

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA PIŠOT

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA DERIVATOV CIMETNE
KISLINE KOT ZAVIRALCEV ENCIMA MURA S
POTENCIALNIM PROTIBAKTERIJSKIM DELOVANJEM**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI

FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA PIŠOT

**NAČRTOVANJE IN SINTEZA DERIVATOV CIMETNE
KISLINE KOT ZAVIRALCEV ENCIMA MURA S
POTENCIJALNIM PROTIBAKTERIJSKIM DELOVANJEM**

**DESIGN AND SYNTHESIS OF CINNAMIC ACID
DERIVATIVES AS MURA LIGASE INHIBITORS WITH
POTENTIAL ANTIBACTERIAL ACTIVITY**

Master Study of Pharmacy

Ljubljana, 2016

Magistrsko naložko sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sov, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in Inštitutu Jožefa Štefana v Ljubljani. Biokemijska testiranja so bila izvedena na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

ZAHVALA

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm., za strokovno pomoč, pridobljeno znanje in nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Rada bi se zahvalila tudi staršem in sestri, ki so mi tekom študija stali ob strani in me spodbujali. Zahvala gre tudi prijateljem, ki so mi lepšali in z mano uživali študijska leta.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Mateja Sov, mag. farm.

Urška Pišot

Ljubljana, 2016

Predsednik komisije: prof. dr. Stanko Srčič, mag. farm.

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

VSEBINA

1.	UVOD	1
1.1.	CIMETNA KISLINA	1
1.2.	KSANTONI.....	3
1.3.	PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE	3
1.4.	BAKTERIJSKA CELIČNA STENA	4
1.4.1.	GRAM-POZITIVNE BAKTERIJE.....	5
1.4.2.	GRAM-NEGATIVNE BAKTERIJE	6
1.5.	PEPTIDOGLIKAN.....	7
1.5.1.	SINTEZA PEPTIDOGLIKANA	8
1.6.	ENCIMI Mur	11
1.6.1.	ENCIM MurA	12
1.6.2.	ZAVIRALCI MurA.....	13
2.	NAMEN DELA.....	16
3.	MATERIALI IN METODE.....	17
3.1.	MATERIALI	17
3.2.	METODE.....	17
3.2.1.	KROMATOGRAFSKE METODE	17
3.2.2.	SPEKTROSKOPSKE METODE	19
3.2.3.	DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA.....	19
3.2.4.	RISANJE STRUKTUR SPOJIN	19
3.2.5.	BIOKEMIJSKO TESTIRANJE	19
3.2.6.	PROTIBAKTERIJSKO DELOVANJE	21
4.	EKSPERIMENTALNO DELO	22
4.1.	SINTEZA 1,3-DIHIDROKSIKSANTONA (1)	22

4.2. SINTEZA 1-HIDROKSI-9-OKSO-9H-KSANTON-3IL 3-FENILAKRILATA (2)	23
4.3. SINTEZA 4-((4-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)FENOKSI)METIL) BENZOJSKE KISLINE (5).....	25
4.3.1. SINTEZA METIL 4-((4-FORMILFENOKSI)METIL)BENZOATA (3)....	25
4.3.2. SINTEZA 4-((4-FORMILFENOKSI)METIL BENZOJSKE KISLINE (4).	26
4.3.3. SINTEZA 4-((4-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)FENOKSI)METIL) BENZOJSKE KISLINE (5)	27
4.4. SINTEZA 3-((4-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)FENOKSI)METIL) BENZOJSKA KISLINA (8).....	29
4.4.1. SINTEZA METIL 3-((4-FORMILFENOKSI)METIL)BENZOATA (6)....	29
4.4.2. SINTEZA 3-((4-FORMILFENOKSI)METIL BENZOJSKE KISLINE (7).	30
4.4.3. SINTEZA 3-((4-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)FENOKSI)METIL) BENZOJSKE KISLINE (8)	31
4.5. SINTEZA 4-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)BENZOJKSA KISLINE (9).....	32
4.6. SINTEZA 3-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)BENZOJSKE KISLINE (10)	34
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	36
5.1. KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV	36
5.1.1. Sinteza substituiranih derivatov cimetne kisline (Perkinova reakcija)	36
5.1.2. Williamsonova sinteza etrov	38
5.1.3. Sinteza ksantona	38
5.1.4. Sinteza estra s sklopitvenim reagentom	40
5.2. REZULTATI TESTIRANJA.....	41
5.2.1. Komentar testiranja na encimu MurA	42
5.2.2. Komentar protibakterijskega testiranja	44
6. ZAKLJUČEK.....	45
7. LITERATURA.....	46

KAZALO SLIK

Slika 1: Biosinteza cimetne kislina	1
Slika 2: Rožmarinska kislina.....	1
Slika 3: Ester cimetne kislina in 2-ftalimidoetanola	2
Slika 4: Klorogenska kislina	2
Slika 5: Osnovni skelet ksantona	3
Slika 6: Bakterijska celična stena G+ bakterij	5
Slika 7: Bakterijska celična stena G- bakterij	6
Slika 8: Zgradba peptidoglikana	7
Slika 9: Sinteza peptidoglikana.....	10
Slika 10: Sinteza peptidoglikana.....	11
Slika 11: Odprta struktura MurA encima.....	12
Slika 12: Kovalentna vezava fosfomicina na MurA	13
Slika 13: Zaviralcji encima MurA.....	15
Slika 14: Mehанизem Perkinove reakcije.....	37
Slika 15: Mehанизem sinteze ksantona	38
Slika 16: Mehанизem reakcije z BOP reagentom	40

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Rezultati testiranih spojin, podani kot RA in IC ₅₀ vrednosti	42
Preglednica II: Rezultati protibakterijskega testiranja spojin, podani kot MIC vrednosti	44

POVZETEK

Derivati cimetne kisline so poznani kot spojine s širokim spektrom delovanja. Potrjeno imajo antioksidativno, protivirusno, protiglivno in protibakterijsko delovanje. Poleg tega pri določenih derivatih najdemo še anksiolitično delovanje, antihipertenzivni učinek, nekatere pa se omenja tudi kot potencialno učinkovite pri zdravljenju določenih rakavih obolenijih ter Alzheimerjeve bolezni.

V okviru magistrske naloge nas je zanimalo predvsem njihovo protibakterijsko delovanje. V svetu je namreč pojav rezistence na antibiotike vedno pogostejši, zato se teži k odkrivanju novih protibakterijskih učinkovin. Za tarčo delovanja novih derivatov cimetne kisline smo izbrali encim MurA, ki je eden ključnih encimov pri biosintezi peptidoglikana. Njegova naloga je kataliza prenosa enolpiruvata iz fosfoenolpiruvata na UDP-GlcNAc, kar je prvi korak pri biosintezi bakterijske celične stene.

V magistrskem delu smo sintetizirali nove derivate cimetne kisline, izhajali pa smo iz strukture že znanega zaviralca encima MurA. Poleg tega smo sintetizirali tudi estre cimetne kisline s ksantonom, ki ravno tako izkazuje protibakterijsko delovanje. Na koncu smo dobljenim spojinam določili zaviralno delovanje na encimu MurA iz *E. coli* in *S. aureus*, aktivnim spojinam določili IC₅₀ vrednosti, najbolj obetavnim pa še protibakterijsko delovanje.

Za najmočnejši zaviralec MurA se je izkazala 4-((4-(2-karboksi-2-fenilvinil)fenoksi)metil)benzojska kislina (spojina **5**), ki smo ji določili IC₅₀ vrednost 15 µM ter ji potrdili protibakterijsko delovanje. Ostalim spojinam nismo določali IC₅₀ vrednosti, ker so pokazale le šibko jakost zaviranja na encimu MurA (RA > 50 %), zato to ni bilo smiselno. Poleg spojine **5** smo protibakterijsko delovanje potrdili še spojinama **9** in **10**.

Potrdili smo, da lahko derivatom cimetne kisline v njihovo bogato zbirkо bioloških učinkov pripisemo še zaviralno delovanje na encimu MurA in je zato nadaljnji razvoj in izboljšava omenjenih spojin kot novih potencialnih protibakterijskih učinkovin smiselna.

Ključne besede: cimetna kislina, peptidoglikan, encim MurA, protibakterijsko delovanje

ABSTRACT

Cinnamic acid derivatives are known as compounds with broad spectrum of activities. They possess antioxidant, antiviral, antifungal and antibacterial activity. In addition, certain derivatives also demonstrate anxiolytic and antihypertensive effect, while others are mentioned as potentially effective in some types of cancer and Alzheimer's disease.

In our master's thesis we focused on their antibacterial activity. Due to the increased frequency of antibiotic resistance in the world, there is a tendency to discover new antibacterial agents. As a target for new cinnamic acid derivatives, we chose the MurA enzyme which has a key role in peptidoglycan biosynthesis. Its function is to transfer the enolpyruvate from phosphoenolpyruvate to UDP-GlcNAc, which is the first step in the biosynthesis of the bacterial cell wall.

In the master's thesis, we synthesized novel cinnamic acid derivatives, based on the structure of a known MurA enzyme inhibitor. Moreover, we synthesized esters of cinnamic acid with xanthone, which also showed antibacterial activity. In the end, we determined the inhibitory activity of the obtained compounds on the MurA enzyme from *E. coli* and *S. aureus* and IC₅₀ values of the active compounds. Furthermore, for the most potent compounds, we also determined the antibacterial activity.

The most potent MurA inhibitor was 4-((4-(2-carboxy-2-phenylvinyl)phenoxy)methyl)benzoic acid (compound **5**), with the IC₅₀ value of 15 µM and confirmed antibacterial activity. For other compounds we did not determine the IC₅₀ values due to weak inhibitory potency on the MurA enzyme (RA>50%). In addition to compound **5**, we also confirmed the antibacterial activity for compounds **9** and **10**.

We found out that the inhibitory activity of cinnamic acid derivatives on MurA enzyme could be added to their already rich collection of biological effects. Therefore, further development and improvement of these compounds as novel antibacterial agents is important.

Keywords: cinnamic acid, peptidoglycan, MurA enzyme, antibacterial activity

SEZNAM OKRAJŠAV

Asp	Asparginska kislina
ATP	adenozin trifosfat
BOP	benzotriazol-1-il-oksi-tris-(dimetilamino)-fosfonijev heksafluorofosfat
Cys	cistein
DKM	diklorometan
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DPPA	difenilfosforilazid
G-	Gram negativne bakterije
G+	Gram pozitivne bakterije
GlcNAc	N-acetilglukozamin
Hex	heksanol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IC₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
Lys	lizin
MBC	minimalna baktericidna koncentracija
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	masna spektrometrija
PEP	fosfoenolpiruvat
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozaminenolpiruvil transferaza
MurB	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat: L-Ala ligaza
MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat-L-Ala: D-Glu ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat-L-Ala-D-Glu: L-Lys ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat-L-Ala-D-Glu-mezoA ₂ pm: D-Ala-D-Ala ligaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NMR	jedrska magnetna resonanca
RA	rezidualna aktivnost
Rf	retencijski faktor

TLC tankoplastna kromatografija

UDP uridindifosfat

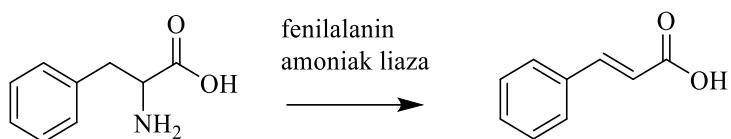
UMP uridinmonofosfat

1. UVOD

1.1. CIMETNA KISLINA

Cimetna kislina se v obliki različnih derivatov, predvsem v obliki estrov, nahaja v celični steni kopenskih rastlin. V obliki proste kisline jo v naravi najdemo malo, ker je ta slabo topna v vodi.

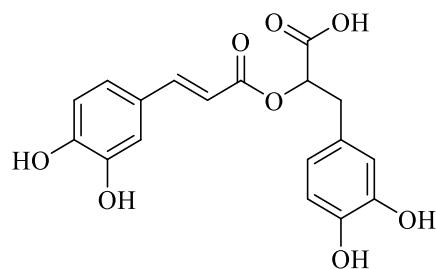
Biosinteza cimetne kisline poteka iz aminokisline fenilalanin. (1, 2)



Slika 1: Biosinteza cimetne kisline (prirejeno po (1))

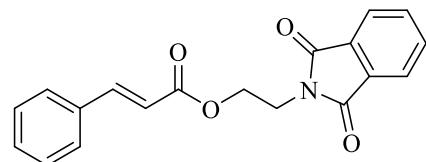
Cimetna kislina in njeni derivati se lahko pohvalijo s širokim spektrom bioloških učinkov, med katerimi najbolj izstopajo antioksidativno, protivirusno, protiglivno in protibakterijsko delovanje. Velja pa omeniti še nekatere pomembne derivate, katerih delovanje sega tudi na druga področja. To so:

- ROŽMARINSKA KISLINA, ki ima preko zaviranja GABA transaminaze potencialen anksiolitični učinek;



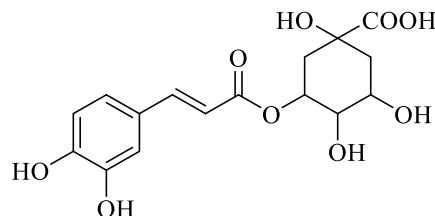
Slika 2: Rožmarinska kislina (prirejeno po (3))

- ESTER CIMETNE KISLINE IN 2-FTALIMIDOETANOLA, ki je kot močan zaviralec encima 17β -hidroksisteroid dehidrogenaze povezan z zdravljenjem raka dojk, Alzheimerjeve bolezni in benigno hiperplazijo prostate;



Slika 3: Ester cimetne kisline in 2-ftalimidoetanola (prirejeno po (3))

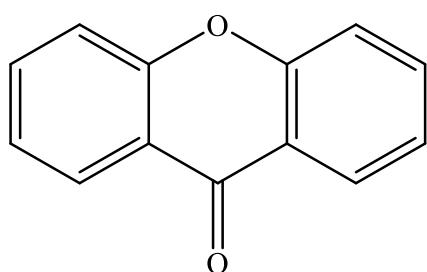
- KLOROGENSKA KISLINA, ki znižuje krvni tlak.



Slika 4: Klorogenska kislina (prirejeno po (3))

1.2. KSANTONI

Ksanton (ksanten-*9H*-on) in njegovi derivati so sekundarni presnovni produkti višjih rastlinskih družin, najdemo jih pa tudi pri glivah, lišajih in praprotih. Zavzemajo triciklično strukturo, z dibenzo gama pironskim skeletom, ki je odgovoren za širok spekter farmakoloških učinkov. Biološka aktivnost derivatov je pogojena z naravo in pozicijo substituentov.



Slika 5: Osnovni skelet ksantona (povzeto po (4))

Tako naravni kot tudi sintetizirani ksantoni imajo dokazano antioksidativno delovanje, protibakterijsko, protiglivno, protirakavo, protivnetno delovanje ter modulirajo presnovo glukoze. (4, 5)

1.3. PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE

Zdravila, ki jih uporabljamo kot protibakterijska, so večinoma razpadni produkti mikrobov ali njihovi sintetični analogi. Njihova značilnost je selektivna toksičnost, kar pomeni, da zavirajo rast bakterij in onemogočajo njihovo preživetje, brez da bi s tem škodovali gostitelju.

