolemts izmantot *pseudo*-DKB metodi labāka liganda noteikšanai DKB.

² tā kā reakcijā veidojas daudzi pārgrupēšanās produkti, kuri nav identificēti, tabulā uzskatāmības dēļ attēlots sulfonamīda **151** procentuālais saturs tikai attiecībā pret acilētu hidroksāmskābi **147a** un hidroksāmskābi **147**

2.3.3. Pseudo-DKB izveide ChC ligandu identificēšanai

Kā minēts literatūras apskatā (skat. 1.1.2. nod.) *pseudo*-dinamiskajā kombinatoriālajā ķīmijā (*p*-DKK) papildus lieto kādu neapgriezenisku reakciju, lai sasniegtu augstāku selektivitāti labākā komponenta noskaidrošanā. Ņemot vērā, ka ar acilētām *N*-sulfonil-amino-hidroksāmskābēm ūdens vidē notiek neatgriezeniska reakcija, proti, pārgrupēšanās, tad tika pārbaudīts, vai ir iespējams noteikt labāko ChC ligandu, izmantojot *p*-DKB principus.

N-Sulfonil-aminohidroksāmskābes ar kolagenāzi koordinējas, izmantojot hidroksāmskābes daļu, tātad saistīta hidroksāmskābe nevar acilēties un līdz ar to nevar notikt pārgrupēšanās reakcija. Lai pierādītu izvirzīto hipotēzi, tika izveidotas divas paralēlas divkomponentu bibliotēkas, no kurām viena saturēja ekvimolāru daudzumu enzīma ChC klātienē, izmantojot pēc literatūras [55] zināmo ChC ligandu **147**:



Tā kā reakcijā veidojas vairāki pārgrupēšanās produkti un nav iespējama precīza vielu signālu integrēšana hromatogrammā, tad, lai noteiktu hidroksāmskābes konversiju, tika pievienota standartviela *N,N*-dimetiluracils (**157**) ($t_R=3,8$ min), kas nepiedalās reakcijā un nesadarbojas ar enzīmu. Hromatogrammās tika salīdzināta hidroksāmskābes laukuma attiecība pret standartvielas un hidroksāmskābes laukumu summu atkarībā no reakcijas laika abās paralēlajās bibliotēkās (skat. 2.15. tab.).

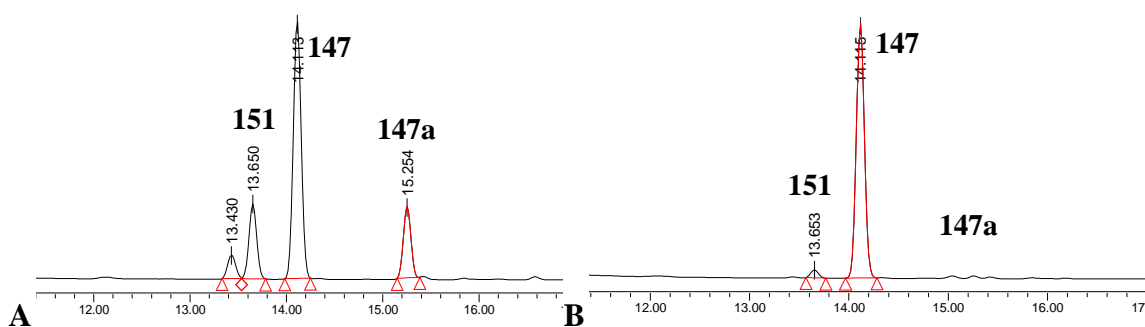
2.15. tabula

Hidroksāmskābes **147** attiecība pret *N,N*-dimetiluracilu (**157**) pāracilēšanās reakcijā

Nr.		$S_{147}/(S_{147}+S_{157})$			
		5 min	1 h	2,5 h	3,5 h
1	Bez ChC	0,64	0,53	0,45	0,39
		0,64	0,63	0,62	0,62
2	Ar ChC	0,64	0,63	0,62	0,62
		0,64	0,63	0,62	0,62

Kā redzams 2.15. tabulā, tad hidroksāmskābes attiecība pret standartvielu reakcijā, kurai pievienots enzīms, mainās ļoti minimāli, salīdzinot ar reakciju, kurā enzīms nav pievienots. Arī pēc hromatogrammām (skat. 2.16. att.) redzams, ka reakcijā ar pievienotu

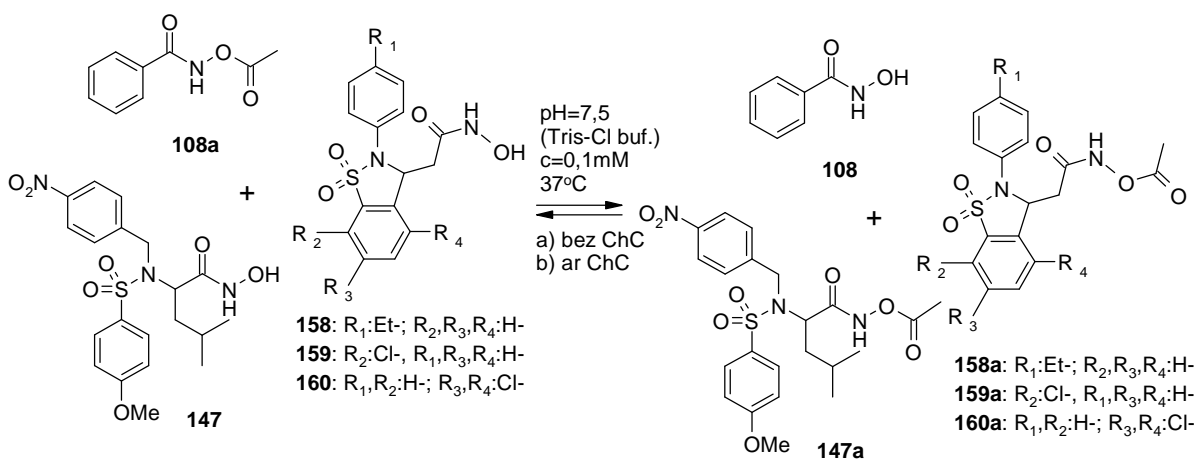
enzīmu, acilētais produkts praktiski neveidojas, bet pārgrupēšanās produktus redz nelielos daudzumos, salīdzinot ar reakciju, kurā enzīms nav pievienots.



2.16. att. AEŠH hromatogrammas: a) pēc 2,5 h reakcijai bez pievienota ChC; b) pēc 3 h reakcijai ar pievienotu ChC

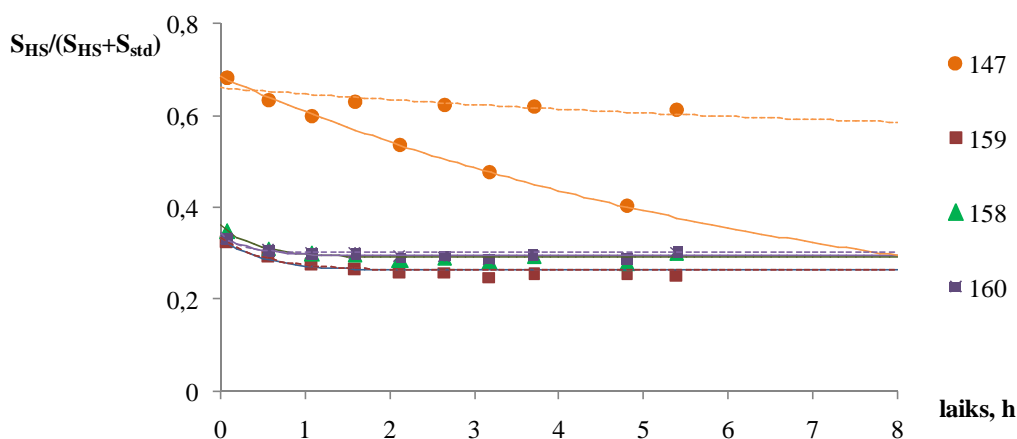
Eksperimenti parāda, ka ar kolagenāzi saistītā hidroksāmskābe acilējas un pārgrupējas lēnāk. Šo īpašību var izmantot *p*-DKB izveidē, proti, veidot bibliotēku enzīma klātbūtnē un noteikt, kura no hidroksāmskābēm acilēsies lēnāk, tātad tā arī būs enzīma labākais ligands.

Lai pārbaudītu, vai šāda pieeja DKB izveidē darbojas, tika izvēlēta viena acilēta hidroksāmskābe **108a**, viena *N*-sulfonil-aminohidroksāmskābe **147** un trīs hidroksāmskābes **158-159**,³ kuras nespēj koordinēties ar enzīmu (laboratorijā pieejamas hidroksāmskābes, kuru t_R , un kuru acilēto atvasinājumu t_R nepārklājas ar ChC, **108**, **108a**, **147**, **147a** un to pārgrupēšanās signāliem). Paralēli izveidotas 2 bibliotēkas ar un bez pievienota enzīma:



Aprēķiniem izmantota standartvielas **157** piedeva un salīdzināta katras hidroksāmskābes laukuma attiecība pret standartvielas un hidroksāmskābes laukuma summu atkarībā no laika (skat. 2.17. att.) abās bibliotēkās.

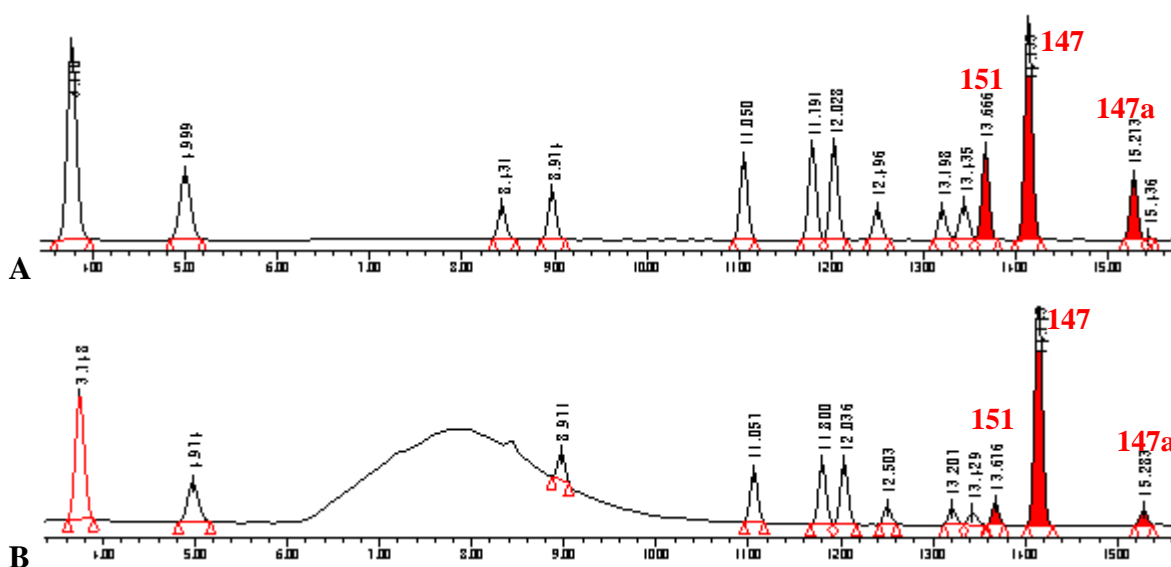
³ N. Usačovas un G. Leita sintezētas vielas, Latvijas Organiskās sintēzes institūts



2.17. att. Kolagenāzes *p*-DKB ar un bez pievienotas ChC (ar raustītu līniju norādīta hidroksāmskābju attiecība pret standartu bibliotēkā ar pievienotu ChC)

Grafikā uzskatāmi redzams, ka *N*-sulfonil-aminohidroksāmskābes **147** attiecība pret standartu abās bibliotēkās atšķiras visvairāk, respektīvi, bibliotēkā, kurā nav pievienots enzīms, tā pāracilējas un pārgrupējas vairāk, nekā bibliotēkā, kurā enzīms ir pievienots. Pārējo hidroksāmskābju attiecības pret standartu ir vienādas abās bibliotēkās.

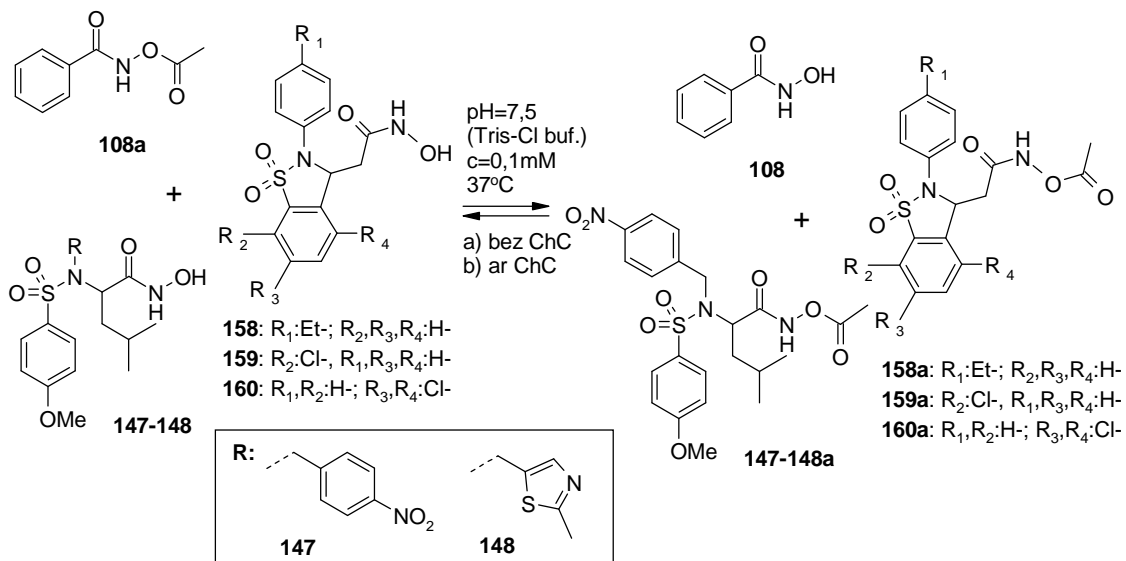
Apskatot arī abu bibliotēku hromatogrammas pēc 3 h (skat. 2.18. att.), redzams, ka bibliotēkā, kurā nav pievienots enzīms, *N*-sulfonil-aminohidroksāmskābes **147** ($t_R=14,1$) pāracilētais produkts **147a** ($t_R=15,2$), kā arī pārgrupētais sulfonamīds **151** ($t_R=13,7$) ir stipri vairāk, nekā bibliotēkā, kurā ir pievienots enzīms. Pārējo bibliotēkas komponentu signāli abās bibliotēkās būtiski neatšķiras.



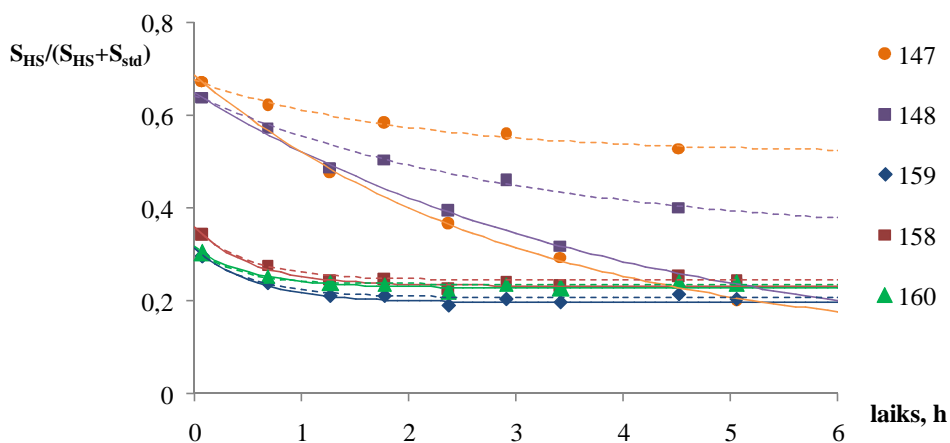
2.18. att. *p*-DKB hromatogrammas pēc 3h: A) bez pievienota ChC, B) ar pievienotu ChC

Iegūtie rezultāti, parāda ka šāda veida *p*-DKB, kurā enzīmu pievieno reakcijas sākumā, ir piemērota metode labākā enzīma liganda identificēšanai bibliotēkā.