Delujejo lahko baktericidno ali bakteriostatično. *Baktericidne* spojine imajo sposobnost ubiti bakterijo, vendar pri zelo visokih koncentracijah, ki večinoma niso varne za uporabnika, zato se raje uporablja *bakteriostatične* doze, ki le zavirajo rast bakterij. (6)

Glede na mesto delovanja razlikujemo več skupin protibakterijskih učinkovin:

- spojine, ki zavirajo sintezo ali delovanje folata: folat, ki je nujno potreben za sintezo predhodnikov DNA in RNA morajo bakterije sintetizirati same, za razliko od sesalcev, ki ga v telo vnesemo s hrano. Tako zaviranje njegove

sinteze povzroča zastoj rasti bakterije. V to skupino zdravil sodijo sulfonamidi in trimetoprim;

- β-laktamski antibiotiki: delujejo tako, da zavirajo sintezo peptidoglikana, ki je glavna sestavina bakterijske celične stene Gram-pozitivnih organizmov. Glavni predstavniki so penicilini, cefalosporini in cefamicini, karbapenami in monobaktami;
- zaviralci sinteze bakterijskih proteinov: posamezne učinkovine vplivajo na različne stopnje sinteze, nimajo enotnega mehanizma. Selektivno delovanje jih omogočajo ribosomi, kjer poteka sinteza proteinov, in so drugače sestavljeni pri prokariontih in evkariontih. Na ta način delujejo: tetraciklini, kloramfenikol, aminoglikozidi, makrolidi, streptogramini, linkozamidi, oksazolidini, fusidna kislina;
- zaviralci topoizomeraze II (DNA giraze): ta encim omogoča transkripcijo in replikacijo DNA. Zaviralci topoizomeraze II so fluorokinoloni;
- ostali: vankomicin, nitrofuran, polimiksin B, metronidazol in drugi.

(7)

1.4. BAKTERIJSKA CELIČNA STENA

Bakterijska celična stena zavzema pol togo obliko in se nahaja zunaj celične membrane.

Njene tri najpomembnejše naloge so:

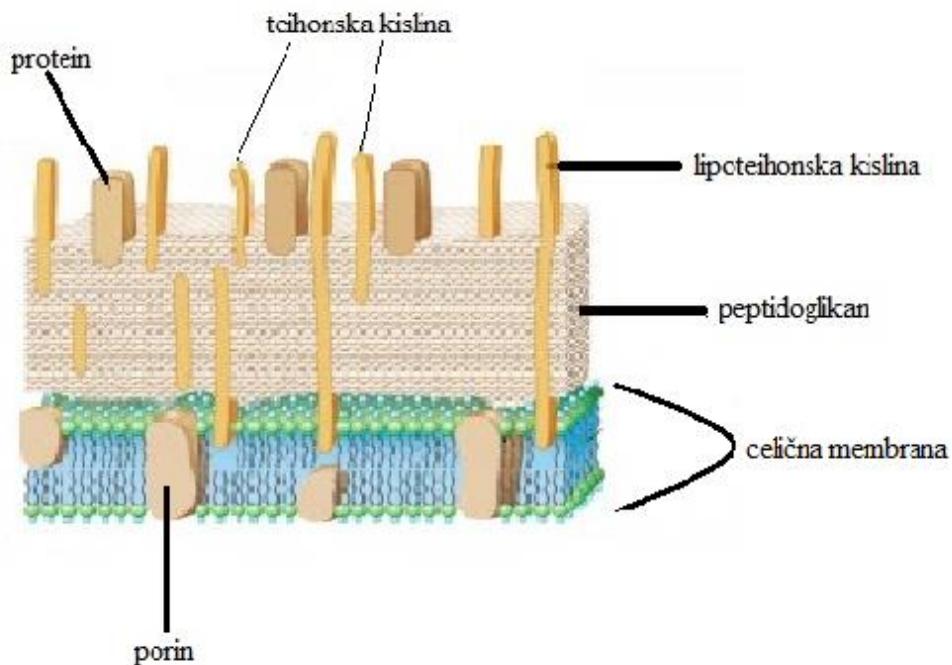
- 1) ohranjanje oblike celice,
- 2) zagotavljanje dovolj močne ovire in s tem preprečevanje, da bi celica pod vplivom osmotskega tlaka počila,
- 3) zagotavljanje polprepustne ovire z okoljem, skozi katero lahko v celico vstopajo le želene snovi.

(6, 8)

Pomembna sestavina celične stene je tako pri Gram-pozitivnih kot tudi pri Gram-negativnih bakterijah peptidoglikan. Različne študije so namreč pokazale, da obstaja povezava med sintezo peptidoglikana ter bakterijsko rastjo in obliko. (9)

1.4.1. GRAM-POZITIVNE BAKTERIJE

Ločbo Gram-pozitivnih (G+) bakterij od Gram-negativnih (G-) nam omogoča metoda barvanja po Gramu. Pri tem se G+ obarvajo vijolično, G- pa rdeče. Do različnega obarvanja pride zaradi razlik v strukturi celične stene. (10)



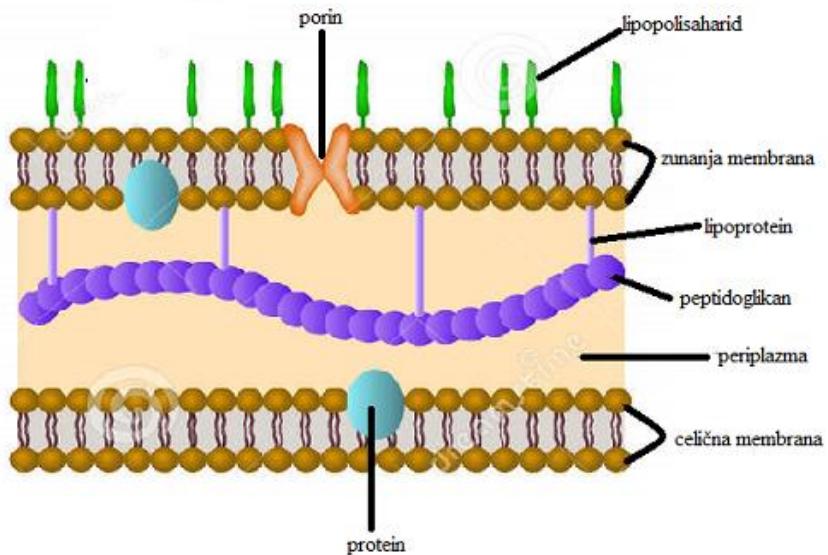
Slika 6: Bakterijska celična stena G+ bakterij (prirejeno po (11))

Bakterijska celična stena G+ bakterij je precej bolj enostavna od G-. Na zunanji strani se nahaja tanka plast proteinov in polisaharidov, ki tvorijo antigensko determinanto, ki se od vrste do vrste razlikuje in omogoča vezavo na tarčne celice. Ta plast predstavlja 5–10 % celične stene. Sledi ji debela, gobasta plast peptidoglikana, ki je glavna sestavina celične stene (~ 50 %). Ta je naprej povezan z teihosko kislino, ki je povezana z lipidi in se zato imenuje tudi lipoteihoska kislina. Kislina ima obliko polimera, dolgega 30 enot in je sestavljena iz glicerola, fosfatov in ribitola (sladkorni alkohol) ter zajema celično steno, membrano in kapsulo bakterij. Natančna vloga teihoske kisline še ni znana, vemo pa, da vključuje vezavna mesta za bakteriofage in najverjetneje služi kot prehod za ione v celico in iz nje. Odgovorna je za negativni naboj celotne površine celice. (6, 8, 10)

1.4.2. GRAM-NEGATIVNE BAKTERIJE

Bakterijska celična stena G- bakterij je tanjša, vendar veliko bolj kompleksna kot pri G+ organizmih. Komponente celične stene si gledano od celične membrane navzven sledijo v naslednjem vrstnem redu:

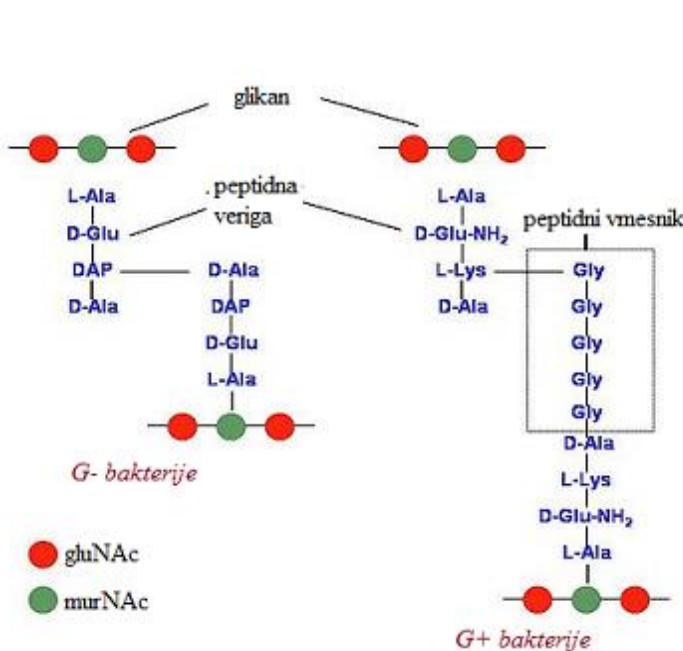
- periplazma loči steno od membrane in vsebuje toksine ter encime, ki uničujejo snovi, ki bi utegnile škoditi bakteriji, ne poškodujejo pa organizma, ki te snovi proizvaja;
- plast peptidoglikana je zelo tanka, in predstavlja le 10 do 20 % celotne stene;
- dvoslojnja zunanja membrana je preko lipoproteinskih molekul s kovalentno vezjo povezana s peptidoglikanom. Njena naloga je nadziranje prehoda proteinov iz okolice v celico. Membrana vsebuje porine, ki tvorijo transmembranske, z vodo napolnjene kanalčke, ki omogočajo vstop tudi polarnim spojinam;
- zunanja površina stene je pomemben del zunanje membrane. Vsebuje lipopolisaharid, imenovan endotoksin, s pomočjo katerega lahko identificiramo G- bakterije. Poleg tega je endotoksin odgovoren tudi za vnetne reakcije, povzroča vročino, širi krvne žile. Iz bakterije se sprosti šele, ko bakterija umira, zato moramo biti zelo previdni z antibiotiki, saj če jih apliciramo prepozno, lahko to povzroči poslabšanje simptomov ali pa celo smrt bolnika. (6, 8)



Slika 7: Bakterijska celična stena G- bakterij (povzeto po (12))

1.5. PEPTIDOGLIKAN

Peptidoglikan, imenovan tudi murein, sestavlja verige glikana, povezane preko navzkrižno premreženih peptidnih verig, kar tvori trdno, a elastično strukturo, ki omogoča zaščito celice pred razkrojem pod vplivom osmotskega pritiska.



Slika 8: Zgradba peptidoglikana (povzeto po (13))

Glikan tvorita izmenjujoči se sladkorni komponenti, *N*-acetilglukozamin (*glcNAc*) in *N*-acetilmuraminska kislina (*murNAc*), povezani z β -1,4 glikozidno vezjo. Preko karboksilne skupine *murNAc* pa glikan tvori vez s peptidno verigo.

Peptidna veriga je

običajno tetra peptid iz sledečih aminokislin: L-alanina, D-alanina, D-glutaminske kisline in lizina, pri *G+* bakterijah ter diaminopimelinske kisline pri *G-* bakterijah.

Navzkrižno povezovanje peptidnih verig poteka s pomočjo transpeptidaze in se razlikuje glede na to, ali je bakterija *G+* ali *G-*. Pri *G-* organizmih poteče vezava neposredno med terminalnim D-alaninom ene verige in prosto amino skupino diaminopimelinske kisline na mestu 3 drugega peptida, pri *G+* pa je med terminalnim D-alaninom ene verige in L-lizinom druge še peptidni vmesnik, ki se razlikuje od organizma do organizma. (8 – 10)

1.5.1. SINTEZA PEPTIDOGLIKANA

Glede na to, v katerem predelu celice poteka, razdelimo biosintezo peptidoglikana na dva dela. Prvi del obsega tvorbo monomernih enot v znotrajceličnem prostoru z encimi citoplazme, ki kot končni produkt daje lipid II. V drugem koraku pa sledi zunajcelična polimerizacija lipida II ter vgrajevanje končnega polimera v endoskelet celice.

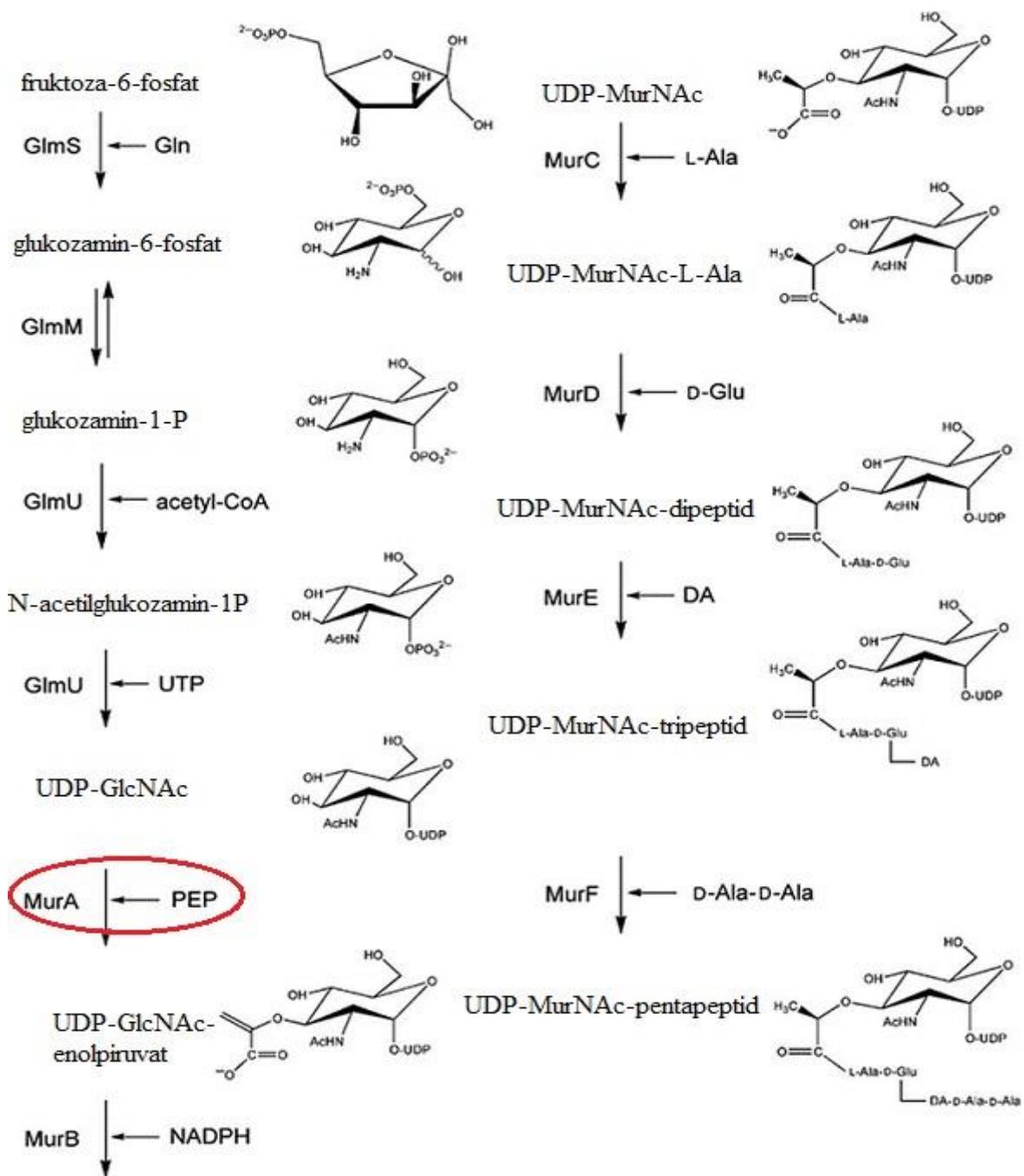
Reakcije, ki potekajo v prvem delu lahko razdelimo na štiri korake:

1. Sinteza UDP-GlcNAc obsega štiri reakcije, ki vključujejo različne encime. Kot prvi sodeluje encim *GlmS* (glukozamin-6-fosfat sintaza), amidotransferaza, ki je ključni encim za pretvorbo D-fruktoze-6-fosfata v D-glukozamin-6-fosfat. Je monomer, sestavljen iz dveh funkcionalno in struktorno različnih domen. Glutaminazna domena (N-konec) skrbi za hidrolizo glutamina v glutamat in amonijak, izomerna domena (C-konec) pa skrbi za tvorbo glukozamin-6-fosfata, pri čemer kot vir dušika uporablja amonijak. Naslednji sodelujoči encim je *GlmM* (fosfoglukozamin mutaza), ki katalizira izomerizacijo glukozamin-6-fosfata v glukozamin-1-fosfat. Aktiven je le v fosforilirani obliki. Zadnji dve reakciji sinteze sta katalizirani z bi funkcionalnim encimom *GlmU*. C-končna domena encima ima glukozamin-1-fosfat acetiltransferazno aktivnost in prenese acetilno skupino iz acetil CoA na amino skupino glukozamin-1-fosfata. N-acetylglukozamin-1-fosfat uridintransferazna aktivnost pa pripada N-končni domeni encima *GlmU*, ki ob prisnosti UTP-ja tvori končni produkt UDP-GlcNAc in pirofosfat.
2. Sinteza UDP-MurNAc poteka iz UDP-GlcNAc v dveh korakih. Najprej encim MurA (UDP-*N*-acetilglukozaminenolpiruvil transferaza) prenese enolpiruvat iz fosfoenolpiruvata na 3`-hidroksilni del UDP-GlcNAc molekule, pri čemer se sprosti anorganski fosfat. Temu sledi redukcija enolpiruvata v D-laktat, kar katalizira encim MurB (UDP-*N*-acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza), ob prisotnosti NADPH in tako dobimo UDP-MurNAc.
3. Tretji korak sinteze peptidoglikana obsega pripenjanje aminokisl in ali peptidov na molekulo UDP-MurNAc s pomočjo Mur ligaz, ki delujejo bodisi individualno ali istočasno, vse pa so ATP odvisne in imajo enak katalitični mehanizem. Vezava peptidov se začne z L-alaninom ob prisotnosti MurC, sledi D-glutaminska kislina z MurD, bazična aminokislina (diaminopimelinska kislina ali L-lizin) z MurE in na koncu še dipeptid D-alanin-D-alanin z encimom MurF.

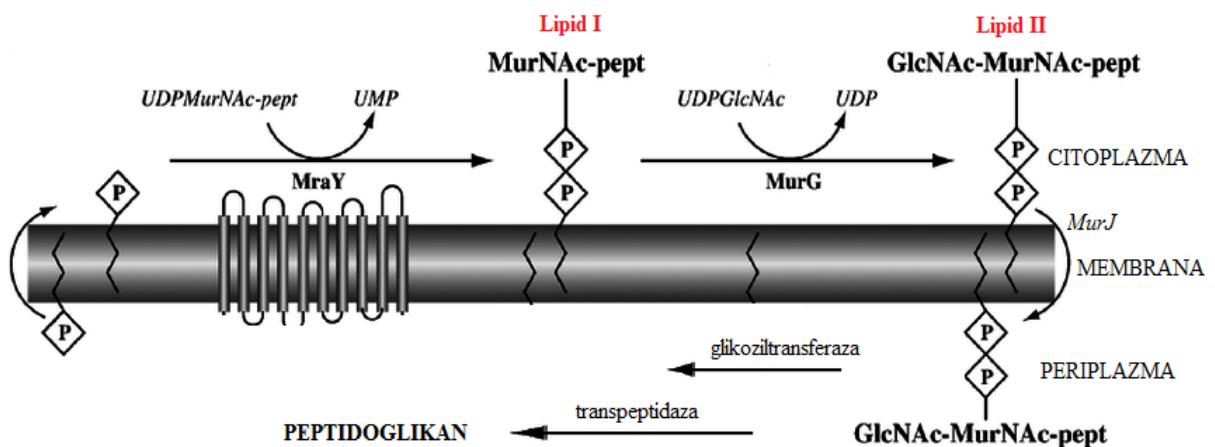
4. Nastanek lipidnega intermediata se začne s pripenjanjem fosfo-MurNAc-pentapeptidnega dela UDP-MurNAc-pentapeptida na undekaprenol fosfat, ki se nahaja na citoplazemski membrani. Tako nastane **lipid I** (MurNAc-pentapeptid-pirofosforil-undekaprino) in UMP, reakcijo pa katalizira MraY translokaza. Sledi še pripenjanje GlcNAc ostanka UDP-GlcNAc na MurNAc del lipida I ob prisotnosti MurG transferaze, ki sladkorni komponenti poveže z β -1,4 glikozidno vezjo. Tako dobimo končno monomerno enoto, **lipid II** (UDP-GlcNAc-MurNAc-pentapeptid-pirofosforil-undekaprenol).

Z nastankom lipida II se znotrajcelični del sinteze peptidoglikana zaključi in sledi še zunajcelična polimerizacija. Mehanizem prenosa lipida II preko citoplazemske membrane še vedno ni razjasnjen, se pa omenja vloga encima MurJ kot flipaze, kar zavrne prejšnje hipoteze o vlogi morfogenetskega proteina RodA in FtsW.

V procesu polimerizacije nastaja glikan z glikoziltransferazo, transpeptidaza pa katalizira prečno premreženje tetrapeptidov in poskrbi za vključevanje peptidoglikana v endoskelet celice. (14- 16)



Slika 9: Sinteza peptidoglikana (povzeto po (14, 19))



Slika 10: Sinteza peptidoglikana (povzeto po (14, 19))

1.6. ENCIMI Mur

Mur sintetaze, aminokislinske ligaze (MurC, D, E in F), so kot že omenjeno ene pomembnejših encimov pri sintezi peptidoglikana, kjer sodelujejo pri nastajanju peptidnega mosta. Vsi štirje encimi si delijo 3 skupne lastnosti:

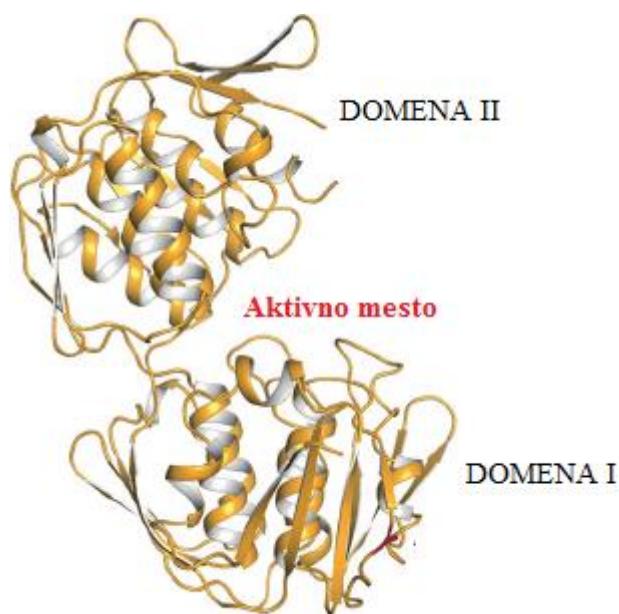
- I. imajo podobno tridimenzionalno strukturo, ki vključuje tri domene. *N-terminalna domena* je odgovorna za vezavo UDP-MurNAc substrata, *C-terminalna domena* je povezana z vezavo prihajajoče aminokisline ali dipeptida ter *centralna domena* z ATP vezavnim mestom. C-domena in centralna domena se med encimi bistveno ne razlikujeta, do razlik pa prihaja pri N-terminalni domeni. Razlike so povezane predvsem z dolžino UDP-prekurzorja;
- II. encimi delujejo po podobnem reakcijskem mehanizmu. Najprej poteče aktivacija karboksilne skupine UDP-prekurzorja v acilfosfatni intermediat, pri čemer se porablja ATP. Sledi nukleofilni napad amino skupine pripenjajoče se aminokisline ali dipeptida, kar vodi najprej v nastanek visoko energetskega intermediata, ki pa se sčasoma sprosti in dobimo peptid ali amid ter anorganski fosfat;
- III. poleg značilnega ATP vezavnega mesta jim je skupnih še šest nespremenjenih aminokislinskih ostankov, kar encime Mur opredeljuje kot novo družino encimov.

(14, 17, 18)

1.6.1. ENCIM MurA

MurA encim je eden ključnih encimov pri sintezi peptidoglikana. Katalizira prenos enolpriuvata iz fosfoenolpiruvata na UDP-GlcNAc, kar je prvi korak pri biosintezi bakterijske celične stene. Prisoten je tako pri G+ kot pri G- bakterijah, s to razliko, da imajo G+ dve kopiji MurA gena (MurA in MurZ). Pri *E. coli* in *S. pneumoniae* je ključen za preživetje bakterije.

Sestavlja ga dve kroglasti domeni, s podobno glavno verigo (vzporedne notranje vijačnice, obdane z α -vijačnicami in β -ploskvami). Katalitično mesto encima se nahaja v »votlinici« med obema domenama.



Slika 11: Odprta struktura MurA encima (povzeto po (20))

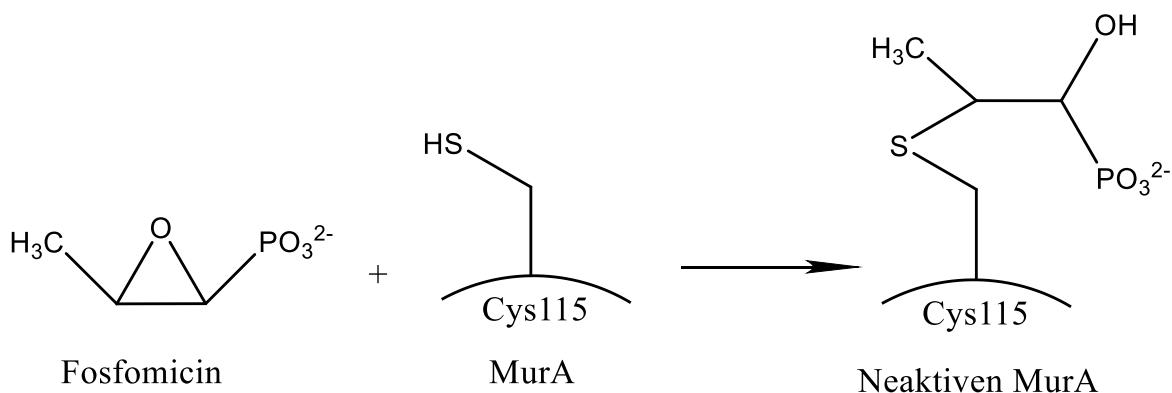
Reakcijski mehanizem encima MurA lahko opišemo kot adicijo s sledečo eliminacijo, z nastankom ne-kovalentno vezanega fosfolaktoil-UDP-GlcNAc tetraedičnega intermediata. Pri reakciji kot kislinsko bazični katalizator sodeluje aminokislinski ostanek Cys115, za deprotonacijo 3'-OH skupine na UDP-GlcNAc pa poskrbi Asp305, ki je odgovoren tudi za končno deprotonacijo C-3 atoma tetraedičnega intermediata, ki vodi v izločanje fosfata. Aminokislinski ostanek Lys22 sodeluje pri vezavi fosfoenolpiruvata in pri strurni spremembji, ki vodi do nastanka zaprte strukture encima.

MurA encim je privlačna tarča za odkrivanje novih protibakterijskih učinkovin, ker ima pomembno vlogo pri biosintezi peptidoglikana.

(14, 18, 21)

1.6.2. ZAVIRALCI MurA

Encim MurA je edini v družini Mur encimov, ki že ima klinično uporabljenega zavirala. To je ***fosfomicin***, naravni antibiotik s širokim spektrom delovanja. Uporablja se predvsem za zdravljenje gastrointestinalnih okužb pri otrocih, povzročenih z *E. coli*, ter pri bakterijskih okužbah urinarnega trakta. Je kompetitiven zaviralec, strukturno podoben fosfoenolpiruvatu. Veže se kovalentno na cisteinski ostanek (Cys115) v aktivnem mestu encima MurA in deluje kot irreverzibilni zaviralec. Delovanje fosfomicina je časovno odvisno, pospeši pa ga prisotnost UDP-GlcNAc, ki povzroča strukturne spremembe, ključne za zaviranje. Slaba lastnost fosfomicina je, da bakterije hitro razvijejo odpornost nanj, zato se razvijajo nove spojine z drugačno strukturo in drugačnim mehanizmom delovanja. Odpornost se lahko razvije zaradi encimske modifikacije antibiotika, prekomernega izražanja encima MurA ali zmanjšanega vnosa antibiotika. (17-19)



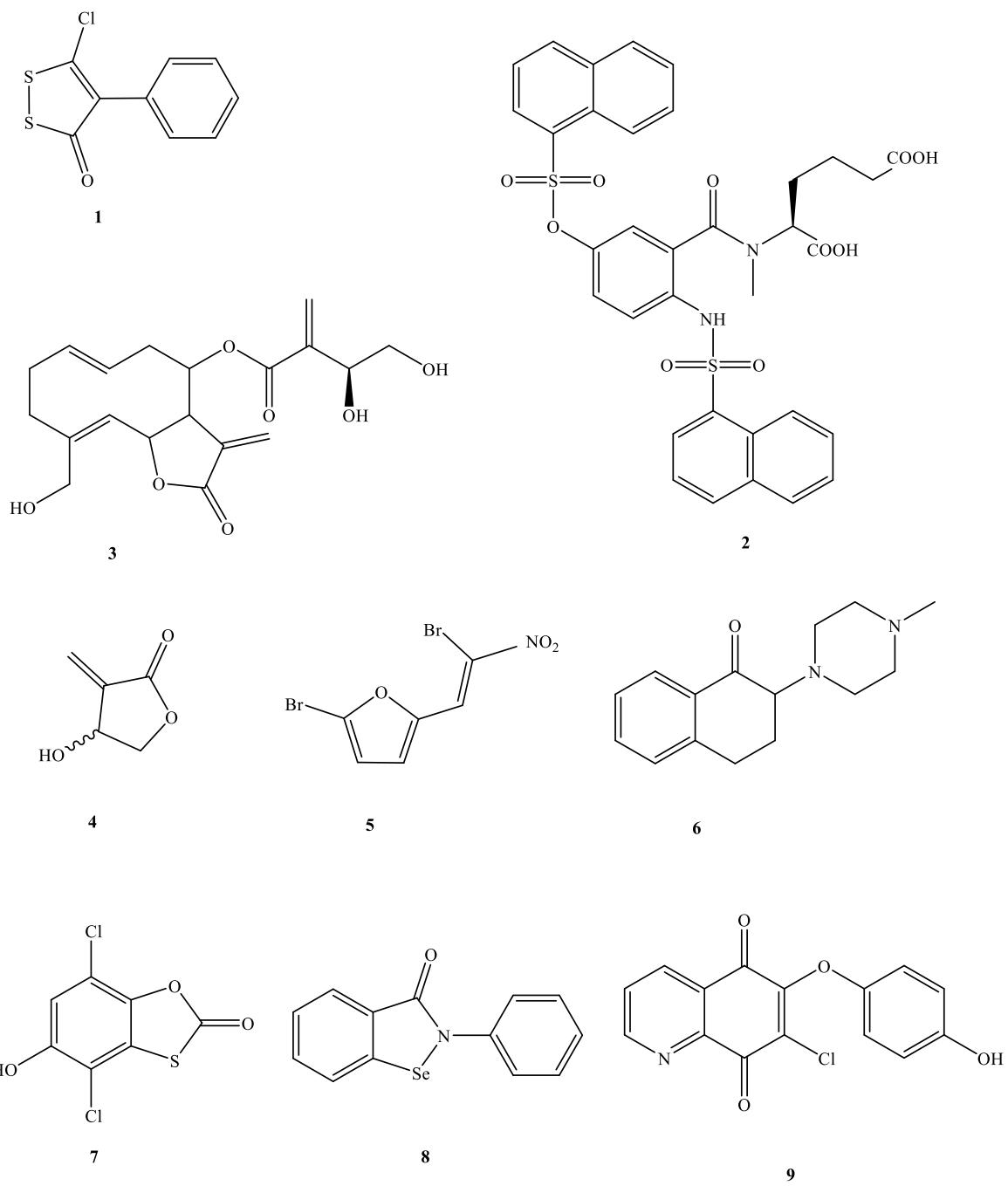
Slika 12: Kovalentna vezava fosfomicina na MurA (povzeto po (18))