Tika izveidota vēl viena līdzīga *p*-DKB, kurā bez jau iepriekšējā bibliotēkā izmantotajiem substrātiem **108a**, **147**, **158-169**, klāt tika pievienota *N*-sulfonil-amino-hidroksāmskābe **148**, kas arī ir potenciāls ChC ligands:



Salīdzinot hidroksāmskābju attiecības pret standartvielu abās bibliotēkās, redzams, ka gan *N*-sulfonil-aminohidroksāmskābei **147**, gan **148** šī attiecība abās bibliotēkās atšķiras vairāk par pārējām bibliotēkā izmantotajām, kuru daudzums abās bibliotēkās laikā mainās līdzīgi (skat. 2.19. att.). Tātad arī jauniegūtā *N*-sulfonil-aminohidroksāmskābe **148** ir ChC ligands.

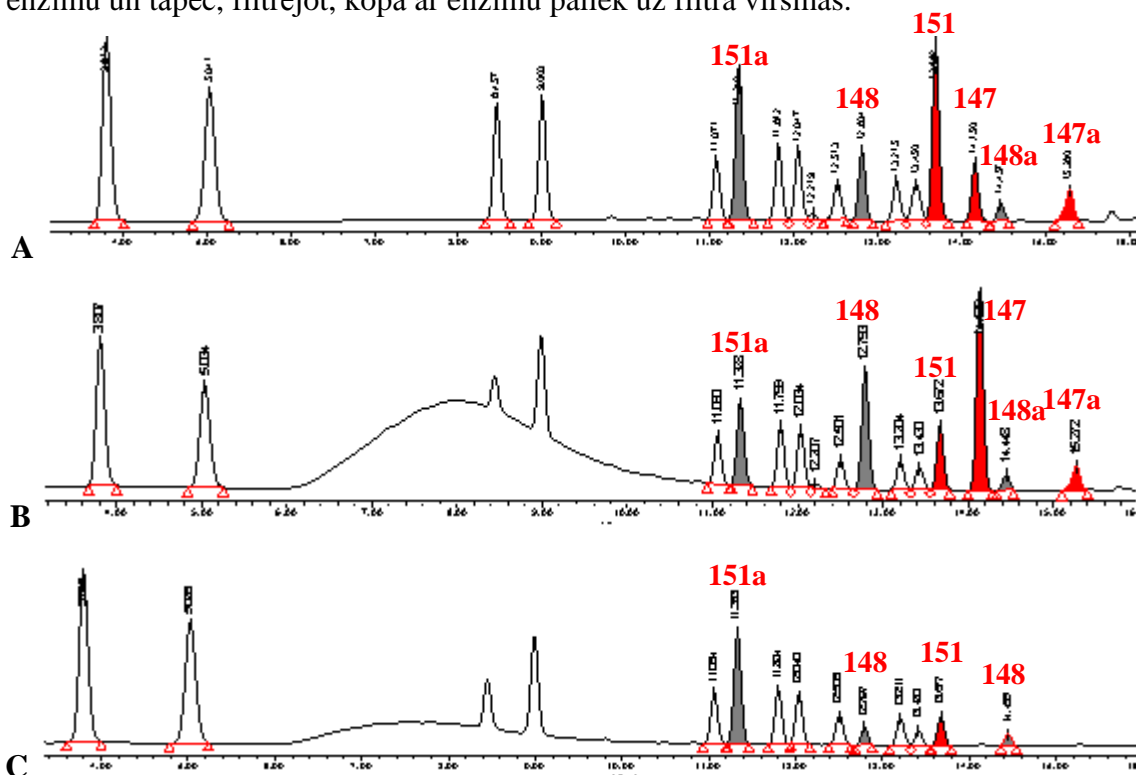


2.19. att. Kolagenāzes *p*-DKB ar un bez pievienotas ChC (ar raustītu līniju norādīta hidroksāmskābju attiecība pret standartu bibliotēkā ar pievienotu ChC)

Apskatot abu bibliotēku hromatogrammas, redzams, ka hidroksāmskābju **147** un **148** pārācilēšanās un pārgrupēšanās produkti (**147a**, **148a**, **151**, **161**) veidojas mazāk enzīma klātienē (skat. 2.20. att. A un B).

Vērā ņemams fakts ir arī tas, ka enzīma saturošo bibliotēku filtrējot caur 10 kDa filtru, un tad filtrātu analizējot ar AEŠH, hromatogrammās vairs nav redzami *N*-sulfonil-amino-

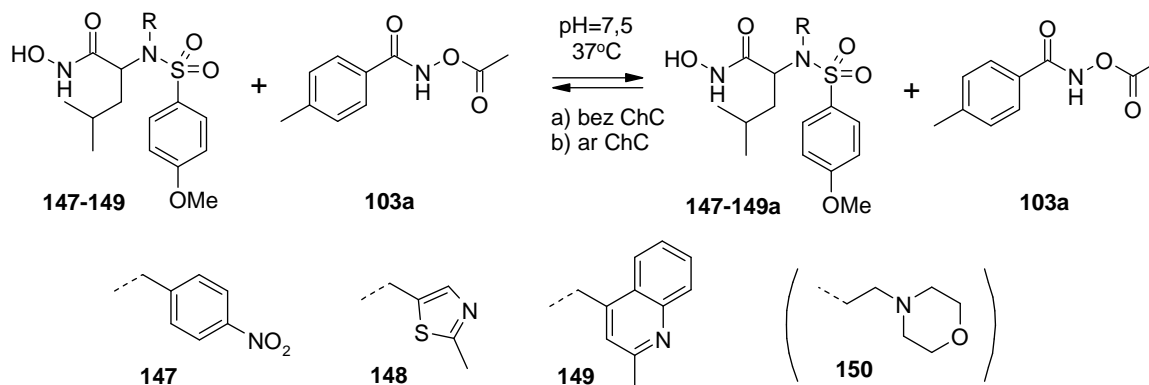
hidroksāmskābju **147** un **148**, to acilēto atvasinājumu **147a** un **148a**, kā arī **147a** pārgrupēšanās produktu – sulfonamīda **151** un **151a** (no **148** veidojies sulfonamīds) signāli (skat. 2.20. att. B un C). Tas būtībā parāda to, ka šie savienojumi ir kaut kādā mērā sasaistīti ar enzīmu un tāpēc, filtrējot, kopā ar enzīmu paliek uz filtra virsmas.



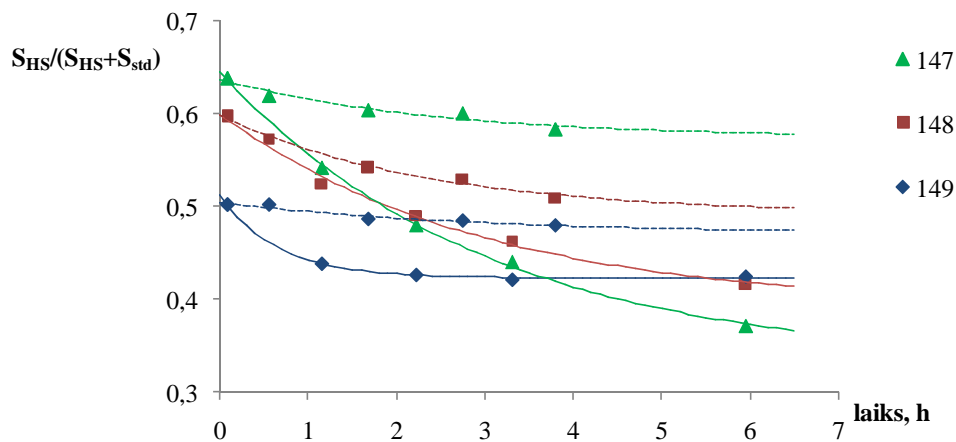
2.20. att. *p*-DKB hromatogrammas pēc 3h: A) bez pievienotas ChC, B) ar pievienotu ChC, C) ar pievienotu ChC filtrēts caur 10kDa enzīmu filtru

Apkopojot no otras *p*-DKB izveides iegūtos datus, var secināt, ka, ja bibliotēkā starp komponentēm ir vairāki enzīma ligandi, tad ir iespējams noteikt arī vairāku ligandu saistīšanos ar enzīmu.

To parāda arī *p*-DKB, kura veidota no acilhidroksāmskābes **103a** un vairākiem līdzīgiem potenciāliem kolagenāzes ligandiem – *N*-sulfonil-aminohidroksāmskābēm **147-149** ar dažādiem aizvietotājiem pie aminogrupas.



Hidroksāmskābju **147-148** attiecība pret standartvielu **157** atkarībā no laika bibliotēkā bez pievienota enzīma salīdzinātas ar hidroksāmskābju attiecību pret standartvielu bibliotēkā ar pievienotu ChC. Iegūtie rezultāti apkopoti grafikā (skat. 2.21. att.)



2.21. att. Kolagenāzes *p*-DKB ar un bez pievienotas ChC (ar raustītu līniju norādīta hidroksāmskābju attiecība pret standartu bibliotēkā ar pievienotu ChC)

Kā redzams 2.19. attēlā, tad visu hidroksāmskābju daudzums laikā atšķiras abās paralēlajās bibliotēkās. Ja maisījumam tika pievienots enzīms, tad visas hidroksāmskābes acilējas lēnāk. Salīdzinot hidroksāmskābju daudzumus savā starpā bibliotēkā, kurā ir pievienots enzīms (grafikā ar pārtrauktu līniju), redzams, ka vislēnāk pārcilējas hidroksāmskābe **149** (ChC), bet **147** (ChC) un **148** (ChC) daudzums laikā ir aptuveni vienāds.

Šī bibliotēka vienlaikus arī parāda, ka starp strukturāli līdzīgām *p*-DKB komponentēm, ir iespējams aptuveni novērtēt vai komponente ir labāks vai sliktāks enzīma ligands. Precīzāku datu iegūšanai šajā gadījumā nepieciešami papildus enzīma-liganda mijiedarbību mērījumi.

3. EKSPERIMENTĀLĀ DAĻA

3.1. Izmantotā aparatūra un reaģenti

Vielu tīrības noteiktas un bibliotēku analīzes veiktas ar AEŠH: Waters 2695 Alliance, kolonna: Apollo-C18 (5 M), 4,6x150 mm, kustīgā fāze: CH₃CN–0,1% H₃PO₄, gradients 5/95%–95/5%, analīzes laiks: 30 min, plūsmas ātrums: 1 mL/min, kolonnas temperatūra: 40 °C, detektors: UV (210 un 254 nm).

¹H KMR spektri uzņemti ar „Varian 200” un „Varian 400”, šķīdinātājos D₂O, CDCl₃ vai DMSO-D₆.

AEŠH/MS analīzes veiktas ar: Waters 2695 Alliance, kolonna Atlantis dC18 (5mkm), 2,1x50 mm, kustīgā fāze: CH₃CN–0,1% HCOOH, gradients 5/95%–95/5%, analīzes laiks 14 min, plūsmas ātrums 0,2 mL/min, kolonnas temperatūra: 30 °C, detektors UV (254 nm), MS Water Detector 2487 (EI).

Bufešķīdumu pH vērtības noteiktas ar pH-metru „Oakton”, mēr diapazons 0 – 14 pH (±0,02).

Kušanas temperatūras noteiktas ar „OptiMelt”, sildīšanas ātrums 4 °C/min.

Reakciju gaitas novērošanai izmantotas plānslāņa hromatogrāfijas plates Kieselgel 60 F₂₅₄ (“Merck”), detektēšanai izmantots UV starojums (viļņa garums 254 nm) vai attīstīšana KMnO₄ šķīdumā.

Šķīdinātāji iegādāti no *Acros Organics*. THF un DCM destilēts uz MBraun-SPS 800, etilacetāts izmantots bez papildus attīrīšanas.

Reaģenti iegādāti no *Acros Organics*, *Alfa Aesar* un *Sigma-Aldrich*.

Ogļskābes anhidrāze iegādāta no *Sigma-Aldrich* „Carbonic Anhydrase, From Bovine Erythrocytes”, 98%, CAS Nr. 9001-03-0.

Kolagenāze no iegādāta no *Sigma-Aldrich* „Collagenase, from *Clostridium histolyticum*”, type I, CAS Nr. 9001-12-1

3.2. Karbonskābju sintēze

Etil-[4-(hlorsulfonil)fenil]acetāts (118)

5,00 g (30,45 mmol) etilfenilacetāta (**117**) izšķīdina 10 mL sausā DCM un šķīdumu atdzesē ūdens-ledus vannā līdz 0 °C temperatūrai. Tad šķīdumam lēnām pilina klāt 10 mL (152,25 mmol) hlorsulfonskābes šķīdumu 10 mL sausā DCM. Pēc pievienošanas reakciju maisa istabas temperatūrā 1 h, tad maisījumu izlej uz 20 mL ledus, ekstrahē ar DCM. Organisko fāzi atdala, mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs b.ū. Na₂SO₄, nfiltrē un

ietvaicē. Iegūto vielu attīra, izmantojot kolonnu hromatogrāfiju (EtOAc/PE=1/4). Iegūst 0,480 g (6%) dzeltenu eļļveidīgu vielu ar AEŠH tīrību 94%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 1,17 (3H, t, *J*=7,0 Hz, CH₃), 3,65 (2H, s, Ar-CH₂), 4,06 (2H, q, *J*=7,0 Hz, CH₂), 7,20 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 7,53 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H). MS (EI) *m/z*, 263 (M+H)⁺.

Etil-[4-(aminosulfonil)fenil]acetāts (119)

(Sulfonamīdu sintēzes apraksts)

10 mL līdz 0 °C atdzesētam 25% NH₄OH šķīdumam lēnām pievieno 0,480 g (1,83 mmol) etil-[4-(hlorsulfonil)fenil]acetātu (**118**), reakcijas maisījumu turpina maisīt istabas temperatūrā 16 h. Tad to vēlreiz atdzesē līdz 0 °C, lēnām pievieno k. HCl līdz skābai videi un ekstrahē ar EtOAc. Organisko fāzi atdala, mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs b.ū. Na₂SO₄, nofiltrē un ietvaicē. Vielu sakristalizē no ētera. Iegūst 0,250 g etil-[4-(aminosulfonil)fenil]acetāta (**119**) un [4-(aminosulfonil)fenil]etiķskābes maisījumu (**116**), kuru neatdala, bet tālāk hidrolizē līdz [4-(aminosulfonil)fenil]etiķskābei (**116**).

[4-(Aminosulfonil)fenil]etiķskābe (116)

(Esteru hidrolīzes apraksts)

0,250 g etil-[4-(aminosulfonil)fenil]acetāta (**119**) un [4-(aminosulfonil)-fenil]etiķskābes maisījumu (**116**) izšķīdina 1 mL MeOH, pievieno 2 mL 2 M NaOH šķīdumu. Maisa istabas temperatūrā 16 h. Tad reakcijas maisījumu paskābina ar 6 M HCl, ekstrahē ar EtOAc. Organisko fāzi atdala, mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs b.ū. Na₂SO₄, nofiltrē un ietvaicē. Vielu sakristalizē no ētera. Iegūst 0,175 g (45% - 2 stadijās) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 3,68 (2H, s, CH₂), 7,31 (2H, s, NH₂), 7,43 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 7,75 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 12,45 (1H, s, COOH). MS (EI) *m/z*, 216 (M+H)⁺. T_k = 144 °C.

3-(Aminosulfonil)benzoscābe (120)

Iegūst pēc *sulfonamīdu sintēzes* apraksta no 0,500 g (2,27 mmol) 3-(hlorsulfonil)benzoscābes (**121**). Vielu sakristalizē no ētera. Iegūst 0,393 g (86%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 7,49 (2H, s, NH₂), 7,72 (1H, t, *J*=7,8 Hz, Ar-H), 8,04 (1H, dq, *J*=1,2, 1,6, 7,8 Hz, Ar-H), 8,14 (1H, dt, *J*=1,2, 7,8 Hz, Ar-H), 8,38 (1H, t, *J*=1,6 Hz, Ar-H), 13,46 (1H, s, OH). MS (EI) *m/z*, 202 (M+H)⁺.