Razvitih je bilo že več novih zaviralcev encima MurA:

- purinski analogi, pirazolpirimidini in ciklični disulfid: se nekovalentno vežejo v aktivno mesto encima MurA ali v njegovo bližino in nespecifično zavirajo biosintezo DNA, RNA in proteinov;
- z metodo rešetanja z visoko zmogljivostjo (HTS) so odkrili dva nova derivata, T6361 in T6362, ki tvorita kompleks z MurA encimom. Delujeta tako, da zavirata nastanek zaprte oblike encima, ki je ključna za njegovo delovanje;

- modificirani laktoni (cnicin in cinaro pikrin) izkazujejo močno, ireverzibilno zaviranje encima MurA iz *E.coli* in *P.aeruginosa*. MurA katalizira napačno reakcijo in tako se cnicin kovalentno poveže z UDP-GlcNAc, kar vodi v nastanek samomorilskega zaviralca. Kljub temu, da je mehanizem delovanja modificiranih laktonov dobro poznan, ne moremo z zagotovostjo trditi, da je njihovo protibakterijsko delovanje povezano izključno z zaviranjem MurA;
- 1-tulipsoid B je močan zaviralec *MurA* iz *E.coli*, njegovo delovanje je časovno odvisno in pogojeno z prisotnostjo OH skupine;
- derivati nitrovinilfurana in bromonitrometan imajo širok spekter delovanja, reagirajo s številnimi proteini preko njihovih cisteinskih ostankov in so zato za nadaljnji razvoj nezanimivi;
- z rešetanjem Novartisove knjižnice sta bili najdeni dve novi skupini, derivati 2-aminotetralona, pri katerih je za zaviralno delovanje ključen α -amino ketonski del, s katerim se kovalentno ali nekovalentno vežejo na encim, ter derivati benzotioksalona, ki izkazujejo močno, ireverzibilno zaviranje;
- najdeni so bili novi zaviralci encima MurA iz *Haemophilus influenzae*, in sicer ebselen, timerosal in tiram, ki preko kovalentnih modifikacij aktivnega mesta Cys177 povzročajo strukturne spremembe, ki onemogočajo vezavo UDP-GlcNAc na mesto delovanja. Na *H. influenzae* delujejo še spojine s kinolonsko ali naftokinonsko strukturo, ki ravno tako tvorijo kovalentne povezave s cisteinskimi ostanki MurA.

(17)



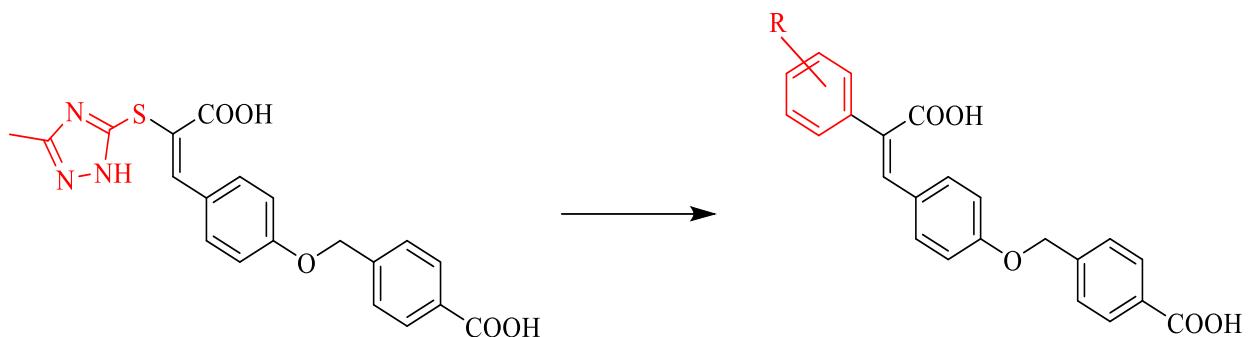
Slika 13: Zaviralci encima MurA (povzeto po (17)): 1...ciklični disulfid; 2...T6361; 3...cnicin; 4...1-tulipsoid B; 5...bromonitrometan; 6...2-aminotetralon; 7...benzotioksalon; 8...ebselen; 9...kinolonski derivat

2. NAMEN DELA

Za cilj magistrskega dela smo si zadali načrtovanje in sintezo novih derivatov cimetne kisline s potencialnim protibakterijskim delovanjem na encimu MurA.

Delo bo potekalo v treh delih:

1. Najprej bomo na osnovi znanega zaviralca encima MurA (22), ki je strukturni analog spojine zadetka iz virtualnega rešetanja na encimu MurA iz *E.coli*, načrtovali in sintetizirali nove derivate cimetne kisline, pri katerih bomo *3-metil-1H-1,2,4-triazol-5-tiolni* fragment nadomestili s *fenilnim obročem*, spremajali pa bomo tudi položaj in substitucijo na osrednjem fenilnem obroču;



2. V drugem delu bomo poskušali sintetizirati estre med cimetno kislino in ksantonom, ki izkazujejo protibakterijsko delovanje;
3. V zadnjem delu pa bomo spojinam, ki jih bomo sintetizirali, določili zaviralno delovanje na encimu MurA iz *E. coli* in *S. aureus*. Aktivnim spojinam bomo določili IC₅₀ vrednosti, najbolj obetavnim pa bomo določili tudi protibakterijsko delovanje z določitvijo njihove minimalne inhibitorne koncentracije (MIK).

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Pri delu smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev: Sigma-Aldrich, Merck, J.T. Baker.

Uporabljeni reagenti: salicilna kislina, fluoroglucinol, kositrov klorid, natrijev sulfat, 4-karboksibenzaldehid, kalijev acetat, metil 4-(bromometil)benzoat, metil 3-(bromometil)benzoat, kalijev karbonat, cimetna kislina, DMF, BOP, 3-karboksibenzaldehid, anhidrid ocetne kisline, aceton, koncentrirana HCl, trietilamin.

Uporabljena topila: etilacetat, diklorometan, aceton, metanol, etanol, heksan, prečiščena voda.

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

3.2. METODE

3.2.1. KROMATOGRAFSKE METODE

Kromatografske metode nam omogočajo ločbo snovi na podlagi fizikalno kemijskih lastnosti. Kromatografski sistemi so sestavljeni iz mobilne in stacionarne faze, ki sta lahko v različnih agregatnih stanjih.

Tankoplastna kromatografija se izvaja na TLC-ploščici, ki je lahko iz plastike, stekla ali aluminija, prekrita z adsorpcijsko plastjo (celuloza, silikatni gel, aluminijev oksid), imenovano stacionarna faza. Na ploščico nanesemo vzorec in postavimo v mobilno fazo (topilo oziroma zmes topil), ki po principu kapilarnega gradiента potuje po stacionarni fazi. Do ločbe pride zaradi različnih interakcij spojin z mobilno in stacionarno fazo. (23)

Rezultat tankoplastne kromatografije podamo kot retencijski faktor. To je razmerje med potjo, ki jo je prepotovala spojina, in potjo, ki jo je prepotovala mobilna faza.

Pri delu smo uporabljali Merckove TLC plošče Silica Gel 60 GF254 z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Mobilne faze so bile različne glede na spojino, ki smo jo določali. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetlobo, valovnih dolžin 254 in 366 nm.

Kolonska kromatografija: Pri tipični koloni je stacionarna faza (trden adsorbent, običajno silikagel ali aluminijev dioksid) nameščena vertikalno v stekleni koloni in suspendirana v mobilni fazi, tekočo mobilno fazo pa dodamo na vrh kolone, kjer nato potuje navzdol po koloni bodisi zaradi gravitacije ali pa zunanjega pritiska. Tako kot mobilno fazo tudi spojino, ki jo želimo očistiti, nanesemo na vrh kolone, in sicer takoj za mobilno fazo. Ločba spojin temelji na podlagi različne hitrosti potovanja komponent vzorca vzdolž kolone zaradi selektivnega zadrževanja komponent na stacionarni fazi in različnih interakcij z mobilno in stacionarno fazo. (24)

Za čiščenje nekaterih produktov smo uporabljali kolonsko kromatografijo pod tlakom, pri čemer smo uporabljali steklene kolone, za stacionarno fazo pa Merckov Silikagel 60 z velikostjo delcev med 0,04 in 0,063 mm. Mobilne faze so bile različne pri posameznih spojinah.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC): HPLC metoda za prehod topila (mobilne faze) skozi kolono namesto sile teže uporablja visoke pritiske. Kolona je napolnjena s stacionarno fazo, trdnim adsorbentom, s katerim vsaka spojina različno interagira, kar privede do ločitve komponent vzorca. (25, 26)

HPLC analizo naših spojin smo izvajali na sistemu Agilent Technologies HP 1100 z G1365B UV-VIS detektorjem (220 in 254 nm). Uporabljali smo kolono Agilent Eclipse Plus C18 (5 µm, 4,6x150 nm), termostatirano na 25 °C. Volumen injiciranja vzorca je bil 10 µL in hitrost pretoka mobilne faze 1mL/min. Za mobilno fazo smo uporabili mešanico 0,1 % raztopine trifluorocetne kisline (TFA) in acetonitrila.

0,1 % TFA/ACN

0 – 19 min: 20 – 90 % ACN

19 – 20 min: 90 % ACN

3.2.2. SPEKTROSKOPSKE METODE

Spektroskopske metode nam omogočajo določiti strukturo in čistost želenega produkta.

Jedrska magnetna resonanca (NMR): za ugotavljanje strukture sintetizirane spojine smo uporabljali NMR spektroskopijo. Gre za opis interakcij magnetnih momentov atomskih jader z elektromagnetnim poljem s frekvenco enako lastni frekvenci jader.

NMR spektri so bili posneti na Bruker Avance III 400 MHz spektrometru na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Kot interni standard se je uporabljal TMS, za raztavljanje vzorcev pa smo uporabili devterirani topili CDCl_3 in DMSO-d_6 . Spektre smo obdelali s programom MestRe-C.

Masna spektroskopija (MS): z masno spektroskopijo določamo mase atomov in molekul tako, da s pomočjo magnetnega in električnega polja ločimo ione po masi. (28) Masne spektre so posneli v Centru za masno spektrometrijo na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani na Q-TOF Premier spektrometru.

3.2.3. DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA

Sintetiziranim spojinam smo temperaturo tališča izmerili na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani z uporabo Koflerjevega mikroskopa z ogrevalno mizico Leica.

3.2.4. RISANJE STRUKTUR SPOJIN

Za risanje struktur spojin smo uporabljali ChemBioDraw Ultra 11.0, proizvajalca Cambridge Soft.

3.2.5. BIOKEMIJSKO TESTIRANJE

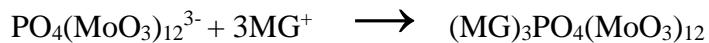
Sintetiziranim spojinam smo zaviralno aktivnost določili na izoliranem encimu MurA iz *S. aureus* in *E. coli*. Določali smo jo na podlagi reakcije med UDP-GlcNAc in PEP z MurA, pri kateri se sprosti fosfat, s pomočjo katerega lahko določamo aktivnost encima. Količino sproščenega fosfat smo določili z dodatkom BIOMOL® Green reagenta, ki vsebuje barvilo malahit zeleno, ki tvoriobarvan kompleks med molibdatom in sproščenim fosfatom.

Obarvan kompleks določamo spektrofotometrično pri 650 nm. Katalitska aktivnost encima in množina sproščenega fosfata sta sorazmerni.

Dobljene rezultate smo podali z rezidualno aktivnostjo, ki je definirana kot razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti testirane spojine in aktivnostjo encima brez prisotnosti testirane spojine.



fosfat molibdat fosfomolibdat



fosfomolibdat malahit zeleno obarvan kompleks

Reakcijska zmes je vsebovala:

- 100 µM PEP,
- 200 µM UDP-GlcNAc
- 0,005 % tritonX114
- 50 mM HEPES pH 7,8; 1 mM DTT
- očiščen MurA ter
- spojino v DMSO.

Tako pripravljeno reakcijsko zmes smo inkubirali 15 minut pri 37 °C in nato dodali BIOMOL® Green reagent. Zmes smo inkubirali še 5 minut, izmerili absorbanco pri 650 nm in izračunali rezidualno aktivnost. Spojinam, ki so izkazale rezidualno aktivnost manjšo od 50 % smo določili še IC₅₀ vrednosti, s pomočjo Hillove enačbe. (29)

Hillova enačba: $\log (\text{RA}/100-\text{RA}) = \text{H} \times \log \text{I} - \log \text{K}_d$

H...Hillov koeficient

I...koncentracija inhibitorja

K_d...konstanta disociacije.

Biokemijska testiranja spojin je izvedla asist. Kaja Rožman, mag. farm.

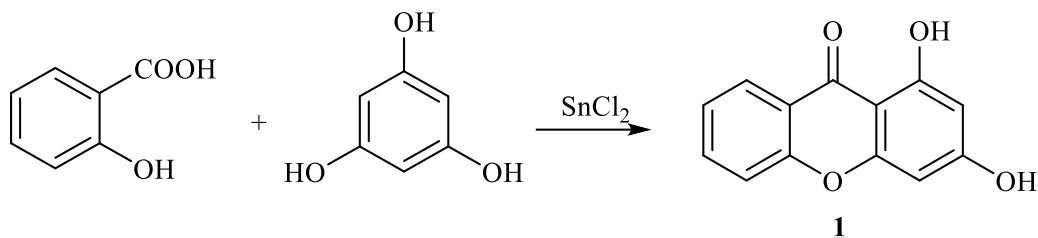
3.2.6. PROTIBAKTERIJSKO DELOVANJE

Spojinam smo določali tudi minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC). Gre za najnižjo koncentracijo spojine, ki še zavira rast bakterije. Določi se jo na podlagi primerjave s pozitivno (tetraciklini pri 10 µg/mL) in negativno (DMSO) kontrolo.