4-(Aminosulfonil)benzoscābe (122)

2,00 g (11,68 mmol) 4-metilbenzilsulfonamīdu (**123**) izšķīdina 40 mL 1 M NaOH ūdens šķīdumā, lēnām pievieno 2,39 g (15,18 mmol) KMnO₄. Maisījumu karsē 40°C 4 h, tad atdzesē, filtrē brūnās nogulsnes. Filtrātam pievieno 6 M HCl šķīdumu līdz skābai videi. Novēro baltu nogulšņu veidošanos. Tās filtrē, žāvē eksikatorā uz P₂O₅. Iegūst 1,93 g (82%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 98%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 7,47 (2H, s, NH₂), 7,91 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 8,11 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 13,4 (1H, s, OH). MS (EI) m/z, 202 (M+H)⁺.

N,N,4-Trimetilbenzilsulfonamīds (126)

2,00 g (10,52 mmol) 4-metilbenzilsulfonilhlorīda (**125**) izšķīdina 20 mL sausā THF, pievieno 1,28 g (15,78 mmol) dimetilamīna hidrohlorīda, dzesējot pilina klāt 4 mL (31,56 mmol) trietilamīna. Maisa istabas temperatūrā 18 h, tad pielej 20 mL ūdens un ekstrahē ar EtOAc. Organisko fāzi atdala un mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs b.ū. Na₂SO₄, nofiltrē un ietvaicē. Iegūst 2,25 g (98%) dzeltenu eļļu ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (200 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,41 (3H, s, Ar-CH₃), 2,57 (6H, s, N-CH₃), 7,45 (2H, d, *J*=8,1 Hz, Ar-H), 7,63 (2H, d, *J*=8,1 Hz, Ar-H). MS (EI) m/z, 200 (M+H)⁺.

4-[(N,N-Dimetil)aminosulfonil]benzoscābe (124)

Iegūst pēc 4-(aminosulfonil)benzoscābes (**122**) sintēzes apraksta, oksidējot 2,25 g (112,95 mmol) *N,N*,4-trimetilbenzilsulfonamīda (**126**). Iegūst 0,316 g baltas kristāliskas vielas, kas sastāv no 4-[(*N,N*-dimetil)aminosulfonil]-benzoscābes (**124**) (70%) un 4-(aminosulfonil)benzoscābes (**122**) (30%) maisījuma, kuras atdala nākamajā stadijā kā *O*-THP-aizsargātas hidroksāmskābes.

MS (EI) m/z, 230 (M+H)⁺ un 202 (M+H)⁺.

Metil-(2*S*)-2-[[4-metoksifenil]sulfonil]amino}-4-metilpentanoāts (142)

(Aminoskābju sulfonilēšanas apraksts)

0,500 g (2,74 mmol) metil-(2*S*)-2-amino-4-metilpentanoāta hidrohlorīdu (**138**) un 0,569 g (2,74 mmol) 4-metoksibenzilsulfonilhlorīdu (**139**) suspendē 15 mL acetona, pievieno 5 mL 2 M K₂CO₃ ūdens šķīdumu, maisa istabas temperatūrā 18 h. Tad reakcijas maisījumu ietvaicē, paskābina ar 1 M HCl līdz neitrālai videi, ekstrahē ar EtOAc. Organisko fāzi atdala un mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs b.ū. Na₂SO₄, nofiltrē un ietvaicē. Iegūto vielu attīra, izmantojot kolonnu hromatogrāfiju (EtOAc/PE=1/2). Iegūst 0,633 g (73%) gaiši dzeltenu kristālisku vielu ar AEŠH tīrību 97%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 0,69 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 0,80 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 1,31–1,43 (2H, m, CH₂), 1,48–1,57 (1H, m, CH), 3,38 (3H, s, COOCH₃),

3,70 (1H, m, ^{*}CH), 3,83 (3H, s, OCH₃), 7,08 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 7,66 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 8,15 (1H, d, *J*=8,2 Hz, NH). MS (EI) *m/z*, 316 (M+H)⁺.

(2S)-2-[(4-Metoksifenil)sulfonil]amino-4-metilpentānskābe (135)

Iegūst pēc *esteru hidrolīzes* apraksta, hidrolizējot 0,260 g (0,82 mmol) metil-(2S)-2-[[4-metoksifenil)sulfonil]amino}-4-metilpentanoātu (**142**). Iegūst 0,238 g (96%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 0,67 (3H, d, *J*=6,6 Hz, CH₃), 0,80 (3H, d, *J*=6,6 Hz, CH₃), 1,33–1,34 (2H, m, CH₂), 1,53–1,60 (1H, m, *J*=6,6 Hz, CH), 3,57 (1H, m, ^{*}CH), 3,82 (3H, s, OCH₃), 7,06 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,67 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,94 (1H, d, *J*=8,6 Hz, NH), 12,50 (1H, s, COOH). MS (EI) *m/z*, 302 (M+H)⁺.

Metil-(2S)-2-[[4-nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-4-metilpentanoāts (142a)

(Aminoskābju alkilēšanas apraksts)

0,370 g (1,17 mmol) metil-(2S)-2-[[4-metoksifenil)sulfonil]amino}-4-metilpentanoāta (**142**) izšķīdina 5 mL DMF, pievieno 0,034 g (2,34 mmol) 60% NaH suspensiju minerālējū. Pēc 10 min reakcijas maisījumam pievieno 0,253 g (1,17 mmol) 4-nitrobenzilbromīda (**143a**) un maisa istabas temperatūrā 18 h. Tad pievieno 15 mL ūdens, ekstrahē ar EtOAc. Organisko fāzi atdala un mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs b.ū. Na₂SO₄, nofiltrē un ietvaicē. Iegūto vielu attīra, izmantojot kolonnu hromatogrāfiju (EtOAc/PE=1/2). Iegūst 0,507 g (96%) dzeltenu eļļu ar AEŠH tīrību 98%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 0,51 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 0,76 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 1,25–1,37 (2H, m, CH₂), 1,39–1,51 (1H, m, CH), 3,30 (3H, s, COOCH₃), 3,63 (1H, m, ^{*}CH) 3,82 (3H, s, OCH₃), 4,61 (2H, dd, *J*=17,6, 70,8 Hz, CH₂), 7,09 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,65 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 7,74 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 8,19 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H). MS (EI) *m/z*, 452 (M+H)⁺.

(2S)-2-[[4-Nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-4-metilpentānskābe (135a)

Iegūst pēc *esteru hidrolīzes* apraksta, hidrolizējot 0,250 g (0,55 mmol) metil-(2S)-2-[[4-nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino}-4-metilpentanoātu (**142a**). Iegūst 0,180 g (74%) gaiši dzeltenu eļļu ar AEŠH tīrību 93%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 0,52 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 0,80 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 1,27–1,48 (3H, m, CH₂, CH), 4,36 (1H, m, ^{*}CH), 3,84 (3H, s, OCH₃), 4,68 (2H, dd, *J*=17,6, 75,1 Hz, CH₂), 7,08 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,70 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 7,76 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 8,21 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 12,80 (1H, s, COOH). MS (EI) *m/z*, 437 (M+H)⁺.

Metil-(2S)-2-[[2-metilhinolīn-4-il)metil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino}-4-metilpentanoāts (142b)

Iegūst pēc *aminoskābju alkilēšanas* sintēzes apraksta, alkilējot 0,250 g (0,79 mmol) metil-(2S)-2-[[4-metoksifenil)sulfonil]amino}-4-metilpentanoāta (**142**) ar 0,181 g (0,793 mmol) 4-(hlormetil)-2-metilhinolīna hidrohlorīdu (**143b**). Iegūst 0,240 g (64%) baltas kristāliskas vielas ar ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 0,53 (3H, d, *J*=5,9 Hz, CH₃), 0,78 (3H, d, *J*=5,9 Hz, CH₃), 1,08–1,15 (1H, m, CH), 1,45–1,51 (2H, m, CH₂), 2,62 (3H, s, Ar-CH₃), 3,35 (3H, s, COOCH₃), 3,87 (3H, s, OCH₃), 4,49 (1H, m, *CH), 5,01 (2H, dd, *J*=18,0, 30,1 Hz, CH₂), 7,15 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,36 (1H, s, Ar-H), 7,60 (1H, t, *J*= 8,2 Hz, Ar-H), 7,73 (1H, t, *J*= 8,2 Hz, Ar-H), 7,83 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 7,95 (1H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 8,07 (1H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H). MS (EI) m/z, 472 (M+H)⁺.

(2S)-2-[[2-Metilhinolīn-4-il)metil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino}-4-metilpentānskābe (135b)

Iegūst pēc *esteru hidrolīzes* apraksta, hidrolizējot 0,240 g (0,51 mmol) metil-(2S)-2-[[2-metilhinolīn-4-il)metil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino}-4-metilpentanoātu (**142b**). Iegūst 0,233 g (92%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 0,66 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 0,81 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 1,16–1,24 (1H, m, CH), 1,50–1,60 (2H, m, CH₂), 2,88 (3H, s, Ar-CH₃), 3,83 (3H, s, OCH₃), 4,39 (1H, m, *CH), 5,24 (2H, s, CH₂), 7,09 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,74 (1H, s, Ar-H), 7,81 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,85 (1H, t, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 8,03 (1H, t, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 8,22 (1H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 8,31 (1H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 12,99 (1H, s, COOH). MS (EI) m/z, 457 (M+H)⁺.

Metil-(2S)-2-[[2-metil-1,3-tiazol-4-il)metil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino}-4-metilpentanoāts (142c)

Iegūst pēc *aminoskābju alkilēšanas* sintēzes apraksta, alkilējot 0,230 g (0,73 mmol) metil-(2S)-2-[[4-metoksifenil)sulfonil]amino}-4-metilpentanoāta (**142**) ar 0,134 g (0,73 mmol) 4-(hlormetil)-2-metil-1,3-tiazola hidrohlorīda (**143c**). Iegūst 0,194 g (62%) dzeltenas eļļas ar AEŠH tīrību 99%.

MS (EI) m/z, 428 (M+H)⁺.

(2S)-2-[[2-Metil-1,3-tiazol-4-il)metil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino}-4-metilpentānskābe (135c)

Iegūst pēc *esteru hidrolīzes* apraksta, hidrolizējot 0,104 g (0,24 mmol) metil-(2S)-2-[[2-metil-1,3-tiazol-4-il)metil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino}-4-metilpentanoātu (**142c**). Iegūst 0,078 g (78%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 0,63 (3H, d, *J*=5,9 Hz, CH₃), 0,73 (3H, d, *J*=5,9 Hz, CH₃), 1,17–1,49 (2H, m, CH₂), 2,12–2,16 (1H, m, CH), 2,60 (3H, s, Ar-CH₃), 3,83 (3H, s, OCH₃), 4,28 (1H, m, *CH), 4,54 (2H, dd, *J*=16,8, 42,4 Hz, CH₂), 7,07 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,33 (1H, s, Ar-CH), 7,75 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 12,2 (1H, s, COOH). MS (EI) m/z, 414 (M+H)⁺.

Metil-(2S)-2-[[N-(2-morfolīn-4-il)etil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-4-metilpentanoāts (142d)

Iegūst pēc *aminoskābju alkilēšanas* sintēzes apraksta, alkilējot 0,250 g (0,79 mmol) metil-(2S)-2-[[N-(2-morfolīn-4-il)etil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-4-metilpentanoātu (**142**) ar 0,146 g (0,793 mmol) 4-(hloretil)morfolīna hidrohlorīdu (**143d**). Iegūst 0,180 g (53%) dzeltenas eļļas ar AEŠH tīrību 96%.

MS (EI) m/z, 430 (M+H)⁺.

(2S)-2-[[N-(2-morfolīn-4-il)etil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-4-metilpentānskābe (135d)

Iegūst pēc *esteru hidrolīzes* apraksta, hidrolizējot 0,180 g (0,42 mmol) metil-(2S)-2-[[N-(2-morfolīn-4-il)etil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-4-metilpentanoātu (**142d**). Iegūst 0,160 g (92%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 0,84 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 0,90 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 1,47–1,53 (2H, m, CH₂), 1,54–1,62 (1H, m, CH), 3,13 (2H, m, CH₂), 3,61 (2H, m, CH₂), 3,7–4,0 (4H, m, CH₂), 3,84 (3H, s, OCH₃), 4,0–4,1 (4H, m, CH₂), 4,25 (1H, m, *CH), 7,10 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,79 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 3,33 (1H, s, COOH). MS (EI) m/z, 414 (M+H)⁺.

Etil-(2S)-2-[[N-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-3-fenilpropanoāts (141)

Iegūst pēc *aminoskābju sulfonilēšanas* apraksta no 0,200 g (0,87 mmol) etil-(2S)-2-amino-3-fenilpropanoāta hidrohlorīda (**137**). Iegūst 0,231 g (73%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 0,94 (3H, t, *J*=7,0 Hz, CH₃), 2,82 (2H, d, *J*=9,0 Hz, CH₂), 3,73 (2H, q, *J*=7,0 Hz, CH₂), 3,08 (3H, s, OCH₃), 3,88 (1H, m, *CH), 6,99 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,10 (2H, m, Ar-H), 7,19–7,23 (3H, m, Ar-H), 7,54 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 8,30 (1H, d, *J*=8,6 Hz, NH). MS (EI) m/z, 365 (M+H)⁺.

(2S)-2-[[N-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-3-fenilpropānskābe (134)

Iegūst pēc *esteru hidrolīzes* apraksta, hidrolizējot 0,050 g (0,013 mmol) etil-(2S)-2-[[N-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-3-fenilpropanoātu (**141**). Iegūst 0,035 g (76%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 97%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,70 (1H, d, *J*=9,0 Hz, CH₂), 2,91 (1H, d, *J*=5,9, CH₂), 3,36 (1H, m, *CH), 3,80 (3H, s, OCH₃), 6,94 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 7,12 (2H, m, Ar-H), 7,21 (3H, m, Ar-H), 7,50 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 8,08 (1H, d, *J*=8,6 Hz, NH), 12,66 (1H, s, COOH). MS (EI) m/z, 336 (M+H)⁺.

Etil-(2S)-2-[[4-nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-3-fenilpropanoāts (141a)

Iegūst pēc *aminoskābju alkilēšanas* sintēzes apraksta, alkilējot 0,180 g (0,50 mmol) etil-(2S)-2-[[4-metoksifenil)sulfonil]amino]-3-fenilpropanoātu (**141**) ar 0,107 g (0,50 mmol) 4-nitrobenzilbromīdu (**143a**). Iegūst 0,190 g (77%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 90%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 0,88 (3H, t, *J*=7,0 Hz, CH₃), 2,74 (1H, d, *J*=7,4 Hz, CH₂), 3,04 (1H, d, *J*=8,2, CH₂), 3,67 (1H, m, *CH), 4,68 (2H, q, *J*=7,0 Hz, CH₂), 3,84 (3H, s, OCH₃), 4,98 (2H, q, *J*=7,0, 14,1 Hz, CH₂), 7,01 (2H, m, Ar-H), 7,05 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,17 (3H, m, Ar-H), 7,46 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 7,69 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H) 8,07 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H). MS (EI) m/z, 501 (M+H)⁺.

(2S)-2-[[4-Nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-3-fenilpropānskābe (134a)

Iegūst pēc *esteru hidrolīzes* apraksta, hidrolizējot 0,190 g (0,38 mmol) etil-(2S)-2-[[4-nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-3-fenilpropanoātu (**141a**). Iegūst 0,177 g (99%) gaiši dzeltenas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 95%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,73 (1H, d, *J*=7,4 Hz, CH₂), 3,10 (1H, d, *J*=7,4 Hz, CH₂), 3,38 (1H, m, *CH), 3,84 (3H, s, OCH₃), 4,65 (2H, q, *J*=7,0, 13,1 Hz, CH₂), 7,02 (2H, m, Ar-H), 7,04 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,20 (3H, m, Ar-H), 7,42 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 7,70 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 8,04 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 12,92 (1H, s, COOH). MS (EI) m/z, 471 (M+H)⁺.

Etil-(2S)-2-[[4-metoksifenil)sulfonil]amino]-3-(4-hidroksifenil)propanoāts (140)

Iegūst pēc *aminoskābju sulfonilēšanas* apraksta no 0,50 g (2,03 mmol) etil-(2S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoāta hidrohlorīda (**136**). Iegūst 0,508 g (56%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 85%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 1,08 (3H, t, *J*=7,0 Hz, CH₃), 2,64 (1H, d, *J*=8,2 Hz, CH₂), 2,74 (1H, d, *J*=7,4 Hz, CH₂), 3,75 (2H, q, *J*=7,0 Hz, CH₂), 4,02 (1H, m, *CH), 3,81 (3H, s, OCH₃), 6,59 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 6,87 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 6,99 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,54 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,72 (1H, d, *J*=9,0 Hz, NH), 9,23 (1H, s, OH). MS (EI) m/z, 380 (M+H)⁺.

(2S)-2-[(4-metoksifenil)sulfonil]amino-3-(4-hidroksifenil)propānskābe (133)

Iegūst pēc *esteru hidrolīzes* apraksta, hidrolizējot 0,508 g (1,34 mmol) etil-(2S)-2-[(4-metoksifenil)sulfonil]amino}-3-(4-hidroksifenil)propanoātu (**140**).

Iegūst 0,164 g (35%) gaiši dzeltenas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 93%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,57 (1H, d, *J*=8,6 Hz, CH₂), 2,77 (1H, d, *J*=5,9 Hz, CH₂), 3,68 (1H, m, *CH), 3,81 (3H, s, OCH₃), 6,58 (2H, d, *J*= 8,6 Hz, Ar-H), 6,88 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 6,94 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 7,49 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 8,00 (1H, d, *J*= 8,6 Hz, NH), 9,19 (1H, s, OH), 12,59 (1H, s, COOH). MS (EI) m/z, 352 (M+H)⁺.

3.3. Hidroksāmskābju sintēze

O-(Tetrahidro-2H-pirān-2-il)hidroksilamīns (98b)

30 g (0,18 mol) 1*H*-izoindola-1,3(2*H*)-diona šķīdumam 210 mL DCM un 240 mL dioksāna pievieno 18,5 mL (0,184 mol) 3,4-dihidro-2*H*-pirāna un 0,6 g (0,35 mmol) *p*-toluolsulfonskābes. Maisa istabas temperatūrā 2h, tad reakcijas maisījumam pievieno 300 mL pies. NaHCO₃ šķīdumu. Organisko fāzi atdala un mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs b.ū. Na₂SO₄, nofiltrē un ietvaicē. Iegūst 43 g (0,18 mol) (95%) 2-(tetrahidro-2*H*-pirān-2-iloksi)-1*H*-izoindola-1,3(2*H*)-dionu, kuru tālāk izšķīdina 90 mL benzola, pievieno 9 mL (0,18 mol) metilhidrazīna, karsē 80 °C temperatūrā 20 min. Tad maisījumu atdzesē ledus vannā, filtrē caur cellītu un ietvaicē.

Iegūto eļļveidīgo vielu attīra, izmantojot vakuumdestilāciju (5 mBa), savāc frakciju, kas virst pie 97 °C. Iegūst 21 g (98%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 98%.

MS (EI) m/z, 118 (M+H)⁺.

3.3.1. Hidroksāmskābju sintēze pēc Metodes A

N-Hidroksi-4-metoksibenzamīds (102)

(Metodes A apraksts)

0,50 g (3,29 mmol) 4-metoksibenzoskābes izšķīdina 5 mL sausa THF argona atmosfērā, pievieno 1,07 g (6,57 mmol) karbonildiimidazola (CDI) (novēro gāzes izdalīšanos), maisa istabas temperatūrā. Pēc 30 minūtēm reakcijas maisījumam pievieno 0,046 g (6,57 mmol) hidroksilamīna hidrohlorīda (**98b**) un turpina maisīt istabas temperatūrā 12 h. Tad pievieno 5% KHSO₄ ūdens šķīdumu, ekstrahē ar EtOAc. Organisko fāzi atdala un mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs b.ū. Na₂SO₄, nofiltrē un ietvaicē. Vielu sakristalizē no ētera. Iegūst 0,052 g (41%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (200 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 3,80 (3H, s, OCH₃), 6,99 (2H, d, *J*=8,9 Hz, Ar-H), 7,73 (2H, d, *J*=8,9 Hz, Ar-H), 8,91 (1H, s, NH), 11,07 (1H, s, OH). MS (EI) m/z, 168 (M+H)⁺. T_k = 157 °C.

N-Hidroksi-4-metilbenzamīds (103)

Sintēze pēc *metodes A* apraksta no 0,50 g (3,67 mmol) 4-metilbenzoscābes. Iegūst 0,099 g (28%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (200 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,32 (1H, s, CH₃), 7,23 (2H, d, *J*=7,9 Hz, Ar-H), 7,63 (2 H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 8,94 (1H, s, NH), 11,11 (1H, s, OH). MS (EI) m/z, 152 (M+H)⁺. T_k = 145 °C.

N-Hidroksi-furān-2-karboksamīds (104)

Sintēze pēc *metodes A* apraksta no 0,50 g (4,46 mmol) furān-2-karbonskābes. Iegūst 0,158 g (28%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (200 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 6,60 (1H, dd, *J*=1,7, 3,4 Hz, CH), 7,04 (1H, d, *J*=2,6 Hz, CH), 7,85–7,72 (1H, m, CH), 9,07 (1H, s, NH), 11,14 (1H, s, OH). MS (EI) m/z, 128 (M+H)⁺. T_k = 121 °C.

N-Hidroksi-piridīn-2-karboksamīds (105)

Sintēze pēc *metodes A* apraksta no 0,50 g (4,06 mmol) piridīn-2-karbonskābes. Iegūst 0,262 g (47%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 98%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 7,59 (1H, ddd, *J*=1,3, 4,7, 7,4 Hz, CH), 7,64 (1H, s, NH), 8,06–7,95 (2H, m, CH), 8,11 (1H, s, OH), 8,65 (1H, s, CH). MS (EI) m/z, 139 (M+H)⁺.

N-Hidroksi-4-ciānobenzamīds (106)

Sintēze pēc *metodes A* apraksta no 0,20 g (1,35 mmol) 4-ciānobenzoscābes. Iegūst 0,057 g (26%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 92%.

¹H KMR (200 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 7,92 (4H, 2d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 9,27 (1H, s, NH), 11,48 (1H, s, OH). MS (EI) m/z, 164 (M+H)⁺. T_k = 132 °C.

N-Hidroksi-3-(2-metoksifenil)propānamīds (107)

Sintēze pēc *metodes A* apraksta no 0,50 g (2,77 mmol) 3-(2-metoksifenil)propānskābes. Iegūst 0,460 g (85%) gaiši rozā kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 97%.

¹H KMR (200 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,20 (2H, t, *J*=7,3 Hz, CH₂), 2,76 (2H, t, *J*=7,3 Hz, CH₂), 3,79 (3H, s, OCH₃), 6,99–6,79 (2H, m, Ar-H), 7,27–7,05 (2H, m, Ar-H), 8,68 (1H, s, NH), 10,35 (1H, s, OH). MS (EI) m/z, 196 (M+H)⁺. T_k = 130 °C.

3.3.2. Hidroksāmskābju sintēze pēc Metodes B

4-(Aminosulfonil)-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)benzamīds (115-THP)

(Metodes B apraksts)

0,403 g (2,00 mmol) 4-(aminosulfonil)benzoscābes (**122**) izšķīdina 5 mL sausā THF argona atmosfērā, pievieno 0,541 g (4,01 mmol) hidroksibenzotriazola (HOBT), 0,662 mL (4,01 mmol) diizopropiletilamīna (DIPEA), 0,471 g (4,01 mmol) *O*-(tetrahidro-2H-pirān-2-il)hidroksilamīna (**98b**), kā pēdējo pievieno 0,768 g (4,01 mmol) *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilkarbodiimīda hidrohlorīda (EDCI), maisa istabas temperatūrā 24 h. Reakcijas maisījumu nedaudz ietvaicē, pievieno ūdeni, ekstrahē ar EtOAc. Organisko fāzi atdala un mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs b.ū. Na₂SO₄, nofiltrē un ietvaicē. Vielu attīra, izmantojot kolonnu hromatogrāfiju (EtOAc/PE=1/1). Iegūst 0,446 g (74%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 98%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 1,55 (3H, m, CH₂), 1,72 (3H, m, CH₂), 3,52–3,55 (1H, m, CH₂) 4,02–4,07 (1H, m, CH₂), 5,02 (1H, m, CH), 7,49 (2H, s, NH₂), 7,91 (4H, m, Ar-H), 11,82 (1H, s, NH). MS (EI) m/z, 301 (M+H)⁺.

4-(Aminosulfonil)-N-hidroksibenzamīds (115)

(THP-aizsarggrupas nošķelšana ar TFA)

0,170 g (0,566 mmol) 4-(aminosulfonil)-*N*-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)benzamīda (**115-THP**) izšķīdina 3 mL sausa DCM, lēni piepilina 3 mL trifluoretiķskābes un maisa istabas temperatūrā 24 h. Reakcijas maisījumu ietvaicē, un vielu sakristalizē no Et₂O un ACN maisījuma (10:1). Iegūst 0,079 mg (65%) brūngani baltas nogulsnes ar AEŠH tīrību 97%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 7,47 (2H, s, NH₂), 7,88 (2H, d, *J*=2,4 Hz, Ar-H), 7,88 (2H, d, *J*=2,4 Hz, Ar-H), 9,2 (1H, s, NH), 11,4 (1H, s, OH). MS (EI) m/z, 217 (M+H)⁺. T_k=152°C.

[(4-Aminosulfonil)fenil]-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)acetamīds (129-THP)

Sintēze pēc *metodes B* apraksta no 0,085 g (0,40 mmol) [4-(aminosulfonil)fenil]etiķskābes (**116**). Iegūst 0,095 g (77%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 96%.

¹H KMR (200 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 1,53 (3H, m, CH₂), 1,71 (3H, m, CH₂), 3,43 (2H, s, Ar-CH₂), 3,49–3,54 (1H, m, CH₂), 3,89–3,96 (1H, m, CH₂), 4,8 (1H, m, CH), 7,31 (2H, s, NH₂), 7,41–7,43 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 7,75 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 11,29 (1H, s, NH). MS (EI) m/z, 315 (M+H)⁺.

[(4-Aminosulfonil)fenil]-N-hidroksiacetamīds (129)

Iegūst pēc *THP-grupas nošķelšanas ar TFA* apraksta no 0,095 g (0,303 mmol) [(4-Aminosulfonil)fenil]-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)acetamīda (**129-THP**). Iegūst 0,051 g (73%) gaiši dzeltenas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 98%. $T_{\text{sad}} = 145\text{ }^{\circ}\text{C}$.

$^1\text{H KMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ , m. d.: 3,37 (2H, s, CH_2), 7,30 (2H, s, NH_2), 7,42 (2H, d, $J=8,2$, Ar-H), 7,75 (2H, d, $J=8,2$, Ar-H), 8,86 (1H, s, NH), 10,69 (2H, s, OH). **MS** (EI) m/z, 231 (M+H) $^+$.

3-(Aminosulfonil)-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)benzamīds (128-THP)

Sintēze pēc *metodes B* apraksta no 0,756 g (3,75 mmol) 3-(aminosulfonil)benzoscābes (**120**). Iegūst 0,964 g (85%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 96%.

$^1\text{H KMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ , m. d.: 1,56 (3H, m, CH_2), 1,73 (3H, m, CH_2), 3,52–3,55 (1H, m, CH_2), 4,02–4,08 (1H, m, CH_2), 5,02 (1H, m, CH), 7,46 (2H, s, NH_2), 7,67 (1H, t, $J=7,8$ Hz, Ar-H), 7,96 (2H, t, $J=7,8$ Hz, Ar-H), 8,23 (1H, t, $J=1,6$ Hz, Ar-H), 11,89 (1H, s, NH). **MS** (EI) m/z, 301 (M+H) $^+$.

3-(Aminosulfonil)-N-hidroksibenzamīds (128)

Iegūst pēc *THP-grupas nošķelšanas ar TFA* apraksta no 0,346 g (1,15 mmol) 3-(aminosulfonil)-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)benzamīda (**128-THP**). Iegūst 0,146 g (59%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

$^1\text{H KMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ , m. d.: 7,45 (2H, s, NH_2), 7,65 (1H, t, $J=7,9$ Hz, Ar-H), 7,94 (2H, t, $J=7,9$ Hz, Ar-H), 8,23 (1H, t, $J=1,6$ Hz, Ar-H), 9,18 (1H, s, NH), 11,44 (1H, s, OH). **MS** (EI) m/z, 217 (M+H) $^+$. $T_{\text{k}}=154^{\circ}\text{C}$

4-[(N,N-Dimetil)aminosulfonil]-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)benzamīds (127-THP)

Sintēze pēc *metodes B* apraksta no 0,316 g (1,37 mmol) 4-[(N,N-dimetil)aminosulfonil]benzoscābes (**124**) (70%) un 4-(aminosulfonil)benzoscābes (**122**) (30%) maisījuma. Iegūto vielu maisījumu atdala ar kolonnu hromatogrāfiju (EtOAc/PE=1/1). Iegūst 0,095 g (30%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

$^1\text{H KMR}$ (400 MHz, DMSO- D_6) δ , m. d.: 1,55 (3H, m, CH_2), 1,73 (3H, m, CH_2), 2,63 (6H, s, N- CH_3), 3,52–3,55 (1H, m, CH_2), 4,08 (1H, m, CH_2), 5,03 (1H, m, CH), 7,85 (2H, d, $J=8,2$ Hz, Ar-H), 8,00 (2H, d, $J=8,2$ Hz, Ar-H), 11,9 (1H, s, NH). **MS** (EI) m/z, 329 (M+H) $^+$.

4-(N,N-Dimetil)aminosulfonil-N-hidroksibenzamīds (127)

Iegūst pēc *THP-grupas nošķelšanas ar TFA* apraksta no 0,095 g (0,289 mmol) 4-[(N,N-dimetil)aminosulfonil]-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)benzamīda (**127-THP**). Iegūst 0,025 g (45%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 98%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,63 (6H, s, N-CH₃), 7,83 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 7,98 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 9,25 (1H, s, NH), 11,46 (1H, s, OH). MS (EI) m/z, 245 (M+H)⁺. T_{sad} = 140 °C.

(2S)-2-[[4-Nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-4-metil-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)pentānamīds (147-THP)

Sintēze pēc *metodes B* apraksta no 0,180 g (0,412 mmol) (2S)-2-[[4-nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-4-metilpentānskābes (**135a**). Iegūst 0,165 g (75%) baltas kristāliskas vielas – diastereomēru maisījumu, kuru neatdala, ar kopējo AEŠH tīrību 99%.

MS (EI) m/z, 536 (M+H)⁺.

(2S)-2-[[4-Nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-N-hidroksi-4-metilpentānamīds (147)

(THP-aizsargrupas nošķelšana ar HCl)

0,165 g (0,31 mmol) (2S)-2-[[4-nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-4-metil-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)pentānamīda (**147-THP**) izšķīdina 2 mL dioksāna, lēnām pievieno 2 mL 6 M HCl. Maisa istabas temperatūrā 12 h. Tad reakcijas maisījumam pievieno pies. NaHCO₃ šķīdumu līdz vāji bāziskai videi, ekstrahē ar EtOAc. Organisko fāzi atdala, mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs b.ū. Na₂SO₄, nofiltrē un ietvaicē. Vielu sakristalizē no Hex:EtOAc (1:1) maisījuma. Iegūst 0,120 g (86%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 0,64 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 0,77 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 1,01–1,08 (1H, m, CH₂), 1,25–1,31 (1H, m, CH), 1,42–1,48 (1H, m, CH₂), 3,84 (3H, s, OCH₃), 4,25 (1H, m, *CH), 4,78 (2H, dd, *J*=17,2, 69,6 Hz, CH₂), 7,07 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,59 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 7,73 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 8,16 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 8,91 (1H, s, NH), 10,95 (1H, s, OH). MS (EI) m/z, 452 (M+H)⁺. T_k = 156 °C.