MIC smo določali tako, da smo pripravili različne koncentracije spojin v DMSO-ju (4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625 in 0.03125 mg/mL). Spojine smo nanesli na mikrotitrskе ploščice in jim dodali bakterijski sev v mediju, tako da so končne koncentracije spojin znašale 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 in 1 µg/mL. Ploščice smo pokrili in jih čez noč inkubirali ter jim nato izmerili optično gostoto pri 600 nm.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. SINTEZA 1,3-DIHIDROKSANTSANTA (1)

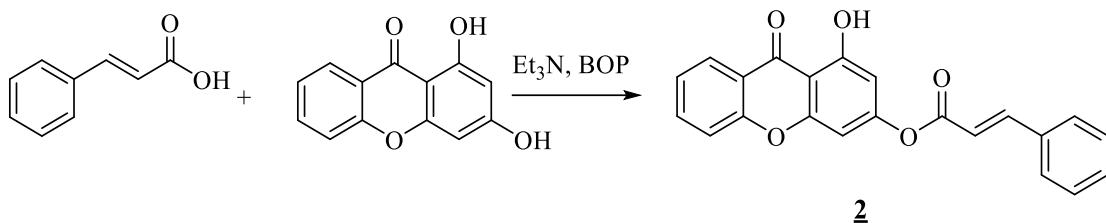


Ekvimolarni količini salicilne kisline (1,381 g, 10,0 mmol) in floroglucinola (1,261 g, 10,0 mmol) smo dodali brezvodni kositrov klorid (0,379 g, 2,0 mmol) in acetonitril (5 ml). Reakcijsko zmes smo 1 minuto obsevali z mikrovalovi (CEM mikrovalovka) pri 140 °C in 100 W.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes prelili na led in ekstrahirali z etilacetatom (2x20 mL). Organsko fazo smo posušili z brezvodnim natrijevim sulfatom, odfiltrirali sušilno sredstvo in topilo odparili na rotavaporju. Dobljeni produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo, z uporabo mobilne faze DKM/MeOH = 9/1. Produkt smo še dodatno očistili s kristalizacijo z etanolom in vodo v razmerju 2:1 in tako dobili 1,3-dihidrosilksanton. (4)

1,3- DIHIDROKSILKSANTON	
Molekulska masa:	228,203
Izgled:	Belo-rumeni kristali
Rf:	0,73 (MF: DKM/MeOH = 9/1)
Tališče:	> 300 °C
Izkoristek:	7 %
^1H – NMR (400 MHz, DMSO-d_6):	δ = 12,84 (s, 1H, OH); 11,19 (s, 1H, OH); 8,12-8,14 (m, 1H, Ar-H); 7,83-7,89 (m, 1H, Ar-H); 7,60 (d, J = 8,3Hz, 1H, Ar-H); 7,47 (t, J = 7,4Hz, 1H, Ar-H); 6,41 (d, J = 2,0Hz, 1H, Ar-H); 6,22 (d, J = 2,0Hz, 1H, Ar-H) ppm.

4.2. SINTEZA 1-HIDROKSI-9-OKSO-9H-KSANTON-3IL 3-
FENILAKRILATA (2)

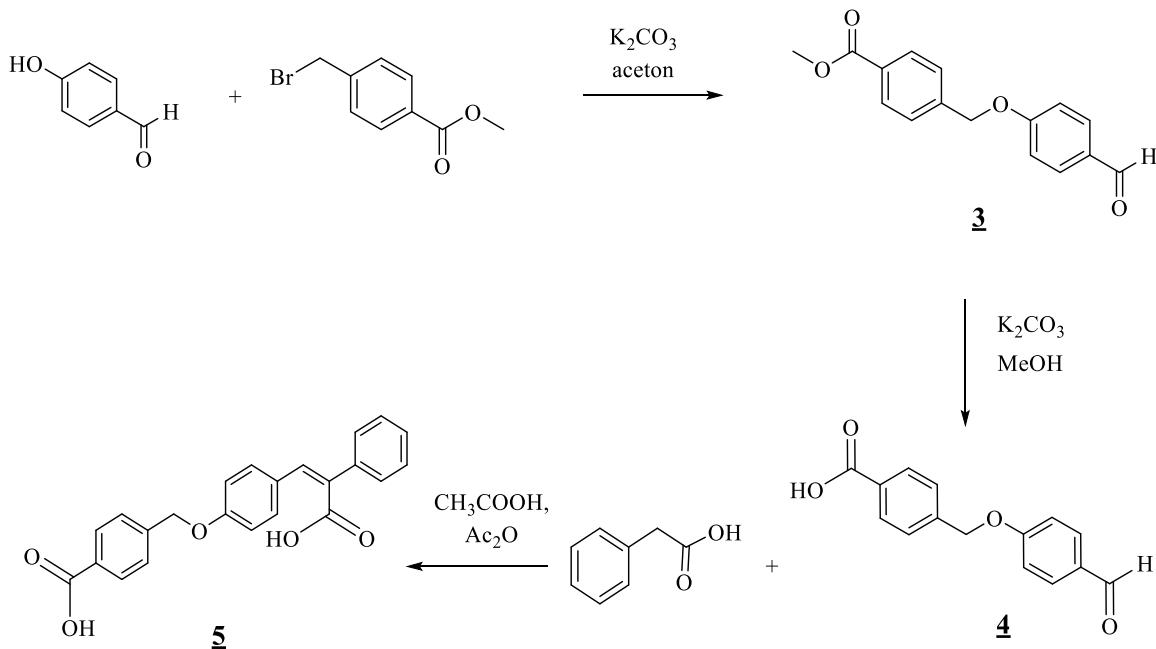


Cimetno kislino (0,045 g, 0,3 mmol) smo raztopili v DMF (5 mL), dodali BOP (0,146 g, 0,33 mmol) in ohladili na 0 °C. Nato smo dodali še 1,3-dihidroksiksanton (0,0684 g, 0,3 mmol) in trietilamin (0,066 mL, 0,9 mmol) ter na sobni temperaturi mešali čez noč (~17ur).

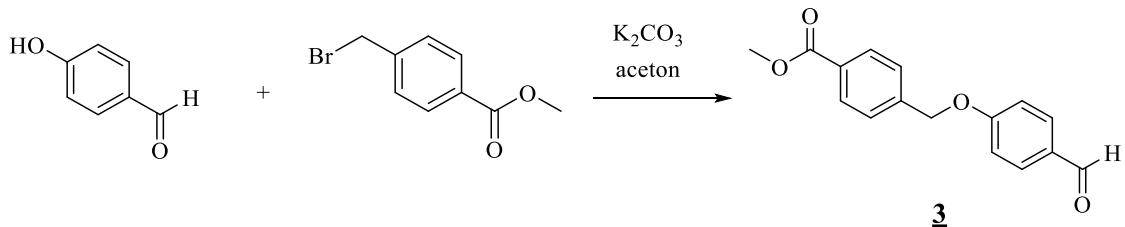
Reakcijski zmesi smo dodali etil acetato (50 mL) ter spirali z vodo (50 mL) in 10 % citronsko kislino (30 mL) ter organsko fazo posušili z brezvodnim Na₂SO₄. Sušilno sredstvo smo odfiltrirali, odparili topilo in produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/Hex = 1/2).

1-HIDROKSI-9-OKSO-9H-KSANTON-3IL 3-FENILAKRILAT	
Molekulska masa:	358,349
Izgled:	svetlo rumena amorfna snov
Rf:	0,61 (MF: EtOAc/Hex = 1/2)
Tališče:	> 300 °C
Izkoristek:	30 %
¹H – NMR (400 MHz, aceton-d₆):	δ = 13,32 (s, 1H, OH); 8,76-8,79 (m, 1H, Ar-H); 8,41 (d, J =16,0 Hz, 1H, CH); 8,23-8,28 (m, 1H, Ar-H); 8,09-8,12 (m, 2H, Ar-H); 7,98-8,00 (m, 1H, Ar-H), 7,96-7,97 (m, 1H, Ar-H), 7,94 (d, J =2,2 Hz, 1H, Ar-H); 7,92-7,93 (m, 1H, Ar-H); 7,90-7,91 (m, 1H, Ar-H) 7,75 (s, 1H, CH); 7,11-7,16 (m, 2H, Ar-H) ppm.
¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):	δ = 180,83; 163,75; 161,76; 156,89; 156,12; 155,38; 147,12; 136,27; 133,46; 130,87; 128,79; 128,55; 125,21; 124,61; 119,62; 117,75; 116,35; 106,24; 104,34; 101,16 ppm.
HPLC:	t _R : 13,146 min
ESI-HRMS:	Izračunana za C ₂₂ H ₁₅ O ₅ (m/z): 359,0919 [M+H] ⁺ Izmerjen (m/z): 359,0918

4.3. SINTEZA 4-((4-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)FENOKSI)METIL)BENZOJSKE KISLINE (**5**)



4.3.1. SINTEZA METIL 4-((4-FORMILFENOKSI)METIL)BENZOATA (**3**)

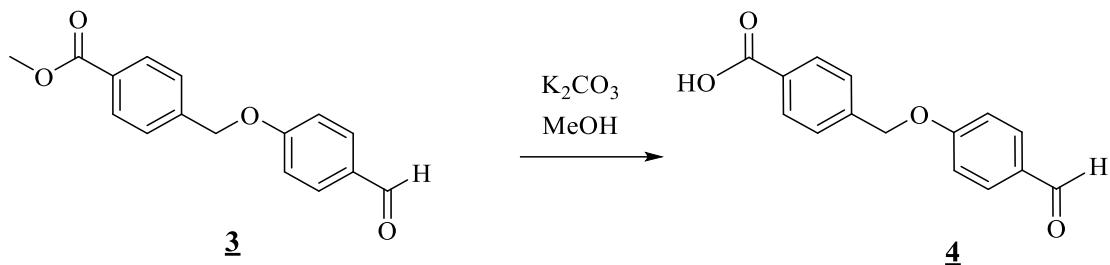


Zmes 4-hidroksibenzaldehida (1,22 g, 10 mmol), metil 4-(bromometil)benzoata (2,29 g, 10 mmol), kalijevega karbonata (1,52 g, 11 mmol) in acetona (20 mL) smo segrevali 4 ure pri 50 °C.

Po končani reakciji smo topilo odparili na rotavaporju in preostanek suspendirali v vodi (100 mL) in etilacetatu (100 mL) ter ločili fazi. Organsko fazo smo posušili, odparili topilo ter postopek čiščenja spojine nadaljevali s kristalizacijo iz metanola (20 mL).

METIL 4-((4-FORMILFENOKSI)METIL)BENZOAT	
Molekulska masa:	270,284
Izgled:	kristali
Rf:	0,67 (MF: EtOAc/Hex = 1/1)
Tališče:	130 – 135 °C
Izkoristek:	99 %
¹H – NMR (400 MHz, DMSO- d₆):	$\delta = 9,88$ (s, 1H, CHO); $7,99\text{--}8,02$ (m, 2H, Ar-H); $7,87\text{--}7,91$ (m, 2H, Ar-H); $7,62$ (d, $J=8,6$ Hz, 2H, Ar-H); $7,21\text{--}7,25$ (m, 2H, Ar-H); $5,35$ (s, 2H, CH ₂); $3,87$ (s, 3H, CH ₃) ppm.

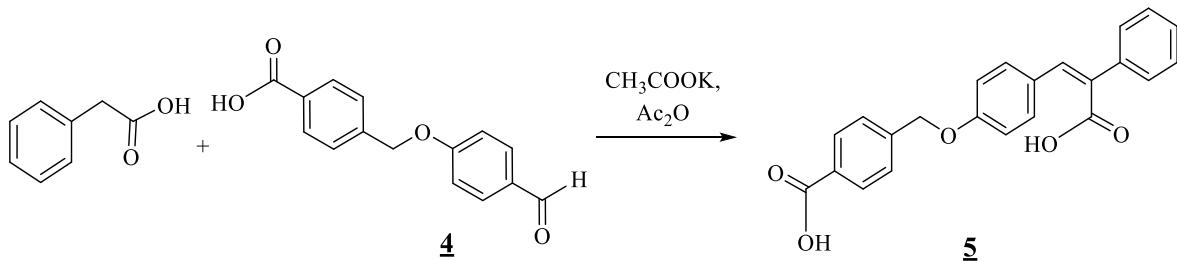
4.3.2. SINTEZA 4-((4-FORMILFENOKSI)METIL BENZOJSKE KISLINE (**4**)



Spojino **3** (2,054 g, 7,6 mmol), kalijev karbonat (5,25 g, 38 mmol) in metanol (20 mL) smo segrevali 4 ure pri 60 °C. Po končani reakciji smo izvedli ekstrakcijo z diklorometanom (2x20 mL) in vodno fazo nakisali s koncentrirano HCl do pH = 1, pri čemer se je izboril produkt, ki smo ga odfiltrirali z odsesavanjem.

4-((4-FORMILFENOKSI)METIL)BENZOJKSA KISLINA	
Molekulska masa:	256,257
Izgled:	kristali
Rf:	0,17 (MF: EtOAc/Hex = 1/1)
Tališče:	> 300 °C
Izkoristek:	56%
¹H – NMR (400 MHz, DMSO-d₆):	$\delta = 13,03$ (s, 1H, COOH); $9,88$ (s, 1H, CHO); $7,97\text{--}8,00$ (m, 2H, Ar-H); $7,88\text{--}7,90$ (m, 2H, Ar-H); $7,59$ (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, Ar-H); $7,21\text{--}7,25$ (m, 2H, Ar-H); $5,34$ (s, 2H, CH ₂) ppm.

4.3.3. SINTEZA 4-((4-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)FENOKSI)METIL)BENZOJSKE KISLINE (**5**)



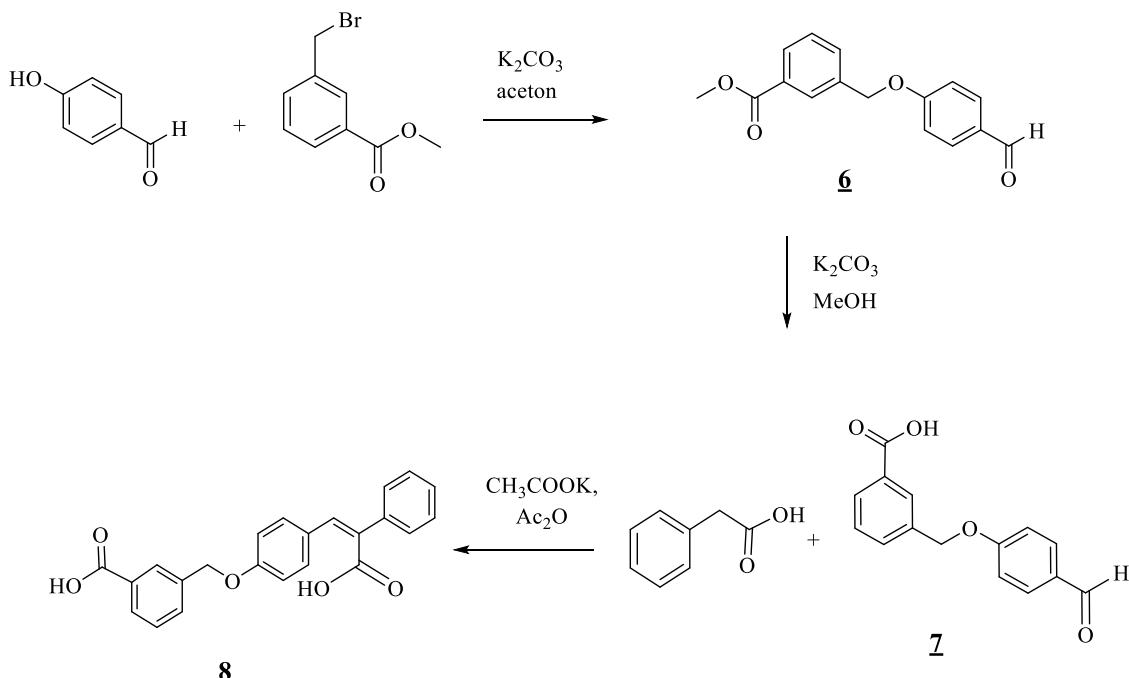
Reakcijsko zmes fenilocetne kisline (0,583 g, 4,29 mmol), spojine **4** (1,09 g, 4,29 mmol), kalijevega acetata (0,560 g, 5,72 mmol) in anhidrida ocetne kisline (1,3 mL, 18,29 mmol) smo segrevali najprej 2 uri pri 140 °C, nato pa še 16 ur pri 110 °C.