(2S)-2-[[2-Metilhinolīn-4-il)metil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-4-metil-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)pentānamīds (149-THP)

Sintēze pēc *metodes B* apraksta no 0,214 g (0,47 mmol) (2S)-2-[[2-metilhinolīn-4-il)metil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-4-metilpentān-skābes (**135b**). Iegūst 0,222 g (85%) baltas kristāliskas vielas – diastereomēru maisījumu, kuru neatdala, ar kopējo AEŠH tīrību 99%.

MS (EI) m/z, 557 (M+H)⁺.

(2S)-2-[(2-Metilhinolīn-4-il)metil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino}-N-hidroksi-4-metilpentānamīds (149)

Iegūst pēc *THP-grupas nošķelšanas ar 6 M HCl* apraksta no 0,110 g (0,20 mmol) (2S)-2-[(2-metilhinolīn-4-il)metil-(4-metoksifenil)sulfonil]-amino}-4-metil-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)-pentānamīda (**149-THP**). Iegūst 0,081 g (86%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 0,63 (3H, d, *J*=6,6 Hz, CH₃), 0,75 (3H, d, *J*=6,6 Hz, CH₃), 0,95–1,02 (1H, m, CH₂), 1,30–1,36 (1H, m, CH), 1,50–1,56 (1H, m, CH₂), 2,58 (3H, s, Ar-CH₃), 3,86 (3H, s, OCH₃), 4,33 (1H, m, *CH), 5,17 (2H, dd, *J*=18,3, 167,1 Hz, CH₂), 7,09 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,29 (1H, s, Ar-H), 7,55 (1H, t, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 7,72 (1H, t, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 7,81 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,92 (1H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 8,04 (1H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 8,93 (1H, s, NH), 11,03 (1H, s, OH). MS (EI) *m/z*, 473 (M+H)⁺. T_k = 64 °C.

(2S)-2-[(2-Metil-1,3-tiazol-4-il)metil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino}-4-metil-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)pentānamīds (148-THP)

Sintēze pēc *metodes B* apraksta no 0,078 g (0,20 mmol) (2S)-2-[(2-metil-1,3-tiazol-4-il)metil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino}-4-metilpentānskābes (**135c**). Iegūst 0,092 g (95%) baltas kristāliskas vielas – diastereomēru maisījumu, kuru neatdala, ar kopējo AEŠH tīrību 99%.

MS (EI) *m/z*, 513 (M+H)⁺.

(2S)-2-[(2-Metil-1,3-tiazol-4-il)metil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino}-N-hidroksi-4-metilpentānamīds (148)

Sintēze pēc *THP-grupas nošķelšanas ar 6 M HCl* apraksta no 0,092 g (0,18 mmol) (2S)-2-[(2-metil-1,3-tiazol-4-il)metil-(4-metoksifenil)sulfonil]-amino}-4-metil-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)-pentānamīda (**148-THP**). Iegūst 0,046 g (60%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 0,68 (3H, d, *J*=5,9 Hz, CH₃), 0,73 (3H, d, *J*=5,9 Hz, CH₃), 1,25–1,35 (2H, m, CH₂), 1,53–1,57 (1H, m, *J*=5,9 Hz, CH), 2,57 (3H, s, Ar-CH₃), 3,84 (3H, s, OCH₃), 4,20 (1H, m, *CH), 4,69 (2H, dd, *J*= 16,8, 192,9 Hz, CH₂), 7,03 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,23 (1H, s, Ar-CH), 7,70 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 8,84 (1H, s, NH), 10,90 (1H, s, OH). MS (EI) *m/z*, 428 (M+H)⁺.

(2S)-2-{{2-(Morfolīn-4-il)etil-(4-metoksifenil)sulfonil}amino}-4-metil-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)pentānamīds (150-THP)

Sintēze pēc *metodes B* apraksta no 0,160 g (0,39 mmol) (2S)-2-{{2-(morfolīn-4-il)etil-(4-metoksifenil)sulfonil}amino}-4-metilpentānskābes (**135d**). Iegūst 0,167 g (84%) baltas kristāliskas vielas – diastereomēru maisījumu, kuru neatdala, ar kopējo AEŠH tīrību 99%.

MS (EI) m/z, 515 (M+H)⁺.

(2S)-2-{{2-(Morfolin-4-il)etil-(4-metoksifenil)sulfonil}amino}-N-hidroksi-4-metilpentānamīds (150)

Sintēze pēc *THP-grupas nošķelšanas ar 6 M HCl* apraksta no 0,087 g (0,17 mmol) (2S)-2-{{2-(morfolin-4-il)etil-(4-metoksifenil)sulfonil}amino}-4-metil-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)pentānamīda (**150-THP**). Iegūst 0,056 g (78%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 96%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 0,73 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 0,81 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 1,01–1,14 (1H, m, CH₂), 1,23–1,29 (1H, m, CH₂), 1,50–1,57 (1H, m, CH), 3,18 (2H, t, *J*=11 Hz, CH₂), 3,37 (1H, m, *CH), 3,49 (2H, d, *J*=12 Hz, CH₂), 3,71 (2H, t, *J*=12 Hz, CH₂), 3,86 (3H, s, OCH₃), 3,98 (2H, d, *J*=12 Hz, CH₂), 4,02 (2H, t, *J*=7,4 Hz, CH₂), 4,07 (2H, t, *J*=7,4 Hz, CH₂), 7,13 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,81 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 9,02 (1H, s, NH), 11,04 (1H, s, OH). MS (EI) m/z, 431 (M+H)⁺. T_k = 54 °C.

(2S)-2-{{(4-Metoksifenil)sulfonil}amino}-3-fenil-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)propānamīds (145-THP)

Sintēze pēc *metodes B* apraksta no 0,035 g (0,10 mmol) (2S)-2-{{(4-metoksifenil)sulfonil}amino}-3-fenilpropānskābes (**134**). Iegūst 0,045 g (96%) baltas kristāliskas vielas – diastereomēru maisījumu, kuru neatdala, ar kopējo AEŠH tīrību 99%.

MS (EI) m/z, 435 (M+H)⁺.

(2S)-2-{{(4-Metoksifenil)sulfonil}amino}-3-fenil-N-hidroksi-propānamīds (145)

Iegūst pēc *THP-grupas nošķelšanas ar TFA* apraksta no 0,045 g (0,10 mmol) (2S)-2-{{(4-metoksifenil)sulfonil}amino}-3-fenil-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)-propānamīda (**145-THP**). Iegūst 0,007 g (20%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,56 (1H, d, *J*=9,0 Hz, CH₂), 2,79 (1H, d, *J*=5,9 Hz, CH₂), 3,74 (1H, m, *CH), 3,82 (3H, s, OCH₃), 6,93 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,04 (2H, m, Ar-H), 7,22 (3H, m, Ar-H), 7,51 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 8,00 (1H, d, *J*=8,6 Hz, NH), 8,84 (1H, s, NH), 10,58 (1H, s, OH). MS (EI) m/z, 352 (M+H)⁺.

(2S)-2-[[4-Nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-3-fenil-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)propānamīds (146-THP)

Sintēze pēc *metodes B* apraksta no 0,177 g (0,38 mmol) (2S)-2-[[4-nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-3-fenilpropānskābes (**134a**). Iegūst 0,160 g (75%) bezkrāsainu eļļu – diastereomēru maisījumu ar kopējo AEŠH tīrību 95%.

MS (EI) m/z, 570 (M+H)⁺.

(2S)-2-[[4-Nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-3-fenil -N-hidroksi)propānamīds (146)

Iegūst pēc *THP-grupas nošķelšanas ar TFA* apraksta no 0,160 g (0,28 mmol) (2S)-2-[[4-nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-3-fenil-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)propānamīda (**146-THP**). Iegūst 0,040 g (30%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 3,00 (1H, d, J=9,4, CH₂), 3,34 (1H, m, *CH), 3,84 (3H, s, OCH₃), 4,54 (1H, d, J=9,4, CH₂), 4,82 (2H, dd, J=17,6, 40,0 Hz, CH₂), 7,00 (2H, d, J=8,6, Ar-H), 7,06 (2H, d, J=9,0 Hz, Ar-H), 7,20 (3H, m, Ar-H), 7,48 (2H, d, J=8,6 Hz, Ar-H), 7,73 (2H, d, J=8,6 Hz, Ar-H), 8,07 (2H, d, J=8,6 Hz, Ar-H), 8,86 (1H, s, NH), 10,81 (1H, s, OH). MS (EI) m/z, 486 (M+H)⁺.

(2S)-2-[[4-Metoksifenil)sulfonil]amino]-3-(4-hidroksi)fenil-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)propānamīds (144-THP)

Sintēze pēc *metodes B* apraksta no 0,164 g (0,47 mmol) (2S)-2-[[4-metoksifenil)sulfonil]amino]-3-(4-hidroksi)fenilpropānskābes (**133**).

Iegūst 0,188 g (89%) bezkrāsainu eļļu – diastereomēru maisījumu ar kopējo AEŠH tīrību 98%. MS (EI) m/z, 452 (M+H)⁺.

(2S)-2-[[4-Metoksifenil)sulfonil]amino]-3-(4-hidroksi)fenil-N-hidroksi)propānamīds (144)

Iegūst pēc *THP-grupas nošķelšanas ar TFA* apraksta no 0,188 g (0,48 mmol) (2S)-2-[[4-metoksifenil)sulfonil]amino]-3-(4-hidroksi)fenil-N-(tetrahidro-2H-pirān-2-iloksi)propānamīda (**144-THP**). Iegūst 0,032 mg (21%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 96%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,63 (1H, d, J=8,6 Hz, CH₂), 2,84 (1H, d, J=5,9 Hz, CH₂), 3,93 (1H, m, *CH), 3,84 (3H, s, OCH₃), 6,85 (2H, d, J=8,6 Hz, Ar-H), 6,99 (2H, d, J=8,6 Hz, Ar-H), 7,14 (2H, d, J=8,6 Hz, Ar-H), 7,62 (2H, d, J=9,0 Hz, Ar-H), 8,04 (1H, d, J=8,6 Hz, NH), 9,17 (1H, s, OH), 9,23 (1H, s, NH), 11,0 (1H, s, OH). MS (EI) m/z, 368 (M+H)⁺. T_{sad} = 146 °C.

3.3.3. Hidroksāmskābju sintēze pēc Metodes C

4-Nitro-*N*-(tetrahidro-2*H*-pirān-2-iloksi)benzamīds (109-THP)

(Metodes C apraksts)

0,754 g (6,43 mmol) *O*-(tetrahidro-2*H*-pirān-2-il)hidroksilamīnu (**98b**) izšķīdina sausā DCM argona atmosfērā, pievieno 1,79 mL (12,84 mmol) trietilamīna, reakcijas maisījumu atdzesē līdz 0 °C un lēnām pievieno 0,800 g (4,28 mmol) 4-nitrobenzoilchlorīdu, maisa istabas temperatūrā 24 h. Tad reakcijas maisījumu nedaudz ietvaicē, pievieno ūdeni, ekstrahē ar EtOAc. Organisko fāzi atdala, mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs b.ū. Na₂SO₄, nofiltrē un ietvaicē. Vielu attīra izmantojot kolonnu hromatogrāfiju (EtOAc/PE=1/1) un sakristalizē no ētera. Iegūst 0,300 g (52%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99% .

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 1,55 (3H, m, CH₂), 1,73 (3H, m, CH₂), 3,53–3,56 (1H, m, CH₂), 4,05 (1H, m, CH₂), 5,04 (1H, m, CH), 8,00 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 8,32 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 11,98 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 267 (M+H)⁺.

N-Hidroksi-4-nitrobenzamīds (109)

Iegūst pēc *THP*-grupas nošķelšanas ar 6 M HCl apraksta no 0,300 g (1,13 mmol) 4-nitro-*N*-(tetrahidro-2*H*-pirān-2-iloksi)benzamīda (**109-THP**). Iegūst 0,150 g (73%) pelēcīgas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 7,99 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 8,30 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 9,31 (1H, s, NH), 11,53 (1H, s, OH). MS (EI) *m/z*, 183 (M+H)⁺. T_k=172°C.

N-(Tetrahidro-2*H*-pirān-2-iloksi)benzamīds (108-THP)

Sintēze pēc *metodes C* apraksta no 1 mL (8,50 mmol) benzoilchlorīda. Iegūst 0,683 g baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (200 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 1,32 (3H, m, CH₂), 1,83 (3H, m, CH₂), 3,49–3,59 (1H, m, CH₂), 4,00 (1H, m, CH₂), 5,00 (1H, m, CH), 7,42–7,50 (3H, m, Ar-H), 7,74–7,50 (2H, m, Ar-H), 11,65 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 222 (M+H)⁺.

N-Hidroksibenzamīds (108)

Iegūst pēc *THP*-grupas nošķelšanas ar 6M HCl apraksta no 0,477 mg (2,15 mmol) *N*-(tetrahidro-2*H*-pirān-2-iloksi)benzamīda (**108-THP**). Iegūst 0,174 g (59%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 7,43–7,54 (3H, m, Ar-H), 7,74–7,76 (2H, m, Ar-H), 9,02 (1H, s, NH), 11,2 (1H, s, OH). MS (EI) *m/z*, 138 (M+H)⁺.

3.4. *N,O*-Diacilhidroksilamīnu sintēze

N-{[(2*E*)-3-Fenilprop-2-ēnoil]oksi}acetamīds (113f)

(Acilēšanas Metode A)

0,20 g (2,66 mmol) *N*-hidroxiacetamīdu (113) izšķīdina 5 mL sausa THF, pievieno 1,11 mL (7,99 mmol) trietilamīna un, dzesējot, pievieno (2*E*)-3-fenilprop-2-ēnoilhlorīdu. Maisa istabas temperatūrā 18 h. Reakcijas maisījumam pievieno ūdeni un ekstrahē ar EtOAc. Organisko fāzi atdala, mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs b.ū. Na₂SO₄, nofiltrē un ietvaicē. Vielu attīra izmantojot kolonnu hromatogrāfiju (EtOAc/PE=1:2). Iegūst 0,332 g (61%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 98%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 1,91 (3H, s, CH₃), 6,80 (2H, d, *J*=16,0 Hz, CH=CH), 7,47–7,78 (5H, m, Ar-H), 11,69 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 206 (M+H)⁺. T_k=168°C.

N-[(4-Metilfenil)karboniloksi]acetamīds (113b)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes A* apraksta no 0,20 g (2,66 mmol) *N*-hidroxiacetamīda (113) un 0,323 mL (2,42 mmol) 4-metilbenzoilhlorīda. Iegūst 0,078 g (17%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 1,93 (3H, s, CH₃), 2,41 (3H, s, Ar-CH₃), 7,39 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 7,90 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 11,80 (1H, NH). MS (EI) *m/z*, 194 (M+H)⁺. T_k=114°C.

N-[(Piridīn-3-karbonil)oksi]acetamīds (113c)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes A* apraksta no 0,10 g (1,33 mmol) *N*-hidroxiacetamīda (113) un 0,215 g (1,21 mmol) piridīn-3-karbonilhlorīda. Iegūst 0,231 g (96%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 1,95 (3H, s, CH₃), 7,64 (1H, dd, *J*=4,7, 8,2 Hz, Py-H), 8,37 (1H, dt, *J*=2,0, 7,8 Hz, Py-H), 8,80 (1H, dd, *J*=1,6, 4,7 Hz, Py-H), 9,15 (1H, d, *J*=2,0 Hz, Py-H), 11,98 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 181 (M+H)⁺. T_{sad}= 150 °C.

N-[(2-Fenilacetil)oksi]acetamīds (113d)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes A* apraksta no 0,10 g (1,33 mmol) *N*-hidroxiacetamīda (113) un 0,160 mL (1,21 mmol) fenilacetilhlorīda. Iegūst 0,138 g (54%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 96%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 1,85 (3H, s, CH₃), 3,84 (2H, s, CH₂), 7,28–7,37 (5H, m, Ar-H), 11,63 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 194 (M+H)⁺. T_k=110-116°C

N-[(Furān-2-ilkarbonil)oksi]acetamīds (113e)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes A* apraksta no 0,20 g (2,66 mmol) *N*-hidroksiacetamīda (**113**) un 0,239 mL (2,42 mmol) furān-2-karbonilhlorīda. Iegūst 0,026 g (10%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 97%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 1,93 (3H, s, CH₃), 6,78 (1H, dd, *J*=2,0, 3,5 Hz, Fur-H), 7,52 (1H, d, *J*=3,5 Hz, Fur-H), 8,10 (1H, d, *J*=2,0 Hz, Fur-H), 11,86 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 170 (M+H)⁺. T_k = 92 °C.