Po končani reakciji smo zmes ohladili na sobno temperaturo, dodali vodo (25 mL) in naalkalili s 3M NaOH do pH = 12. Naalkaljeno raztopino smo ekstrahirali z diklorometanom (2x30 mL) in vodno fazo nakisali s koncentrirano HCl do pH = 1. Dobili smo oborino (spojina **5**), ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem. (30)

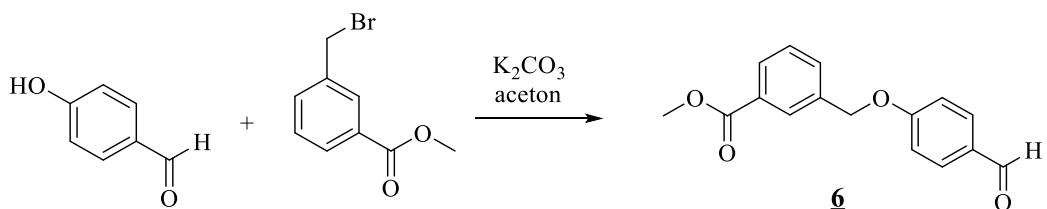
Produkt smo še dodatno očistili s kristalizacijo iz acetona (20 mL).

4-((4-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)FENOKSI)METIL)BENZOJSKA KISLINA	
Molekulska masa:	374,392
Izgled:	Kristali
Rf:	0,34 (MF:DKM/MeOH = 9/1)
Tališče:	290 – 295 °C
Izkoristek:	30 %
^1H – NMR (400 MHz, DMSO-d_6):	$\delta = 12,85$ (rs, 2H, COOH); 7,93-7,95 (m, 2H, Ar-H); 7,71 (s, 1H, CH); 7,51 (d, $J= 8,5\text{Hz}$, 2H, Ar-H); 7,36-7,43 (m, 3H, Ar-H); 7,14-7,18 (m, 2H, Ar-H); 6,99-7,01 (m, 2H, Ar-H); 6,84-6,87 (m, 2H, Ar-H); 5,16 (s, 2H, CH_2) ppm.
^{13}C-NMR (400 MHz, DMSO-d_6):	$\delta = 168,54; 167,09; 158,77; 141,76; 138,74; 136,73; 132,04; 130,95; 130,21; 129,49; 129,47; 128,6; 127,55; 127,44; 127,18; 114,67; 68,59$ ppm.
HPLC:	$t_{\text{R}}: 13,096 \text{ min}$
ESI-HRMS:	Izračunana za $\text{C}_{23}\text{H}_{17}\text{O}_5$ (m/z): 373,1076 [M-H] $^-$ Izmerjen (m/z): 373,1079

4.4. SINTEZA 3-((4-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)FENOKSI)METIL)BENZOJSKA KISLINA (**8**)



4.4.1. SINTEZA METIL 3-((4-FORMILFENOKSI)METIL)BENZOATA (**6**)



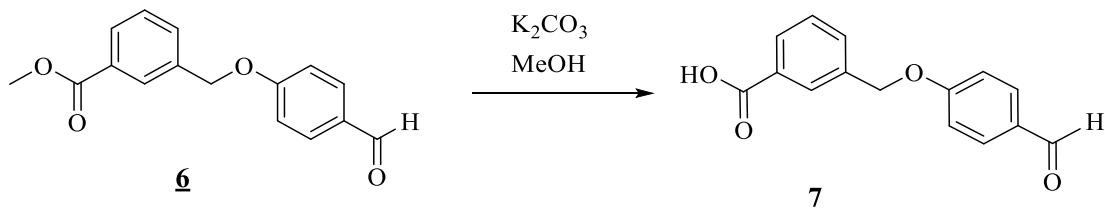
Zmes 4-hidroksibenzaldehida (1,22 g, 10 mmol), metil 3-(bromometil)benzoata (2,29 g, 10 mmol), kalijevega karbonata (1,52 g, 11 mmol) in acetona (20 mL) smo segrevali 4 ure pri 50 °C.

Po končani reakciji smo topilo odparili na rotavaporju in preostanek suspendirali v vodi (100 mL) in etilacetatu (100 mL) ter ločili fazi. Organsko fazo smo posušili ter odparili topilo.

Dobljeni produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo, z uporabo mobilne faze $\text{EtOAc}/\text{Hex}=1/1$.

METIL 3-((4-FORMILFENOKSI)METIL)BENZOAT	
Molekulska masa:	270,284
Izgled:	Kristali
Rf:	0,75 (MF: EtOAc/Hex = 1/1)
Tališče:	130 – 135 °C
Izkoristek:	73 %
¹H – NMR (400 MHz, DMSO-d₆):	$\delta = 9,88$ (s, 1H, CHO); $8,07\text{--}8,08$ (m, 1H, Ar-H); $7,94\text{--}7,96$ (m, 1H, Ar-H); $7,87\text{--}7,91$ (m, 2H, Ar-H); $7,75\text{--}7,80$ (m, 1H, Ar-H); $7,58\text{--}7,60$ (m, 1H, Ar-H); $7,22\text{--}7,25$ (m, 2H, Ar-H); $5,34$ (s, 2H, CH ₂); $3,87$ (s, 3H, CH ₃) ppm.

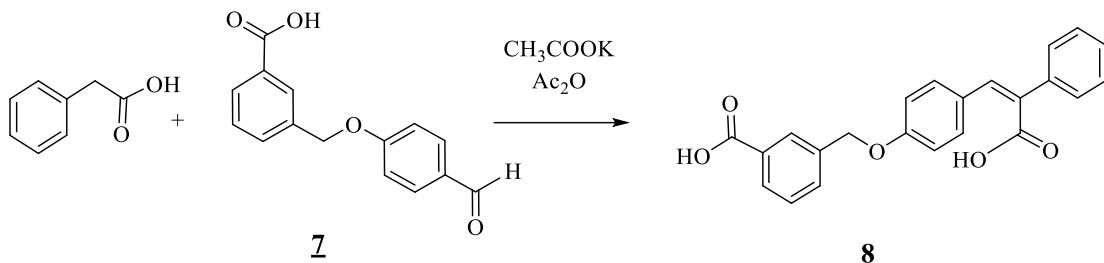
4.4.2. SINTEZA 3-((4-FORMILFENOKSI)METIL BENZOJSKE KISLINE (**7**)



Spojino **6** (1,968 g, 7,29 mmol), kalijev karbonat (5,038 g, 36,45 mmol) in metanol (20 mL) smo segrevali 4 ure pri 60 °C. Po končani reakciji smo izvedli ekstrakcijo z diklorometanom (2x20 mL) in vodno fazo nakisali s koncentrirano HCl do pH = 1. Izoborjeni produkt smo odfiltrirali z odsesavanjem.

3-((4-FORMILFENOKSI)METIL)BENZOJSKA KISLINA	
Molekulska masa:	256,257
Izgled:	Kristali
Rf:	0,23 (MF: EtOAc/Hex = 1/1)
Tališče:	> 300 °C
Izkoristek:	84,0 %
¹H – NMR (400 MHz, DMSO-d₆):	$\delta = 13,10$ (s, 1H, COOH); $9,88$ (s, 1H, CHO); $8,05-8,06$ (m, 1H, Ar-H), $7,91-7,94$ (m, 1H, Ar-H); $7,86-7,90$ (m, 2H, Ar-H); $7,70-7,75$ (m, 1H, Ar-H); $7,55$ (t, $J= 7,7$ Hz, 1H, Ar-H); $7,22-7,25$ (m, 2H, Ar-H); $5,33$ (s, 2H, CH ₂) ppm.

4.4.3. SINTEZA 3-((4-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)FENOKSI)METIL)BENZOJSKE KISLINE (**8**)



Reakcijsko zmes fenil acetne kisline (1,361 g, 10 mmol), spojine **7** (2,56 g, 10 mmol), kalijevega acetata (1,306 g, 13,33 mmol) in anhidrida acetne kisline (4,7 mL, 42,63 mmol) smo segrevali najprej 2 uri pri 140 °C, nato pa še 16 ur pri 110 °C.

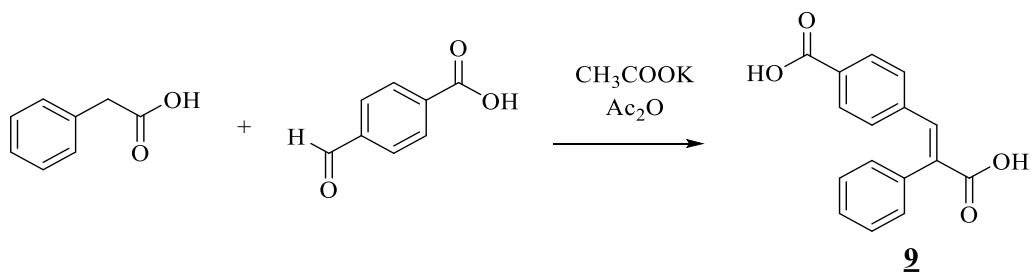
Po končani reakciji smo zmes ohladili na sobno temperaturo, dodali vodo (30 mL) in naalkalili z 3M NaOH do pH=12. Naalkaljeno raztopino smo ekstrahirali z diklorometanom (2x30 mL) in vodno fazo nakisali s koncentrirano HCl do pH = 1. Nastala je oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem in dodatno očistili s kristalizacijo iz acetona (20 mL). (30)

3-((4-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)FENOKSI)METIL)BENZOJSKA KISLINA

Molekulska masa:	374,392
Izgled:	Kristali
Rf:	0,33 (MF: DKM/MeOH = 9/1)
Tališče:	> 300 °C
Izkoristek:	17 %
¹H – NMR (400 MHz, DMSO-d₆):	δ = 12,58 (rs, 2H, COOH); 7,95-7,97 (m, 1H, Ar-H); 7,87-7,90 (m, 1H, Ar-H); 7,72 (s, 1H, Ar-H) 7,64-7,66 (m, 1H, Ar-H); 7,48-7,52 (m, 1H, Ar-H); 7,36-7,43 (m, 3H, Ar-H); 7,16-7,19 (m, 2H, Ar-H); 6,99-7,01 (m, 2H, Ar-H); 6,84-6,87 (m, 2H, Ar-H); 5,15 (s, 2H, CH ₂) ppm.
¹³C-NMR (400 MHz, DMSO-d₆):	δ = 168,43; 167,01; 158,76; 138,66; 137,26; 136,68; 131,97; 130,92; 130,86; 129,41; 128,75; 128,59; 128,29; 127,46; 127,06; 114,59; 68,57 ppm (dva signala se prekrivata)
HPLC:	t _R : 13,096 min
ESI-HRMS:	Izračunana za C ₂₃ H ₁₇ O ₅ (m/z): 373,1076 [M-H] ⁻ Izmerjen (m/z): 373,1083

4.5. SINTEZA KISLINE (9)

4-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)BENZOJKSA

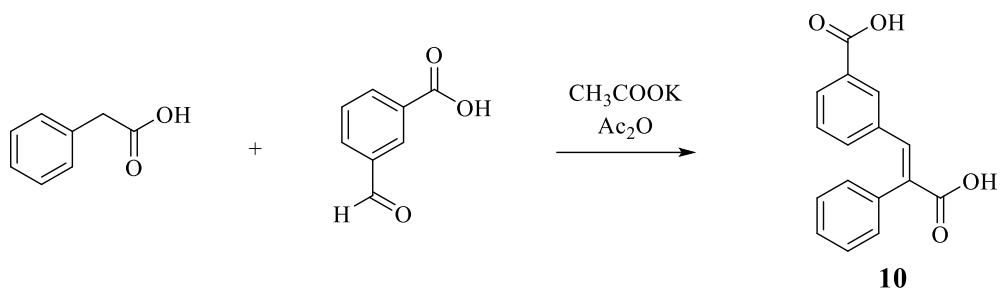


Reakcijsko zmes fenilocetne kisline (0,680 g, 5 mmol), 4-karboksibenzaldehida (0,750 g, 5 mmol), kalijevega acetata (0,653 g, 6,67 mmol) in anhidrida ocetne kisline (2 mL, 21,33 mmol) smo segrevali čez noč (~ 17ur) pri 130 °C. Nato smo ohladili na sobno temperaturo, dodali vodo (25 mL) ter dodajali 3M NaOH do pH = 12. Zmes smo ekstrahirali z diklorometanom (2x30 mL) in vodno fazo nakisali s koncentrirano HCl do pH = 1. Produkt se je pri tem izoboril in smo ga odfiltrirali z odsesavanjem. (30)

4-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)BENZOJKSA KISLINA	
Molekulska masa:	268,268
Izgled:	Bela amorfna snov
Rf:	0,20 (MF: DKM/MeOH = 9/1)
Tališče:	290 – 295 °C
Izkoristek:	81 %
¹H – NMR (400 MHz, DMSO-d₆):	δ = 12,95 (s, 1H, COOH); 7,94-7,96 (m, 2H, Ar-H); 7,81 (s, 1H, CH); 7,70-7,73 (m, 2H, Ar-H); 7,36-7,41 (m, 2H, Ar-H); 7,15-7,18 (m, 3H, Ar-H) ppm.
¹³C - NMR (400 MHz, DMSO-d₆):	δ = 168,0; 166,69; 138,84; 137,81; 135,72; 135,37; 130,54; 130,06; 129,45; 128,99; 128,47; 127,65 ppm.
HPLC:	t _R : 9,457 min
ESI-HRMS:	Izračunana za C ₁₆ H ₁₁ O ₄ (m/z): 267,0657 [M-H] ⁻ Izmerjen (m/z): 267,0651

**4.6. SINTEZA
KISLINE (10)**

3-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)BENZOJSKE



Reakcijsko zmes fenilocetne kisline (0,408 g, 3,0 mmol), 3-karboksibenzaldehida (0,450 g, 3,0 mmol), kalijevega acetata (0,392 g, 4,0 mmol) in anhidrida ocetne kisline (1,2 mL, 12,79 mmol) smo segrevali čez noč (~ 17 ur) pri 130 °C. Nato smo ohladili na sobno temperaturo, dodali vodo (25 mL) ter dodajali 3M NaOH do pH = 12. Naalkaljeno raztopino smo ekstrahirali z diklorometanom (2x30 mL) in vodno fazo nakisali s koncentrirano HCl do pH = 1. Produkt se je pri tem izboril in smo ga odfiltrirali z odsesavanjem. (30)

3-(2-KARBOKSI-2-FENILVINIL)BENZOJSKA KISLINA	
Molekulska masa:	268,268
Izgled:	Bela amorfna snov
Rf:	0,21 (MF: DKM/MeOH = 9/1)
Tališče:	> 300 °C
Izkoristek:	66 %
¹H – NMR (400 MHz, DMSO-d₆):	δ = 12,86 (rs, 2H, COOH); 7,81 (s, 1H, CH); 7,77 (td, 1H, J ₁ = 1,5 Hz, J ₂ = 7,5 Hz; Ar-H); 7,65 (t, 1H, J = 1,6 Hz; Ar-H); 7,33-7,40 (m, 3H, Ar-H); 7,26-7,32 (m, 2H, Ar-H); 7,14-7,18 (m, 2H, Ar-H) ppm.
¹³C - NMR (400 MHz, DMSO-d₆):	δ = 168,13; 166,73; 137,99; 135,79; 134,83; 134,45; 134,12; 130,84; 129,43; 129,37; 128,80; 128,50; 127,68; 125,93 ppm.
HPLC:	t _R : 9,951 min
ESI-HRMS:	Izračunana za C ₁₆ H ₁₁ O ₄ (m/z): 267,0657 [M-H] ⁻ Izmerjen (m/z): 267,0651

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

Končni spojini **5** in **8** smo sintetizirali v treh stopnjah. Najprej smo izvedli reakcijo Williamsonove sinteze etra in tako dobili substituiran benzaldehid z zaščiteno karboksilno skupino (spojni **3** in **6**), ki smo jo v naslednjem koraku odščitili v bazičnih pogojih ter v metanolu kot topilu in nukleofilu (spojni **4** in **7**). S tako substituiranim benzaldehidom smo vstopili v Perkinovo reakcijo s fenilocetno kislino in dobili želeno 2,3-diarilpropenojsko kislino (spojni **5** in **8**).