4-(Aminosulfonil)-N-[(4-metilfenil)karbonil]oksi}benzamīds (115b)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes A* apraksta no 0,079 g (0,37 mmol) 4-(aminosulfonil)-*N*-hidroksibenzamīda (**115**) un 0,048 mL (0,37 mmol) 4-metilbenzoilhlorīda. Iegūst 0,082 g (67%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,44 (3H, s, Ar-CH₃), 7,44 (2H, d, *J*=8,3 Hz, Ar-H), 8,00–8,04 (6H, m, Ar-H), 12,79 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 335 (M+H)⁺. T_k=185°C.

3-Aminosulfonil-N-[(4-metilfenil)karbonil]oksi}benzamīds (128b)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes A* apraksta no 0,065 g (0,30 mmol) 3-(aminosulfonil)-*N*-hidroksibenzamīda (**128**) un 0,041 mL (0,30 mmol) 4-metilbenzoilhlorīda. Iegūst 0,067 g (68%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,43 (3H, s, Ar-CH₃), 7,43 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 7,47 (1H, t, *J*=7,8 Hz, Ar-H), 7,98 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 8,06 (2H, dd, *J*=2,0, 7,8 Hz, Ar-H), 8,32 (1H, m, Ar-H), 12,86 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 335 (M+H)⁺. T_{sad} = 186 °C.

4-[(*N,N*-dimetil)aminosulfonil]-N-[(4-metilfenil)karbonil]oksi}benzamīds (127b)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes A* apraksta no 0,025 g (0,10 mmol) 4-[(*N,N*-dimetil)aminosulfonil]-*N*-hidroksibenzamīda (**127**) un 0,017 mL (0,10 mmol) 4-metilbenzoilhlorīda. Iegūst 0,043 g (95%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,43 (3H, s, Ar-CH₃), 7,43 (2H, d, *J*=7,8 Hz, Ar-H), 7,92 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 7,98 (2H, d, *J*=7,8 Hz, Ar-H), 8,09 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 12,87 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 363 (M+H)⁺. T_k=148°C.

N-(Acetiloksi)benzamīds (108a)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes A* apraksta no 0,174 g (1,268 mmol) *N*-hidroksibenzamīda (**108**) un 0,108 mL (1,52 mmol) acetilhlorīda. Iegūst 0,083 g (37%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 4,23 (3H, s, CH₃), 7,52–7,82 (5H, m, Ar-H), 12,30 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 180 (M+H)⁺. T_k=128°C

N-[(4-Hlorfenil)karbonil]oksi}acetamīds (113g)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes A* apraksta no 0,050 g (0,67 mmol) *N*-hidroksiacetamīda (**113**) un 0,087 mL (0,67 mmol) 4-hlorbenzoilhlorīda. Iegūst 0,094 g (66%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 1,94 (3H, s, CH₃), 7,66 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 8,01 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 11,92 (1H, NH). MS (EI) *m/z*, 214 (M+H)⁺. T_k = 143 °C.

[(4-Aminosulfonil)fenil]-N-[(4-metilfenil)karbonil]oksi}acetamīds (129b)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes A* apraksta no 0,084 g (0,36 mmol) [(4-aminosulfonil)fenil]-*N*-hidroksiacetamīda (**129**) un 0,047 mL (0,30 mmol) 4-metilbenzoilhlorīda. Iegūst 0,011 g (10%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,40 (3H, s, CH₃), 3,65 (2H, s, CH₂), 7,32 (2H, s, NH₂), 7,39 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 7,50 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 7,78 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 7,90 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 12,23 (1H, NH). MS (EI) *m/z*, 349 (M+H)⁺. T_k = 169 °C.

N-Acetiloksiacetamīds (113a)

(Acilēšanas metode B)

0,30 g (3,99 mmol) *N*-hidroksiacetamīda (**113**) izšķīdina sausā DCM argona atmosfērā, pievieno 1,67 mL (11,99 mmol) trietilamīna, lēnām piepilina klāt 0,490 mL (4,80 mmol) etiķskābes anhidrīda. Maisa istabas temperatūrā 6 h. Tad pievieno 5% KHSO₄ ūdens šķīdumu līdz vāji bāziskai videi, ekstrahē ar EtOAc. Organisko fāzi mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs Na₂SO₄, nfiltrē un ietvaicē. Iegūst 0,093 g (20%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 98%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 1,86 (3H, s, CH₃), 2,14 (3H, s, CH₃), 11,54 (s, 1H).

N-(Acetiloksi)furān-2-karboksamīds (104a)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes B* apraksta no 0,043 g (0,34 mmol) *N*-hidroksi-furān-2-karboksamīda (**104**) un 0,052 mL (0,51 mmol) etiķskābes anhidrīda. Iegūst 0,055 g (97%) gaiši dzeltenas eļļas ar AEŠH tīrību 93%.

¹H KMR (200 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,22 (3H, s, CH₃COO), 6,69 (1H, dd, *J*=1,7, 3,5 Hz, CH), 7,22 (1H, d, *J*=3,0 Hz, CH), 7,94 (1H, s, CH), 12,29 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 170 (M+H)⁺.

N-(Acetiloksi)piridīn-2-karboksamīds (105a)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes B* apraksta no 0,10 g (0,72 mmol) *N*-hidroksi-piridīn-2-karboksamīda (**105**) un 0,089 mL (0,87 mmol) etiķskābes anhidrīda. Iegūst 0,030 g (23%) gaiši brūnas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 97%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,42 (3H, s, CH₃), 7,74 (1H, ddd, *J*=1,4, 4,7, 7,5 Hz, CH), 8,20–8,06 (2H, m, CH), 8,73 (1H, ddd, *J*=1,0, 1,6, 4,7 Hz, CH), 10,64 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 181 (M+H)⁺.

N-Acetiloksi-4-metilbenzamīds (103a)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes B* apraksta no 0,036 g (0,24 mmol) *N*-hidroksi-4-metilbenzamīda (**103**) un 0,037 mL (0,36 mmol) etiķskābes anhidrīda. Iegūst 0,035 g (76%) gaiši rozā kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 97%.

¹H KMR (200 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,23 (3H, s, CH₃COO), 2,38 (3H, s, CH₃), 7,33 (2H, d, *J*=7,9 Hz, Ar-H), 7,72 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 12,22 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 194 (M+H)⁺. T_k = 115 °C.

N-Acetiloksi-4-metoksibenzamīds (102a)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes B* apraksta no 0,052 g (0,31 mmol) *N*-hidroksi-4-metiloksibenzamīda (**102**) un 0,048 mL (0,47 mmol) etiķskābes anhidrīda. Iegūst 0,036 g (56%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (200 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,22 (3H, s, CH₃COO), 3,83 (3H, s, OCH₃), 7,06 (2 H, d, *J*=8,9 Hz, Ar-H), 7,80 (2H, d, *J*=8,9 Hz, Ar-H), 12,13 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 210 (M+H)⁺. T_k = 98 °C.

N-Acetiloksi-4-ciānobenzamīds (106a)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes B* apraksta no 0,037 g (0,23 mmol) *N*-hidroksi-4-ciānobenzamīda (**106**) un 0,035 mL (0,34 mmol) etiķskābes anhidrīda. Iegūst 0,022 g (48%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 97%.

¹H KMR (200 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,25 (3H, s, CH₃COO), 7,99 (4 H, 2d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 12,51 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 205 (M+H)⁺. T_k = 132 °C.

N-Acetiloksi-3-(2-metoksifenil)-propānamīds (107a)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes B* apraksta no 0,051 g (0,26 mmol) *N*-hidroksi-3-(2-metoksifenil)-propānamīda (**107**) un 0,040 mL (0,39 mmol) etiķskābes anhidrīda. Iegūst 0,024 g (41%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 97%.

¹H KMR (200 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 2,13 (3H, s, CH₃COO), 2,41–2,29 (2H, m, CH₂), 2,83–2,71 (2H, m, CH₂), 3,78 (3H, s, OCH₃), 6,97–6,79 (2H, m, Ar-H), 7,16 (2H, m, Ar-H), 11,58 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 238 (M+H)⁺. T_k = 124 °C.

N-Acetiloksi-2-(2-metilfenil)acetamīds (112a)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes B* apraksta no 0,051 g (0,30 mmol) *N*-hidroksi-2-(2-metilfenil)acetamīda⁴ (**112**) un 0,048 mL (0,46 mmol) etiķskābes anhidrīda. Iegūst 0,053 g (83%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%. ¹H KMR (200 MHz, DMSO-D₆) δ, m.

⁴ N. Usačovs sintezēta viela, Latvijas Organiskās sintēzes institūts

d.: 2,13 (3H, s, CH₃COO), 2,26 (3H, s, CH₃), 3,48 (2H, s, CH₂), 7,08–7,22 (4H, m, Ar-H), 11,83 (1H, s, NH). **MS** (EI) m/z, 208 (M+H)⁺. **T_k** = 106 °C.

(2S)-N-Acetiloksi-2-[[4-nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-4-metilpentānamīds (147a)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes B* apraksta no 0,072 g (0,16 mmol) (2S)-2-[[4-nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-N-hidroksi-4-metilpentānamīda (**147**) un 0,030 mL (0,16 mmol) etiķskābes anhidrīda. Iegūst 0,060 g (78%) eļļveidīgu vielu ar AEŠH tīrību 97%.

¹H **KMR** (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 0,63 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 0,78 (3H, d, *J*=6,3 Hz, CH₃), 1,08–1,17 (1H, m, CH₂), 1,35–1,40 (1H, m, CH), 1,44–1,52 (1H, m, CH₂), 2,13 (3H, s, CH₃), 3,84 (3H, s, OCH₃), 4,47 (1H, m, *CH), 4,72 (2H, dd, *J*=17,6, 38,3 Hz, CH₂), 7,06 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 7,60 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 7,74 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 8,14 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 12,29 (1H, s, NH). **MS** (EI) m/z, 495 (M+H)⁺.

N-[[4-(Aminosulfonil)fenil]acetil]oksi-4-metoksibenzamīds (102g)

(Acilēšanas metode C)

0,080 g (0,37 mmol) [4-(aminosulfonil)fenil]etiķskābi (**116**) izšķīdina 5 mL sausā THF argona atmosfērā, pievieno 0,100 g (0,74 mmol) hidroksibenzotriazola (HOBT), 0,123 mL (0,74 mmol) diizopropiletilamīna (DIPEA), 0,062 g (0,37 mmol) N-hidroksi-4-metoksibenzamīda (**102**), kā pēdējo pievieno 0,143 g (0,743 mmol) N-(3-dimetilaminopropil)-N-etilkarbodiimīda hidrohlorīda (EDCI), maisa istabas temperatūrā 24 h. Reakcijas maisījumu nedaudz ietvaicē, pievieno ūdeni, ekstrahē ar EtOAc. Organisko fāzi atdala un mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs b.ū. Na₂SO₄, nofiltrē un ietvaicē. Vielu attīra, izmantojot kolonnu hromatogrāfiju (EtOAc/PE=1/1). Iegūst 0,033 g (24%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 98%.

¹H **KMR** (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 3,82 (3H, s, OCH₃), 4,05 (2H, s, CH₂), 7,04 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,36 (2H, s, NH₂), 7,55 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 7,78 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 7,81 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 12,25 (1H, s, NH). **MS** (EI) m/z, 365 (M+H)⁺. **T_k** = 147 °C.

N-[[4-(Aminosulfonil)fenil]karbonil]oksi-acetamīds (113g)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes C* no 0,050 g (0,25 mmol) 4-(aminosulfonil)benzoksābes (**122**) un 0,030 g (0,25 mmol) N-hidroksiacetamīda (**113**). Iegūst 0,013 g (21%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 97%. ¹H **KMR** (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 1,95 (3H, s, CH₃), 7,62 (2H, s, NH₂), 8,00 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 8,19 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 11,99 (1H, s, NH). **MS** (EI) m/z, 259 (M+H)⁺.

N-[[4-Aminosulfonil]fenil]karbonil}oksi-4-metoksibenzamīds (102h)

Sintēze pēc *acilēšanas metodes* C no 0,050 g (0,25 mmol) 4-(aminosulfonil)benzoscābes (**122**) un 0,042 g (0,25 mmol) *N*-hidroksi-4-metoksibenzamīda (**102**). Iegūst 0,084 g (96%) baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 98%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 3,84 (3H, s, OCH₃), 7,08 (2H, d, *J*=9,0 Hz, Ar-H), 7,63 (2H, s, NH₂), 7,84 (2H, d, *J*=8,2 Hz, Ar-H), 8,02 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 8,25 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 12,55 (1H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 351 (M+H)⁺. T_{sad} = 140 °C.

3.5. *N,O*-Diacilhidroksilamīnu pārgrupēšanās produktu izolēšana

1,3-Bis(4-metoksifenil)urīnviela (132)

0,030 g (0,086 mmol) *N*-{[4-Aminosulfonil]fenil]karbonil}oksi-4-metoksibenzamīda (**102h**) šķīdumu 0,5 mL dimetilsulfoksīdā atšķaida ar 30 mL NaH₂PO₄ buferšķīduma (pH=6,5). Reakciju maisa 37 °C temperatūrā 24 h, ekstrahē ar EtOAc. Organisko fāzi atdala un mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs b.ū. Na₂SO₄, nofiltrē un ietvaicē. Vielu attīra, izmantojot kolonnu hromatogrāfiju (EtOAc/PE=1/1). Iegūst 0,010 g baltas kristāliskas vielas ar AEŠH tīrību 99%.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 3,71 (6H, s, OCH₃), 6,85 (4H, d, *J*=8,9 Hz, Ar-H), 7,33 (4H, d, *J*=8,9 Hz, Ar-H), 8,36 (2H, s, NH). MS (EI) *m/z*, 273 (M+H)⁺.

4-Metoksi-*N*-(4-nitrobenzil)benzsulfonamīds (151)

0,036 g (0,073 mmol) 2-[[4-nitrobenzil-(4-metoksifenil)sulfonil]amino]-*N*-hidroksi-4-metilpentānamīda (**147**) un 0,013 g (0,073 mmol) *N*-hidroksibenzamīda (**108**) šķīdumu 3 mL dimetilsulfoksīda atšķaida ar 20 mL NaH₂PO₄ buferšķīduma (pH=7,5). Reakciju maisa 37 °C temperatūrā trīs dienas, tad ekstrahē ar EtOAc. Organisko fāzi atdala un mazgā ar pies. NaCl ūdens šķīdumu, žāvē virs b.ū. Na₂SO₄, nofiltrē un ietvaicē. Vielu attīra, izmantojot kolonnu hromatogrāfiju (EtOAc/PE=1/2). Iegūst 0,005 g (21%) baltas kristāliskas vielas.

¹H KMR (400 MHz, DMSO-D₆) δ, m. d.: 3,82 (3H, s, OCH₃), 4,10 (2H, *J*=6,4 Hz, CH₂), 7,08 (2H, d, *J*=8,8 Hz, Ar-H), 7,52 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 7,71 (2H, d, *J*=8,8 Hz, Ar-H), 8,14 (2H, d, *J*=8,6 Hz, Ar-H), 8,20 (2H, t, *J*=6,4 Hz, NH).

3.6. Dinamisko kombinatoriālo bibliotēku izveide

Bibliotēkas komponentes

Visas pārācilēšanās reakcijas pētījumiem izmantotās vielas tiek uzglabātas un izmantotas 100 mM standartšķīdumos dimetilsulfoksīdā.

Kā standartviela izmantots *N,N*-dimetiluracils (**157**), to uzglabā un izmanto 100 mM standartšķīduma veidā dimetisulfoksīdā. Reakcijām pievieno ekvimolāru daudzumu.