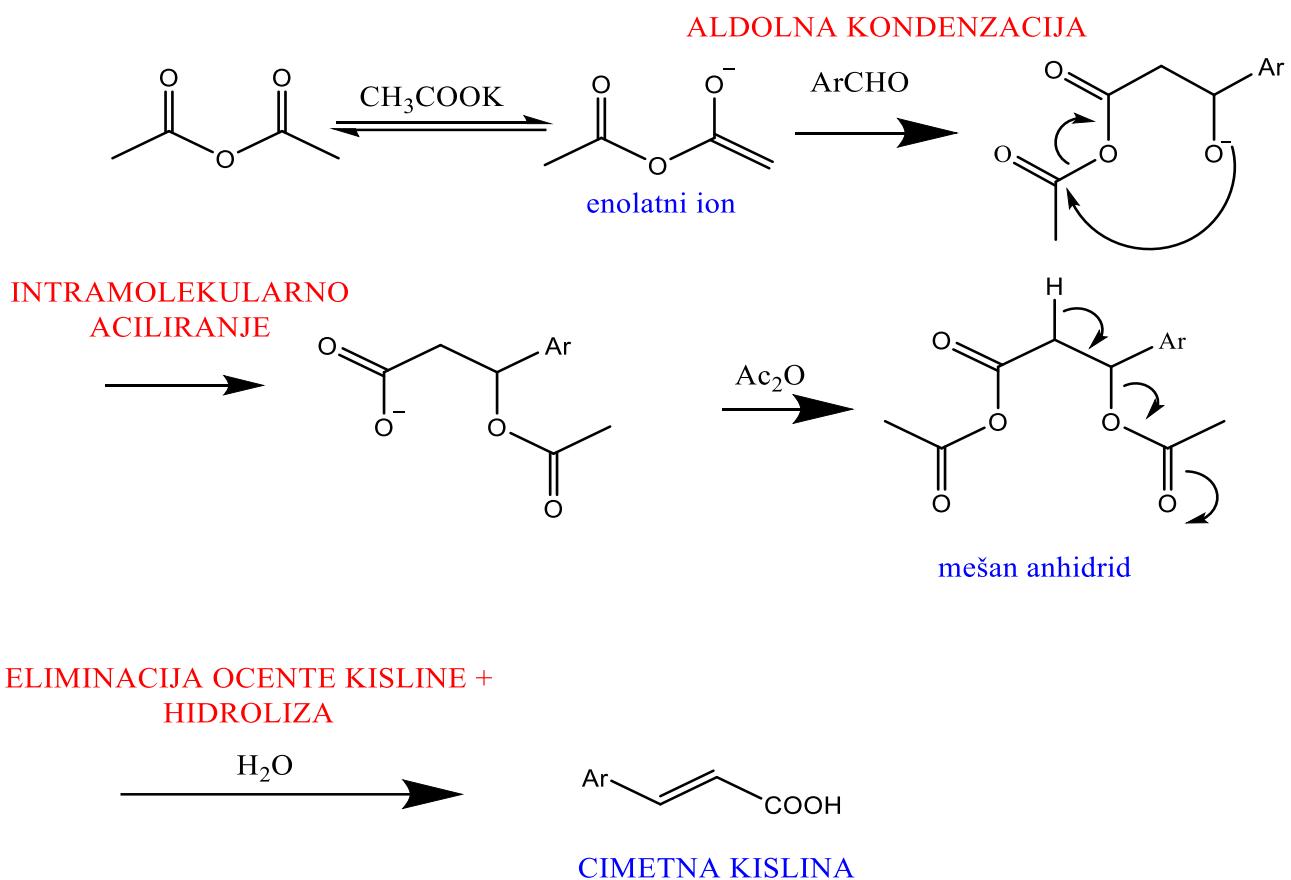
Po mehanizmu Perkinove reakcije smo sintetizirali tudi spojini **9** in **10**.

V sklopu magistrskega dela smo izvedli še reakcijo estrenja s sklopitvenim reagentom in dobili končno spojino **2**. Sinteza je potekala v dveh korakih. V prvi stopnji smo pripravili 1,3-dihidroksikanton (spojava **1**), pri čemer smo kljub navidezno enostavnemu reakciji naleteli na precej težav. Druga stopnja sinteze spojine **2** pa je obsegala pripravo estra med dobljenim ksantom in cimetno kislino ob prisotnosti baze (Et_3N) in sklopitvenega reagenta (BOP).

5.1.1. *Sinteza substituiranih derivatov cimetne kisline (Perkinova reakcija)*

Perkinova reakcija nam kot produkt daje načrtovano 2,3-diarilpropenojsko kislino. Gre za reakcijo med substituiranim benzaldehidom in fenilocetno kislino ob prisotnosti acetanhidrida in šibke baze (kalijev acetat, trietilamin). (31)

Najprej se iz anhidrida s pomočjo šibke baze tvori enolatni ion, ki skupaj z benzaldehidom vstopa v reakcijo aldolne kondenzacije. Temu sledi intamolekularno aciliranje, tvorba mešanega anhidrida, eliminacija ocetne kisline ter hidroliza do končnega produkta.
(31- 33)



Slika 14: Mehanizem Perkinove reakcije (povzeto po (31))

Kot že omenjeno, smo na ta način sintetizirali spojine **5**, **8**, **9** in **10**.

Veliko boljše izkoristke smo dobili pri spojinah **9** in **10**, saj je tu sinteza potekala le v enem koraku, kar nam je pri delu omogočalo manjše izgube. Poleg tega smo tu delali z manj kompleksnimi in že poznanimi spojinami.

Pri sintezi spojin **5** in **8** smo morali pred Perkinovo reakcijo izvesti še Williamsonovo sintezo etrov in odščito karboksilne skupine. Izkoristka končnih spojin sta bila precej nizka, za kar najdemo več razlogov. Sinteza je obsegala tri korake in smo tako izgubljali že pri posameznih reakcijah, kjer nismo dobili popolnoma čistih spojin in smo morali izvajati različne postopke čiščenja, izgubljali pa smo tudi pri prenosu spojin iz ene reakcije v drugo. Razlog je tudi to, da smo pri končni reakciji uporabljali veliko bolj kompleksen benzaldehid kot pa pri spojinah **9** in **10** in je tako prišlo do tvorbe stranskih produktov, kar smo lahko razbrali iz dodatnih lis na TPK ploščah. TPK analiza nam je pokazala tudi to, da reakcija ni v celoti potekla, saj so se v končni zmesi nahajali nezreagirani reaktanti.

Zaradi slabih izkoristkov končnih spojin, smo v reakcijo s fenilocetno kislino poskušali vstopati tudi z benzaldehidom z zaščiteno karboksilno skupino, a reakcija ni potekla.

5.1.2. Williamsonova sinteza etrov

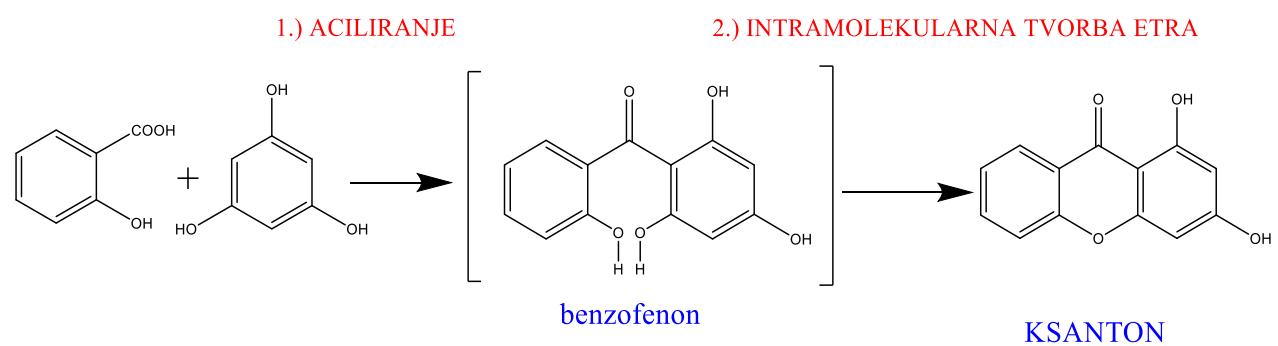
Po mehanizmu Williamsonove sinteze etrov smo sintetizirali spojini **3** in **6**. Mehanizem reakcije je bimolekularna nukleofilna substitucija (S_N2). Najprej poteče deprotonacija alkohola z bazo do alkoksidnega aniona, ki nato kot nukleofil reagira z benzilhalidnim derivatom. (33, 34)

Pri našem delu smo kot bazo uporabili kalijev karbonat, kot topilo pa aceton.

Nekoliko nižji izkoristek smo dobili pri spojini **6**, ker tu reakcija ni potekla do konca, kar smo razbrali iz TPK analize. Poleg tega pa smo dobili tudi nečist produkt in je tako do nekaj izgub prišlo tudi pri čiščenju s kolonsko kromatografijo.

5.1.3. Sinteza ksantona

Mehanizem sinteze ksantona obsega dve stopnji. Najprej s pomočjo Lewisove kisline kot katalizatorja poteče reakcija aciliranja med floroglucinolom in salicilno kislino, pri čemer se tvori intermediat benzofenon. Temu sledi ciklizacija, intramolekularna tvorba etra med hidroksilnima skupinama v intermediatu, in tako dobimo zaprt obroč ter s tem ustrezen ksanton. (35, 36)



Slika 15: Mehanizem sinteze ksantona (prirejeno po (36))

Pri sintezi spojine **1** smo za Lewisovo kislino uporabili SnCl_2 , reakcijo pa izvajali v mikrovalovki.

Kot že omenjeno, je bil izkoristek te reakcije zelo nizek. Po končani reakciji smo s TPK analizo ugotovili, da je precejšen del izhodnih spojin ostal nezreagiran, končni produkt pa zelo nečist, zato smo poskušali z različnimi pristopi optimizirati reakcijo:

- Različna molarna razmerja med reaktanti (salicilna kislina:floroglucinol: SnCl_2):
 - 1:1:1
 - 1:1:0,5
 - 1:1:0,2
- Dodatek topil:
 - acetonitril
 - etanol
 - voda (reakcija ni potekla)
 - dioksan (reakcija ni potekla)
- Različni pogoji (temperatura, moč, čas reakcije):
 - 140 °C, 200 W, 50 s
 - 140 °C, 100 W, 60 s
 - 140 °C, 50 W, 60 s

Za najugodnejše pogoje smo nato izbrali razmerje reaktantov 1:1:0,2, dodatek acetonitrila ter izvajanje reakcije 60 sekund pri 140 °C in 100 W, ki pa nam še vedno niso dali pričakovanih rezultatov.

K izredno nizki vrednosti izkoristka je pripomoglo tudi dvakratno čiščenje spojine. Najprej smo izvajali kolonsko kromatografijo, s katero pa se nismo uspeli znebiti salicilne kislino v produktu, zato smo dodatno opravili še kristalizacijo in tako prišli do končnega, čistega produkta.

5.1.4. Sinteza estra s sklopitvenim reagentom

Sklopitveni reagent smo uporabili za sintezo spojine **2**. Njegova vloga je aktivacija karboksilne skupine, kar omogoča nadaljnji potek reakcije z alkoholom, zmanjša potek stranskih reakcij, možnost racemizacije, vse to pa vodi do boljših izkoristkov reakcije. (39) V prvi stopnji reakcije torej poteče aktivacija karboksilne skupine, ki ji sledi nukleofilna substitucija z alkoholom preko tetraedričnega intermediata. (37)

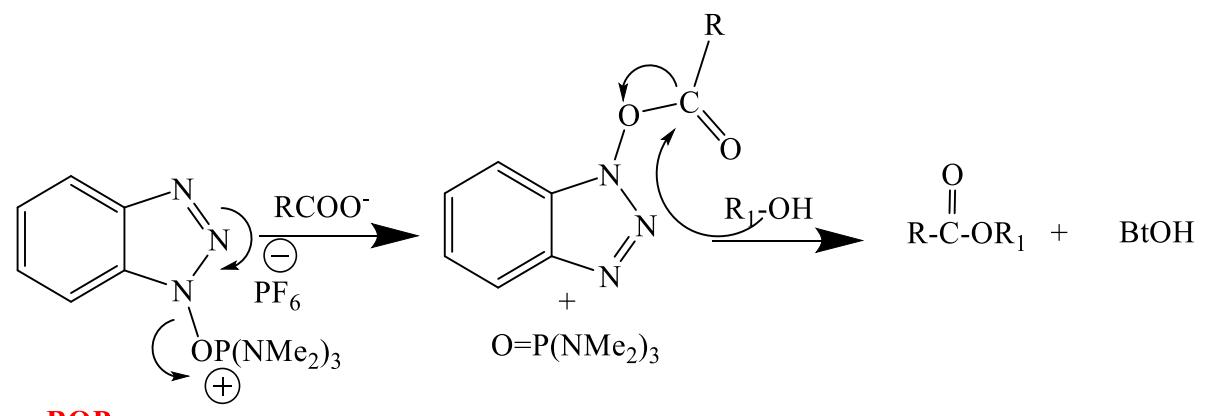
Pri sintezi spojine **2** smo kot sklopitveni reagent uporabili BOP.

➤ **BOP:**

BOP sodi v skupino fosfonijevih soli, za katere je značilna enostopenjska reakcija ter »in situ« tvorba aktiviranega estra. Pri »in situ« reakciji nastane intermediat, ki lahko reagira z različnimi nukleofili. V reakcijsko zmes dodamo Et₃N kot bazo, ki pretvori karboksilno skupino v anionsko obliko, ki je potrebna za ustrezen potek reakcije. (37, 38)

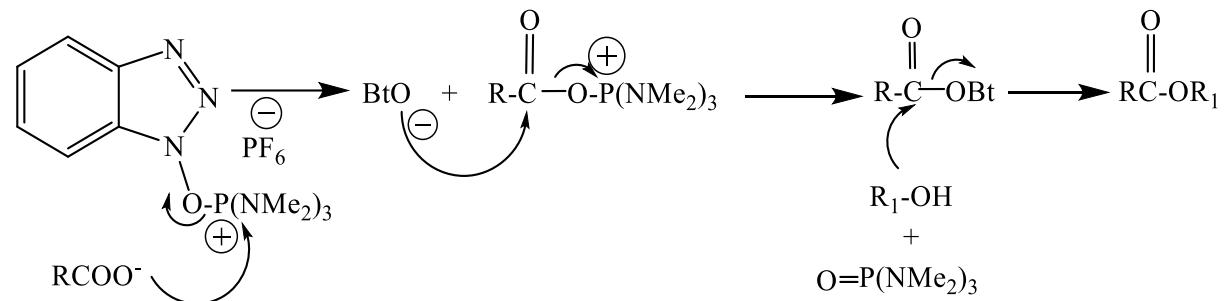
Pri aktivaciji z BOP reagentom sta možni dve poti.