Buferšķīdumi

- 0,02 M Fosfāta buferšķīdums (NaHPO₄): pH=5,5–7,5
- 0,02 M Ammonija acetāta buferšķīdums (CH₃COONH₄): pH=5,0–6,5
- 0,05 M Tris(hidroksimetil)aminometāna hidrohlorīda buferšķīdums ar 3,6 mM CaCl₂ (Tris-Cl): pH=7,5

Enzīmi

Enzīmus uzglabā ledusskapī (-15 °C), pirms reakcijas iesverot nepieciešamo daudzumu:

- Ogļskābes anhidrāze (M=29kD, 89%): 0,1 mM = 3,2 mg/mL
- Kolagenāze (M=68–125 kD, M_{vid.}=96,5 kD): 0,1 mM = 9,7 mg/mL

Reakcijas pētījumi bez pievienota enzīma:

5 μL katras komponentes standartšķīduma atšķaida ar 1 mL nepieciešamā buferšķīduma, iegūstot katra savienojuma koncentrāciju 0,5 mM. Pēc nepieciešamības līdzīgi pagatavo arī citu koncentrāciju šķīdumus (0,1 mM, 0,2 mM utt.)

Reakcijas veic AEŠH viālā, maisa istabas temperatūrā vai termostatā (37 °C). Bez papildus apstrādes noteiktā laikā veic AEŠH analīzes.

Reakcijas ar pievienotu enzīmu līdzsvarā esošai bibliotēkai:

Bibliotēku pagatavo pēc augstāk minēta apraksta, uzreiz pēc pagatavošanas sadala 2 daļās, iegūstot 2 paralēlas bibliotēkas. Ar AEŠH nosaka līdzsvara iestāšanos, tad vienai pievieno ekvimolāru enzīma daudzumu.

Reakcijas ar pievienotu enzīmu reakcijas sākumā:

(*Pseido*-dinamiskās kombinatoriālās bibliotēkas izveide, hidrolīze enzīma klātienē)

Bibliotēku pagatavo pēc augstāk minētā apraksta. Pēc pagatavošanas šķīdumu sadala 2 vienādās daļās un vienai daļai uzreiz pievieno nepieciešamo enzīma daudzumu, tādējādi iegūstot 2 paralēlas bibliotēkas. *p*DKB tiek pievienots ekvimolārs enzīma daudzums, hidrolīzes pētījumos – 10 mol%.

Ogļskābes anhidrāzes aktivitātes pētījumi ar *p*-nitrofenilacetāta hidrolīzes reakciju

0,01 mM ogļskābes anhidrāzes šķīdumam NaHPO₄ buferšķīdumā (pH 6,5), pievieno 5 μL substrāta standartšķīduma. Pēc 5 min pievieno 5 μL *p*-nitrofenilacetāta 100 mM standartšķīduma. Reakciju maisa 37 °C temperatūrā. Reakcijas gaitu novēro ar AEŠH.

SECINĀJUMI

1. *N,O*-Diacilhidroksilamīnu pārakilēšanās reakcija ir piemērota reakcija dinamisko kombinatoriālo bibliotēku izveidei, kuru iespējams realizēt gan ūdens, gan neūdens vidē (dihlormetāns, tetrahidrofurāns, toluols, metanols).

2. Augsti efektīvā šķidrums hromatogrāfija ir piemērota metode reakcijas gaitas pētījumiem un bibliotēkas komponentu attiecību sadalījuma noteikšanai, turklāt analīžu veikšanai nav nepieciešama reakcijas apturēšana, jo kustīgā fāze neietekmē reakcijas gaitu.

3. *N,O*-Diacilhidroksilamīnu pārakilēšanās reakcijas līdzsvara iestāšanās laiks ūdens vidē ir atkarīgs no:

- vides pH vērtības: samazinoties pH vērtībai, palielinās pārakilēšanas reakcijas līdzsvara iestāšanās laiks - sasniedzot pH 2, pārakilēšanās netiek novērota;
- hidroksāmskābju nukleofilītātes: elektronakceptori aizvietotāji hidroksāmskābēs palielina līdzsvara iestāšanās laiku;
- *N,O*-diacilhidroksilamīnu hidrolīzes ātruma.

4. Noteiktas struktūras *N,O*-diacilhidroksilamīnu (acilētu *N*-sulfonilamīnohidroksāmskābju) novērotā relatīvi ātrā Losena pārgrupēšanās ierobežo bibliotēkas komponentu izvēli dinamiskās kombinatoriālās bibliotēkas izveidošanai.

5. Izmantojot amplifikācijas metodi, nav iespējams noteikt ogļskābes anhidrāzes ligandus bibliotēkā, kas veidota no *N*-aciloksi-aminosulfonilbenzamīdiem, jo notiek enzīma katalizēta ligandu hidrolīze, kas ir ātrāka par pārakilēšanos.

6. Ogļskābes anhidrāze katalizē tikai noteiktas struktūras *N,O*-diacilhidroksilamīnu hidrolīzi, kas ir tās ligandi. Šo īpašību ir iespējams izmantot CA ligandu identificēšanā strukturāli ierobežotu *N,O*-diacilhidroksilamīnu statistiskajā bibliotēkā.

7. Uz zināmo kolagenāzes ligandu - *N*-sulfonil-aminohidroksāmskābju piemēra parādīts, ka enzīma klātbūtnē to acilēšanas un pārgrupēšanās īpatsvars samazinās.

8. *Pseido*-dinamiskā kombinatoriālā bibliotēka, kurā kolagenāzi pievieno reakcijas sākumā, ir piemērota metode enzīma ligandu identificēšanai strukturāli atšķirīgu hidroksāmskābju bibliotēkā.

IZMANTOTĀ LITERATŪRA

- 1. Corbett P.T., Leclaire J., Vial L., West K.R., Wietor J.L., Sanders J.K.M., Otto S.** Dynamic Combinatorial Chemistry. *Chem. Rev.*, 2006, 106, 3652–3711.
- 2. Otto S., Furlan R.L.E., Sanders J.K.M.** Dynamic combinatorial chemistry. *Comb. Chem. rev. DDT*, 2002, 7, 2, 117–125.
- 3. Ramstrom O., Bunyapaiboonsri T., Lohmann S., Lehn J.M.** Chemical biology of dynamic combinatorial libraries. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2002, 1572, 178–186.
- 4. Lehn J.M.** Dynamic Combinatorial Chemistry and Virtual Combinatorial Libraries. *Chem. Eur. J.*, 1999, 5, 9, 2455–2463.
- 5. Huc I., Nguyen R.** Dynamic Combinatorial Chemistry. *Comb. Chem. & HTS*, 2001, 109–130.
- 6. Codd R.** Traversing the coordination chemistry and chemical biology of hydroxamic acids. *Coordination Chem. Rev.*, 2008, 252, 1387–1408.
- 7. Scolnick L.R., Clements A.M., Liao J., Crenshaw L., Hellberg M., May J., Dean T.R. Christianson D.W.** Novel Binding Model of Hydroxamate Inhibitors to Human Carbonic Anhydrase II. *J. Am. Chem. Soc.*, 1997, 119, 850–851.
- 8. Scozafava A., Supuran C.T.** Carbonic Anhydrase and Matrix Metalloproteinase Inhibitors: Sulfonylated Amino Acid Hydroxamates with MMP Inhibitory Properties Act as Efficient Inhibitors of CA Isozymes I, II and IV, and N-Hydroxysulfonamides Inhibit Both These Zinc Enzymes. *J. Med. Chem.*, 2000, 43, 3677–3687.
- 9. Poulsen S.A.** Direct Screening of a Dynamic Combinatorial Library Using Mass Spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectr.*, 2006, 17, 8, 1074–1080.
- 10. Nasr G., Petit E., Supuran C.T., Winumc J.Y., Barboiu M.** Carbonic Anhydrase II-Induced Selection of Inhibitors from a Dynamic Combinatorial Library of Schiff's Bases. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 2009, 19, 6014–6017.
- 11. Cheeseman J.D., Corbett A.D., Shu R., Croteau J., Gleason J.L., Kazlauskas R.J.** Amplification of Screening Sensitivity through Selective Destruction: Theory and Screening of a Library of Carbonic Anhydrase Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.*, 2002, 124, 5692.
- 12. Poulsen S.A., Bornaghi L.F.** Fragment-based Drug Discovery of Carbonic Anhydrase II Inhibitors by Dynamic Combinatorial Chemistry Utilizing Alkene Cross Metathesis. *Bioorg. & Med. Chem.*, 2006, 14, 3275–3284.

- 13. Atkins P. de Paula J.** *Physical Chemistry for the Life Sciences*, W. H. Freeman Publishers, Oxford University Press, 2005, p. 299.
- 14. Furlan R.L.E., Cousins G.R.L., Sanders J.K.M.** Molecular Amplification in a Dynamic Combinatorial Library Using Non-covalent Interactions. *Chem. Commun.*, 2000, 1761–1762.
- 15. Hochgrtel M., Biesinger R., Kroth H., Piecha D., Hofmann M.W., Krause S., Schaaf O., Nicolau C., Eliseev A.V.** Ketones as Building Blocks for Dynamic Combinatorial Libraries: Highly Active Neuraminidase Inhibitors Generated via Selection Pressure of the Biological Target. *J. Med. Chem.*, 2003, 46, 3, 356–358.
- 16. Valade A., Urban D., Beau J., M.** Two Galactosyltransferases' Selection of Different Binders from the Same Uridine-Based Dynamic Combinatorial Library *J. Comb. Chem.*, 2007, 9, 1, 1–4.
- 17. Luning U.J.** Synthesizing Macrocycles under Thermodynamic Control – Dynamic Combinatorial Libraries and Templates. *Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.* 2004, 49, 81–84.
- 18. Ramstrom O., Lehn J.M.** In situ generation and screening of a dynamic combinatorial carbohydrate library against Concanavalin A. *ChemBioChem*, 2000, 1, 41–48.
- 19. Tsujita S., Tanada M., Kataoka T., Sasaki S.** Equilibrium Shift by Target DNA Substrates for Determination of DNA Binding Ligands. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 2007, 17, 68–72.
- 20. Lienard B.M.R., Huting R., Lassaux P., Galleni M., Frere J.M., Schofield C.J.** Dynamic Combinatorial Mass Spectrometry Leads to Metallo- β -lactamase Inhibitors. *J. Med. Chem.*, 2008, 51, 3, 684–688.
- 21. Shi B., Stevenson R., Campopiano D.J., Greaney M.F.** Discovery of Glutathione S-Transferase Inhibitors Using Dynamic Combinatorial Chemistry. *J. Am. Chem. Soc.*, 2006, 128, 26, 8459–8467.
- 22. Whitney A.M., Ladame S., Balasubramanian S.** Templated Ligand Assembly by Using G-Quadruplex DNA and Dynamic Covalent Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004, 43, 1143–1143.
- 23. Pałka A., Musioł R., Niedbała H., Matlengiewicz M., Sajewicz M., Serafin K., Polański J.** HPLC and ^{13}C NMR for Analysis of Transamidation in a Dynamic Combinatorial Chemistry System. *Acta Chromatographica*, 2006, 17, 314–319.
- 24. Poulsen S.A., Davis R.A., Timothy G.K.** Screening a Natural Product-based Combinatorial Library Using FTICR Mass Spectrometry. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 2006, 14, 510–515.

- 25. Larsson R., Pei Z.C., Ramstrom O. Catalytic Self-Screening of Cholinesterase Substrates from a Dynamic Combinatorial Thioester Library.** *Angew. Chem., Int. Ed.*, 43, 28, 2004, 3716–3718.
- 26. Larsson R., Ramström O.** Dynamic Combinatorial Thioester Libraries for Efficient Catalytic Self-Screening of Hydrolase Substrates. *Eur. J. Org. Chem.* 2006, 285–291.
- 27. Bunyapaiboonsri T., Ramstrom H., Ramstrom O., Haiech J., Lehn J.M.** Generation of bis-Cationic Heterocyclic Inhibitors of Bacillus subtilis HPr Kinase/Phosphatase from Diverse Dynamic Combinatorial Library. *J. Med. Chem.*, 2003, 46, 5803–5811.
- 28. Bunyapaiboonsri T., Ramström O., Lohmann S., Lehn J.M., Peng L., Goeldner M.** Dynamic Deconvolution of a Pre-Equilibrated Dynamic Combinatorial Library of Acetylcholinesterase Inhibitors. *ChemBioChem*, 2001, 2, 438–444.
- 29. Andre S., Pei Z., Siebert H.C., Ramstrom O., Gabius H.J.** Glycosyldisulfides from Dynamic Combinatorial Libraries as O-glycoside Mimetics for Plant and Endogenous Lectins: Their Reactivities in Solid-phase and Cell Assays and Conformational Analysis by Molecular Dynamics Simulations. *Bioorg. & Med. Chem.*, 2006, 14, 6314–6326.
- 30. Xu S., Giuseppone N.** Self-Duplicating Amplification in a Dynamic Combinatorial Library. *J. Am. Chem. Soc.*, 2008, 130, 6, 1826–1827.
- 31. Stadie W.C., O'Brien H.** The Catalysis of the Hydration of Carbon Dioxide and Dehydration of Carbonic Acid by an Enzyme Isolated from Red Blood Cells. *J. Biol. Chem.*, 1933, 103, 521–529.
- 32. Barrese A.A., Genis C., Fisher S.Z., Orwenyo J.N., Kumara M.T., Dutta S.K., Phillips E., Kiddle J.J., Tu C., Silverman D.N., Govindasamy L., Agbadje-McKenna M., McKenna R., Tripp B.C.** Inhibition of Carbonic Anhydrase II by Thioxolone: A Mechanistic and Structural Study. *Biochem.*, 2008, 47, 3174–3184.
- 33. Ahlskog J.K.J.** Molecular Targeting of Carbonic Anhydrase IX Using Human Monoclonal Antibodies and Small Organic Ligands. *PhD Thesis*, Institute of Pharmaceutical Sciences, Eidgenössische Technische Hochschule Zurich, 2009.
- 34. Innocenti A., Vullo D., Scozzafava A., Carsey J.R., Supuran C.T.** Carbonic Anhydrase Inhibitors: Interaction of Isozymes I, II, IV, V, and IX with Carboxylates. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 2005, 15, 573–578.
- 35. Sarraf N.S., Saboury A.A., Ranjbar B., Moosavi-Movahedi A.A.** Structural and Functional Changes of Bovine Carbonic Anhydrase as Consequence of Temperature. *Acta Biochimica Polonica*, 2004, 51, 3, 665–671.

- 36. Puccetti L., Fasolis G., Vullo D., Chohan Z.H., Scozzafava A., Supuran C.T.** Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of Cytosolic/tumor-associated Carbonic Anhydrase Isozymes I, II, IX, and XII with Schiff's Bases Incorporating Chormone and Aromatic Sulfonamide Moieties, and Their Zinc Complexes. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 2005, 15, 3096–3101.
- 37. Pathak Y., Fisher Z., Reutzel R., and Robert McKenna R.** Crystal Structure of Mutant HCAII H64A Complexed with Bicarbonate: Its Implication in Proton Shuttling Mechanism. *Journal of Undergraduate Research*, 2004, 6, 4.
- 38. Liang J.Y., Lipscomb W.N.** Hydration of Carbon Dioxide by Carbonic Anhydrase: Internal Protein Transfer of Zinc⁽²⁺⁾-bound Bicarbonate, *Biochem.*, 1987, 26, 5293–5301
- 39. Domsic J.F., Avvaru B.S., Un Kim C., Gruner S.M., Agbandje-McKenna M., Silverman D.N., McKenna R.** Entrapment of Carbon Dioxide in the Active Site of Carbonic Anhydrase II. *J. Biol. Chem.*, 2008, 283, 45, 30766–30771.
- 40. Innocenti A., Vullo D., Scozzafava A., Supuran C.T.** Carbonic Anhydrase Inhibitors. Inhibition of Isozymes I, II, IV, V, and IX with Anions Isosteric and Isoelectronic with Sulfate, Nitrate, and Carbonate. *Biorg. & Med. Chem. Lett.*, 2005, 15, 567–571.
- 41. Lloyd M.D., Pedrick R.L., Natesh R., Woo L.W.L., Purohit A., Reed M.J. Acharya K.R., Potter B.V.L.** Crystal Structure of Human Carbonic Anhydrase II at 1.95 Å Resolution in Complex with 667-coumate, a Novel Anti-cancer Agent. *Biochem. J.*, 2005, 385, 715–720.
- 42. Garaj V., Puccetti L., Fasolis G., Winum J.Y., Montero J.L., Scozzafava A., Vullo D., Innocenti A., Supuran C.T.** Carbonic Anhydrase Inhibitors: Novel Sulfonamides Incorporating 1,3,5-triazine Moieties as Inhibitors of the Cytosolic and Tumor-associated Carbonic Anhydrase Isozymes I, II, and IX. *Bioorg. & Med. Chem. Lett.*, 2005, 15, 3102–3108.
- 43. Huc I., Lehn J.M.** Virtual Combinatorial Libraries: Dynamic Generation of Molecular and Supramolecular Diversity by Self-assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94, 2106–2110.
- 44. Bond M.D., Van Wart H.E.** Characterization of the Individual Collagenases from *Clostridium histolyticum*. *Biochem.*, 1984, 23, 3085–91.
- 45. Chung L., Dinakarbandian D., Yoshida N., Lauer-Fields J., L. Fields G., B., Visse1 R., Nagase H.** Collagenase Unwinds Triple-helical Collagen Priorto Peptide Bond Hydrolysis. *The EMBO Journal*, 2004, 23, 3020–3030.
- 46. Carimichael D., F., Sommer A., Thompson R., Anderson D.,C., Smith C., G. Welgus H., G., Stricklin G.,P.** Primary Structure and cDNA Cloning of Human Fibroblast Collagenase Inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83, 2407–2411.

- 47. Angleton E., L., Van Wart H., E.** Preparation and Reconstitution with Divalent Metal Ions of Class I and Class II *Clostridium histolyticum* Apocollagenases. *Biochem.*, 1988, 27, 7406–7412.
- 48. McCroskery P., A., Richards J., F., Harris E., D.** Purification and Characterization of a Collagenase Extracted from Rabbit Tumours. *Biochem.*, 1975, 152, 131–142.
- 49. Hook C., W., Brown S., I., Iwanij W., Nakanishi I.** Characterization and Inhibition of Corneal Collagenase. *Invest. Ophthalmol.*, 1971, 10, 7, 496–503.
- 50. Fisher J., F., Mobashery S.** Recent Advances in MMP Inhibitor Design. *Cancer Metastasis Rev.*, 2006, 25, 115–136.
- 51. Fujisawa T., Katakura S., Odake S., Morita Y., Yasuda J., Yasumatsu I., Morikawa T.** Design and Synthesis of Carboxylate Inhibitors for Matrix Metalloproteinases. *Chem. Pharm. Bull.*, 2001, 49, 10, 1272–1279.
- 52. Vanjari H., Pande R.** Hydroxamic Acids: Proton Donor and Acceptor Strength for Use in Drug Design. *J. Pharm. and Biomed. Analysis*, 2003, 33, 783–788.
- 53. Dissanayake D. P., Senthilnithy R.** Thermodynamic Cycle for the Calculation of ab initio pKa Values for Hydroxamic Acids. *J. of Molecular Structure: Theochem*, 2009, 910, 93–98.
- 54. Tavakol H.** Computational Study of Simple and Water-assisted Tautomerism of Hydroxamic Acids. *J. of Molecular Structure: Theochem*, 2009, 916, 172–179.
- 55. Scozzafava A., Supuran C., T.** Protease Inhibitors: Synthesis of *Clostridium Histolyticum* Collagenase Inhibitors Incorporating Sulfonyl-L-alanine Hydroxamate Moieties. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2000, 10, 499–502.
- 56. Innocenti A., Scozzafava A., Parkkila S., Puccetti L., De Simone G., Supuran C.T.** Investigation of Esterase, Phosphatase and Sulfatase Activities of Cytosolic Mammalian Carbonic Anhydrase Isoforms I, II, and XIII with 4-Nitrophenyl Esters as Substrates. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2008, 18, 2267–2271.
- 57. Kataoka H., Horiyama S., Yamaki M., Oku H., Ishiguro K., Katagi T., Takayama M., Semma M., Ito Y.** Anti-inflammatory and Anti-allergic Activities of Hydroxylamine and Related Compounds. *Biol. Pharm. Bull.* 2002, 25, 11, 1436–1441.
- 58. Shin D.S., Kim J., Han DC., Son K.H., Lee C.W., Kim H.M., Hong S.H., Kwon B.M.** Synthesis and Biological Evaluation of Cinnamyl Compounds as Potent Antitumor Agents. *Bioorg. & Medicinal Chem. Lett.*, 2007, 17, 5423–5427.
- 59. Rasiņa D.** *N,O*-Diacilhidroksilamīnu dinamisko kombinatoriālo bibliotēku izveide ūdens vidē, kursa darbs, LU, 2010.

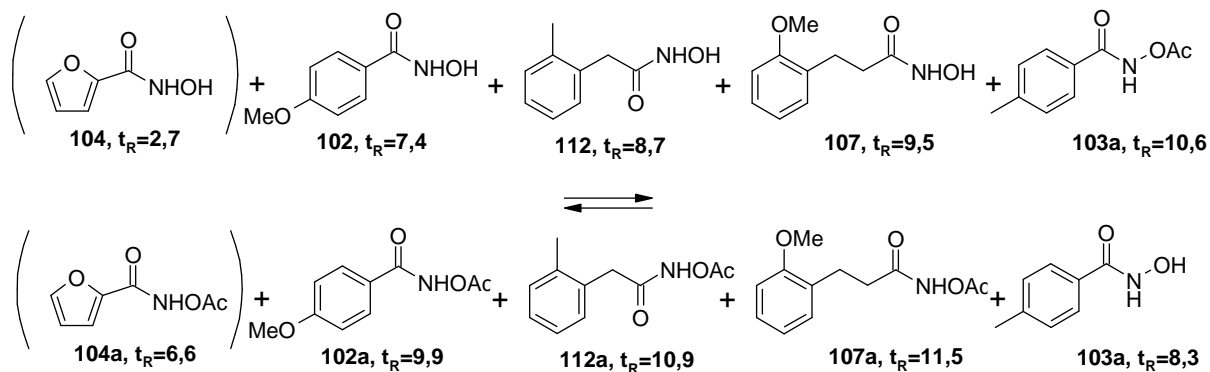
60. Nguyen R., Huc I. Using an Enzyme`s Active Site To Template Inhibitors. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2001, 40, 9, 1774–1776.

61. Rasiņa D. Dinamisko kombinatoriālo bibliotēku izveide ūdens vidē ogļskābes anhidrāzes ligandu identificēšanai, kursa darbs, LU, 2011.

PIELIKUMI

1. pielikums

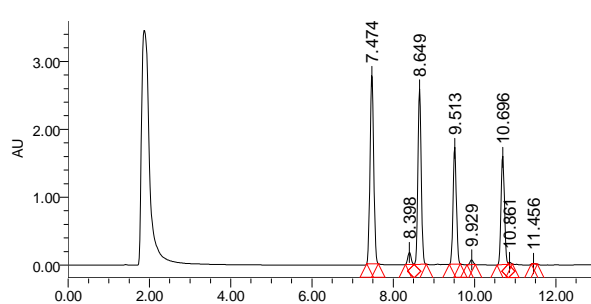
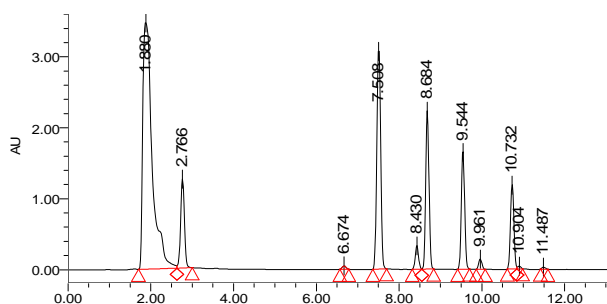
Vairāk-komponentu bibliotēku AESH hromatogrammas: a) pH=7,2, b) pH=6,1
(Reakcijas apstākļi: sākotnējā komponentu koncentrācija 0,5 mg/mL, NaH₂PO₄ buf., ist. temp.)



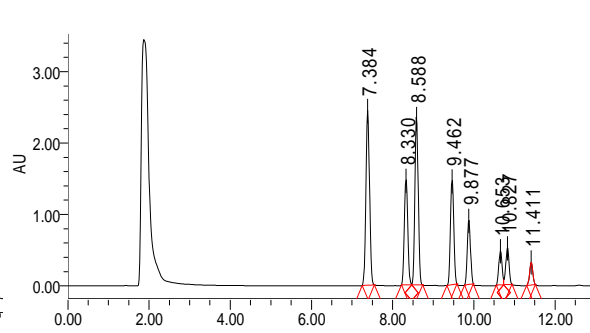
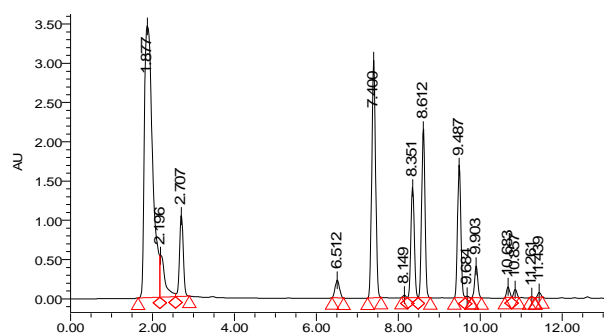
A (pH 7,2)

B (pH 6,1)

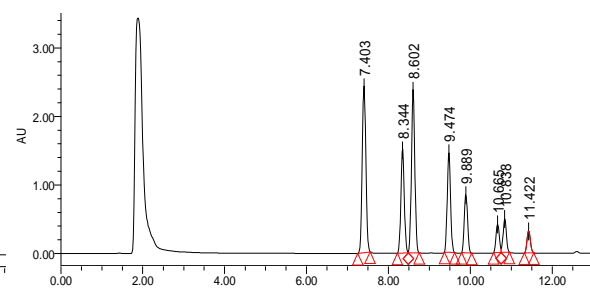
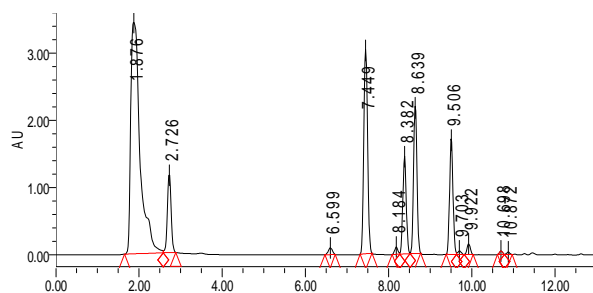
pēc 5 min



pēc 1 h 30 min

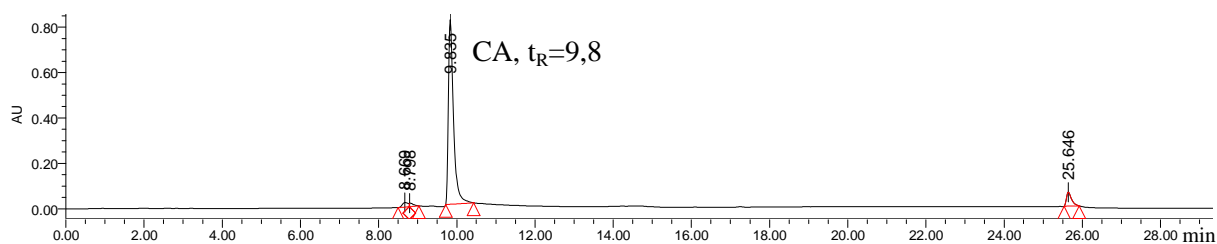


pēc 4 h 45 min

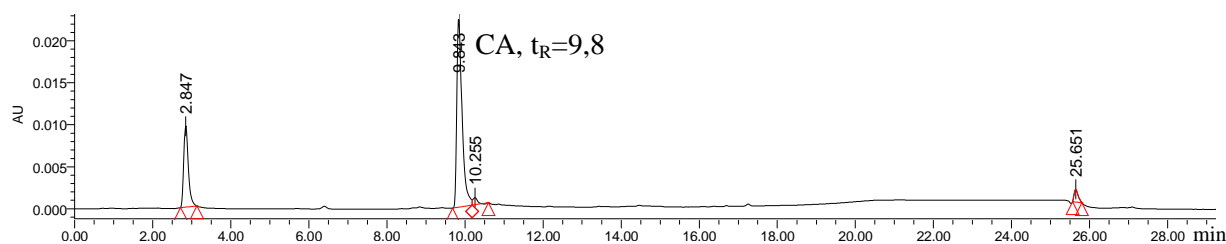


Ogļskābes anhidrāzes (CA) AEŠH hromatogrammas (c=0,5 mg/mL, NaH₂PO₄ buf., pH 6,5)

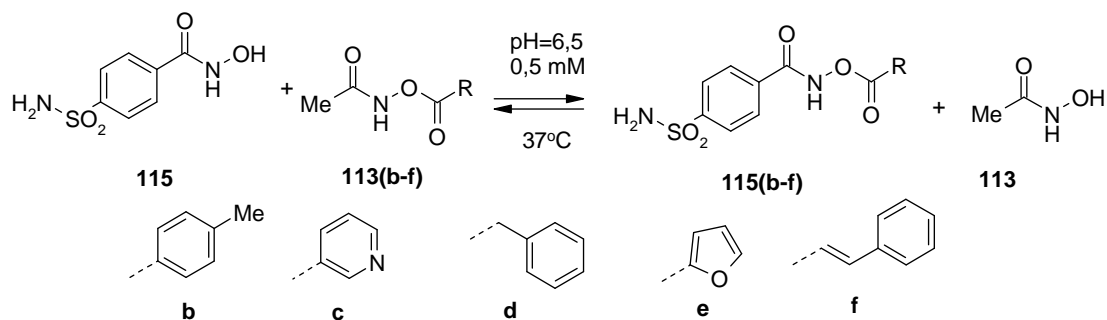
254 nm



210 nm



p-Aminosulfonilbenzohidroksāmskābes 115 acilēto atvasinājumu 115(b-f) divkomponentu sistēmās noteiktie AEŠH iznākšanas laiki

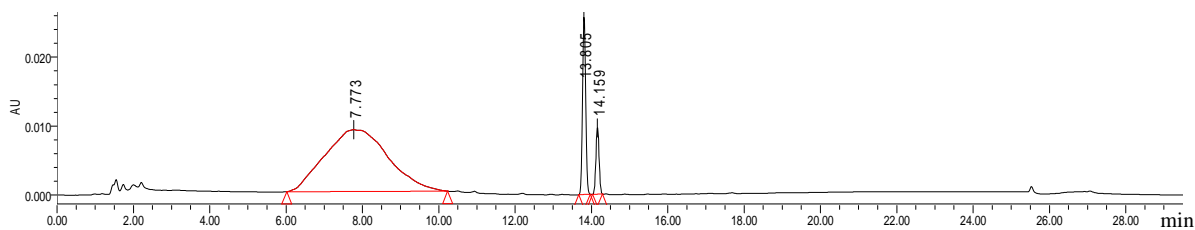


Nr.	<i>N,O</i> -Diacilhidroksilamīna 113(b-f), t _R (min)		<i>N,O</i> -Diacilhidroksilamīna 115(b-f), t _R (min)		Hidrolīzes produkta, ROOH 114(b-f), t _R (min)	
1	113b	10,7	115b	12,1	114b	11,7
2	113c	3,0	115c	8,4	114c	1,7
3	113d	9,9	115d	11,7	114d	10,2
4	113e	5,9	115e	9,8	114e	6,2
5	113f	11,2	115f	12,4	114f	11,8

Kolagenāzes (ChC) AEŠH hromatogrammas (Tris-Cl buf., pH 7,5)

a) Analizēts maisījums, kurā ir 0,1 mM ChC; 0,1 mM hidroksāmskābe **147** ($t_R=14,1$); 0,1 mM *N,O*-diacilhidroksilamīns **127b** ($t_R=13,8$).

254 nm



b) Analizēts maisījums, kurā ir 0,1mM ChC un 0,1 mM *N,O*-diacilhidroksilamīns **103a** ($t_R=10,2$). pirms analīzes 10 min filtrēts caur 10kDa enzīmu filtru

254 nm