1.)



BOP

2.)



Slika 16: Mehanizem reakcije z BOP reagentom (povzeto po (38))

5.2. REZULTATI TESTIRANJA

Sintetiziranim spojinam smo določili zaviralno delovanje na encim MurA iz *S. aureus* in rezultate podali kot rezidualno aktivnost v odstotkih (RA). Ta je definirana kot razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti testirane spojine in aktivnostjo encima brez prisotnosti testirane spojine.

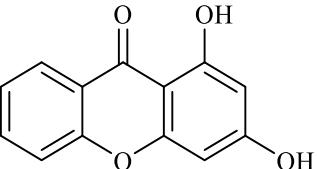
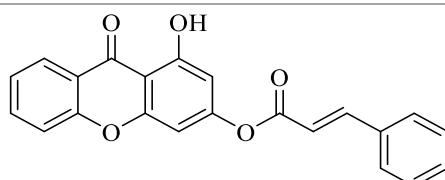
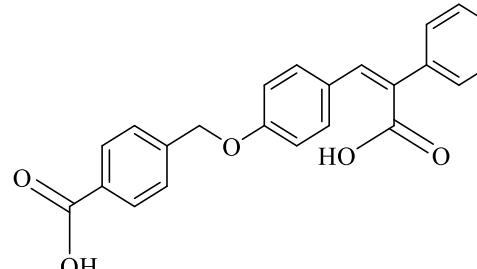
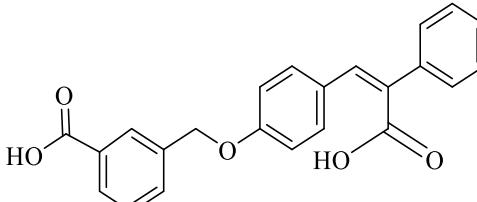
RA smo določali s pomočjo barvila malahit zeleno, ki s sproščenim fosfatom tvori obarvan kompleks. Bolj kot je spojina aktivna, manj fosfata se sprosti iz encima, manj je obarvanega kompleksa in nižja je RA vrednost.

IC_{50} vrednost je bilo smiselno določiti le spojini **5**, ker je samo ta imela RA nižjo od 50 %. IC_{50} vrednost predstavlja koncentracijo spojine, pri kateri je RA 50 %. Določili smo jo tako, da smo RA vrednosti določili sedmim različnim koncentracijam spojine in nato na podlagi tega izračunali IC_{50} .

Spojine smo ovrednotili tudi glede na protibakterijsko delovanje, tako da smo jim določili MIC vrednosti. To je najnižja koncentracija spojine, pri kateri je rast bakterije še zavirana. MIC smo določali na sevih *S. aureus*, spojinama **5** in **8** pa še na MRSA.

5.2.1. Komentar testiranja na encimu MurA

Preglednica I: Rezultati testiranih spojin, podani kot RA in IC₅₀ vrednosti

STRUKTURNA FORMULA IN OZNAKA SPOJINE	RA [%] pri 100 µM in IC ₅₀ [µM] MurA
 1	102
 2	75
 5	8 IC ₅₀ = 15
 8	43

Na encimu MurA smo testirali spojine **1**, **2**, **5** in **8**, pri čem se je izkazalo da spojina **1** nima zaviralnega učinka ($RA > 100\%$). Zanemarljivo delovanje ima tudi spojina **2** ($RA = 75\%$), kar je verjetno posledica tega, da v svoji strukturi vsebuje neaktivno spojino **1**, sklepamo pa lahko tudi, da je cimetni del spojine tisti, ki ji daje šibko zaviralno delovanje. Nekoliko bolj obetavne rezultate smo dobili pri spojini **8** ($RA = 43\%$), vendar še vedno ne dovolj dobre, tako da IC_{50} vrednosti nismo določali. Vendar pa ne moremo z gotovostjo trditi, da spojina ne deluje zaviralno, saj smo pri večkratnem testiranju te spojine dobili precej različne rezultate, od zelo dobrih do zelo slabih, zato bi bilo smiselno spojino resintetizirati in ponoviti testiranje. Možno je, da so bile pri spojini **8** prisotne nečistoče, ki so ovirale testiranje in posledično vplivale na raznolikost rezultatov.

Najmočnejše delovanje ima spojina **5** ($RA = 8\%$), zato smo tu določili tudi IC_{50} vrednost ($IC_{50} = 15 \mu M$).

Spojini **5** in **8** sta strukturna analoga že znanega zaviralca encima MurA, ki smo mu zamenjali 3-metil-1*H*-1,2,4-triazol-5-diolni fragment s substituiranim fenilnim obročem in preverjali, kako to vpliva na delovanje. Izkazalo se je, da se zaviralno delovanje ravno tako ohrani, če je na fenilni obroč karboksilna skupina vezana na *para* mestu. Ne moremo pa trditi, da je pozicija COOH skupine na tem mestu bistvena za delovanje, saj kot že omenjeno, rezultati testiranja spojine **8** s pozicijo OH skupine na *meta* mestu niso najbolj verodostojni. Možno pa je, da *meta* pozicija sterično ovira vezavo molekule v aktivno mesto encima in je zato delovanje zmanjšano.

Potrdili smo tudi, da 3-metil-1*H*-1,2,4-triazol-5-diolni fragment ni ključen za zaviralno delovanje na encimu MurA.

5.2.2. Komentar protibakterijskega testiranja

Preglednica II: Rezultati protibakterijskega testiranja spojin, podani kot MIC vrednosti

SPOJINA	MIC [$\mu\text{g/mL}$]	
	<i>S. Aureus</i>	MRSA
<u>5</u>	64	8
<u>8</u>	128	16
<u>9</u>	16	/
<u>10</u>	32	/

Spojine smo ovrednotili tudi glede na protibakterijsko delovanje z določitvijo vrednosti MIC.

Iz rezultatov vidimo, da sintetizirane spojine, ki so bile testirane na *S. aureus* (5, 9, 10), izkazujejo protibakterijsko delovanje, izjema je le spojina 8, ki ima tako MBC kot MIC vrednosti višji od 128 $\mu\text{g/mL}$.

Delovanje je potrjeno tudi na meticilin odpornem *S. aureus* (MRSA), in sicer za spojini 5 in 8.

6. ZAKLJUČEK

Cimetna kislina in njeni derivati imajo zelo širok spekter bioloških učinkov, med katere sodi tudi protibakterijsko delovanje, ki nas je pri delu najbolj zanimalo. Pojav rezistence pri že poznanih in uporabljenih protibakterijskih učinkovinah je namreč vse večji in zato je večja tudi težnja po razvoju novih učinkovin te skupine z drugačnim mehanizmom delovanja. V okviru magistrske naloge smo skušali sintetizirati nove derivate cimetne kisline, ki bi s svojim delovanjem ovirali biosintezo peptidoglikana preko zaviranja delovanja encima MurA.

Uspelo nam je sintetizirati nekaj derivatov cimetne kisline in ovrednotiti njihovo delovanje. Za najbolj učinkovito se je izkazala spojina **5**, ki je strukturni analog že znanega zaviralca encima MurA, ki smo mu 3-metil-1*H*-1,2,4-triazol-5-tiolni fragment nadomestili s fenilnim obročem. Spojina je kljub temu ohranila zaviralno delovanje, torej lahko sklepamo, da 3-metil-1*H*-1,2,4-triazol-5-tiolni fragment ni nujno potreben za delovanje spojine.

Ostali sintetizirani derivati so imeli zanemarljivo zaviralno delovanje na encimu MurA, so pa vsi, z izjemo spojine **8**, izkazovali protibakterijsko delovanje.

V prihodnje bi lahko izvedli še resintezo spojine **8**, saj smo pri večkratnem ponavljanju testiranja protibakterijskega delovanja, dobili različne rezultate in je tako ne moremo še čisto izključiti kot potencialne protibakterijske učinkovine.

Potrdili smo, da derivati cimetne kisline delujejo kot zaviralcii encima MurA, ki izkazujejo tudi protibakterijsko delovanje. Glede na dobljene rezultate pri tej magistrski nalogi je smiselna nadaljna optimizacija in razvoj novih derivatov cimetne kisline kot močnih zaviralcev MurA s protibakterijskim delovanjem.

7. LITERATURA

1. Sova M.: Biološki učinki derivatov cimetne kisline, Farmacevtski vestnik, 63, 2012: 178 – 180
2. Lavrenčič A., Stibilj V., Derivati cimetne kisline in lignin: vsebnost, struktura in lastnosti, Zb .Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani, Kmetijstvo, Zootehnika; 74, 1999: 19 – 21
3. Saavedra L. M., Ruiz D., Romanelli G.P., Duchowicz P. R.: Quantitative Structure-Antifungal Activity Relationships for cinnamate derivatives, Ecotoxicology and Environmental Safety, 122, 2015: 521 – 522
4. Verbanac D., Jain S. C., Jain N., Chand M., Paljetak H. Č., Matijašić M., Perić M., Stepanić V., Saso L.: An efficient and convenient microwave-assisted chemical synthesis of (thio)xanthones with additional in vitro and in silico characterization, Bioorganic & Medicinal Chemistry, 20, 2012: 3180 – 3184
5. Yang Z.-M., Huang J., Qin J.-K., Dai Z.-K., Lan W.-L., Su G.-F., Tang H., Yang F.: Design, synthesis and biological evaluation of novel 1-hydroxyl-3aminoalkoxy xanthone derivatives as potent anticancer agents, European Journal of Medicinal Chemistry, 85, 2014: 487 – 488
6. Williams D. A., Lemke T. L.: Foye`s Principles of Medicinal Chemistry, 5th Editon, Lippincot Williams&Wilkins, A Wolters Kluwer Company, Philadelphia 2002: 819 – 832
7. Rang H. P., Dale M. M., Ritter J. M., Moore P. K.: Pharmacology. 5th Edition, Churchill Livingstone, 2003: 623 – 627, 635 – 649
8. Black J. G.: Microbiology Principles and Exploration. 5th Edition, John Wiley&Sons, Inc., 2002: 76 – 80
9. Scheffers D.-J., Pinho M. G.: Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies, Microbiology and Molecular Biology Reviews 69; 2005: 585 – 588
10. Madigan M. T., Martinko J. M., Parker J.: Brock Biology of microorganisms. 10th Edition, Prentice Hall, 2003: 58 – 59; 75 – 81; 141 – 142
11. http://www.weallhaveuniquebrains.com/startng_material/intro_to_bacteria.html: dostopano 4.8.2016

12. www.dreamstime.com/stock-illustration-gram-positive-gram-negative-bacteria-difference-bacterial-image45337024.html: dostopano: 3.8.2016
13. http://ictwiki.iitk.ernet.in/wiki/index.php/PEPTIDOGLYCAN:_STRUCTURE_%26_FUNCTIONS.html: dostopano: 4.8.2016
14. Barreteau H., Kovač A., Boniface A., Sova M., Gobec S., Blanot D.: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis, Federation of European Microbiological Societies, 32, 2008: 168 – 180
15. De Pedro MA: Peptidoglycan (Murein), CBM `Severo Ochoa` CSIC-UAM, Madrid, 2016: 6 – 10
16. Vollmer W., Bertsche U.: Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 2008: 1718 – 1719
17. Hrast M., Sosič I., Šink R., Gobec S.: Inhibitors of the peptidoglycan biosynthesis enzymes MurA-F, *Bioorganic Chemistry*, 55, 2014: 2 – 5, 12 – 13
18. Zeeby A., Sanschagrin F., Levesque R. C.: Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors, *Molecular Microbiology*, 47, 2003: 1 – 7
19. Smith C. A.: Structure, Function and Dynamics in the mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases, *J. Mol. Biol.*, 362, 2006: 640 – 646
20. Engel H., Gutierrez-Fernandez J., Flückiger C., Martinez-Ripoll M., Mühlmann K., Hermoso J. A., Hilty M., Hathaway L. J.: Heteroresistance to Fosfomycin is Predominant in *Streptococcus pneumoniae* and Depends on the MurA1 Gene, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 57, 2013: 2806
21. Baum E. Z., Montenegro D. A., Licata L., Turchi I., Webb G. C., Foleno B. D., Bush K.: Identification and Characterization of New Inhibitors of the *Escherichia coli* MurA Enzyme, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 45, 2001: 3182 – 3183
22. Rožman K., Lešnik S., Brus B., Hrast M., Sova M., Patin D., Barreteau H., Konc J., Janežič D., Gobec S.: Discovery of new MurA inhibitors using induced-fit simulation and docking, *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 2016, rokopis v recenziji
23. Lewis H. W., Moody C.J.: Experimental Organic Chemistry: Principles and Practice (Illustrated ed.), WileyBlackwell, 1989: 159 – 173

24. http://www.chemistryviews.org/details/education/2040151/Tips_and_Tricks_for_the_Lab_Column_Packing.html: dostopano 13.4.2016
25. <http://www.chemguide.co.uk/analysis/chromatography/hplc.html>: dostopano 13.4.2016
26. Gerber F., Krummen M., Potgeter H., Roth A., Siffrin C., Spoendlin C.: Practical aspects of fast reversed-phase high-performance liquid chromatography using 3 μ m particle packed columns and monolithic columns in pharmaceutical development and production working under current good manufacturing practice, *Journal of Chromatography A*, 1036 (2), 2004: 127–133
27. <http://chem.ch.huji.ac.il/nmr/whatisnmr/whatisnmr.html>: dostopano 13.4.2016
28. http://student.pfmb.uni-mb.si/~puntar/masna_spektroskopija.html: dostopano 13.4.2016
29. Lanzetta P. A., Alvarez L. J., Reinach P. S., Candia O. A.: An Improved Assay for nanomole Amounts of Inorganic Phosphate, *Analytical Biochemistry*, 100, 1979: 95 – 9
30. Gazvoda M., Beranič N., Turk S., Burja B., Kočevar M., Rižner L. T., Gobec S., Polanc S.: 2,3-Diarylpropenoic acids as selective non-steroidal inhibitors of type-5 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (AKR1C3), *European Journal of Medicinal Chemistry*, 62, 2013: 89 – 94
31. Rosen T.: The Perkin Reaction, Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering, from *Comprehensive Organic Synthesis*, 2, 1991: 395 – 397
32. Edward M., Rourk P. M., Riby P. G., Mendham A. P.: Not quite the last word on the Perkin reaction, *Tetrahedron*, 70, 2014: 7245 – 7250
33. Solomons T.W.G., Fryhle C.B.: *Organic Chemistry*. 9th Edition, John Wiley&Sons Inc., 2007: 489 – 490
34. Smith M.B.: *March's Advanced Organic Chemistry*. 7th Edition, John Wiley&Sons, 2013: 459 – 487
35. Genovese S., Fiorito S., Specchiulli M. C., Taddeo V. A., Epifano F.: Microwave-assisted synthesis of xanthones promoted by ytterbium triflate, *Tetrahedron Letters*, 2015: 1 – 3
36. Barton D. H. R., Scott A. I., The Constitutions of Geodin and Erdin, *Journal of the Chemical Society*, 1958: 1767 – 1769

37. Joullie M. M., Lassen K. M.: Evolution of amid bond formation, ARKIVOC, 2010 (viii): 195-198, 218 – 221
38. Montalbetti C. A. G., Falque V.: Amide bond formation and peptide coupling, Tetrahedron, 61, 2005: 10832 – 10833, 1039 – 1084
39. Tišler M., Organska kemija, Državna založba slovenije, Ljubljana, 1988: 221 – 227