

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DIANA SKOK

**SINTEZA IN VREDNOTENJE KINAZOLINONSKIH DERIVATOV
KOT ZAVIRALCEV ENCIMA MUR A**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

DIANA SKOK

**SINTEZA IN VREDNOTENJE KINAZOLINONSKIH DERIVATOV
KOT ZAVIRALCEV ENCIMA MUR A**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF QUINAZOLINONE
DERIVATIVES AS INHIBITORS OF MURA ENZYME**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM
FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko nalogo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm.. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani in Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Biokemično testiranje je bilo prav tako izvedeno na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Testiranje protibakterijskega delovanja spojin pa je bilo izvedeno v Warwicku.

Zahvala

Zahvaljujem se svojemu mentorju doc. dr. Mateju Sovi mag. farm. za pridobljeno znanje ter nasvete in strokovno pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Iskrena hvala tudi Kaji Rožman za vse nasvete in pomoč pri praktičnem delu.

Rada bi se zahvalila tudi najbližjim, ki so mi tekom celotnega študija stali ob strani in me spodbujali ter prijateljem, ki so mi polepšali študentska leta.

Izjava

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

Diana Skok

Ljubljana, 2017

VSEBINA

1	UVOD.....	1
1.1	Protibakterijske učinkovine in rezistenca	1
1.1.1	Pregled protibakterijskih učinkovin	1
1.1.2	Razvoj odpornosti na protibakterijske učinkovine	3
1.2	Bakterijska celična stena.....	4
1.2.1	Celična stena gram pozitivnih bakterij	4
1.2.2	Celična stena gram negativnih bakterij	5
1.3	Bakterijski peptidoglikan	6
1.3.1	Sinteza peptidoglikana.....	7
1.4	Encim mura.....	10
1.5	Zaviralci encima mura	11
1.6	Kinazolinoni.....	14
1.6.1	Primer protibakterijskega delovanja kinazolinonov	15
2	NAMEN DELA	16
3	MATERIALI IN METODE	18
3.1	Materiali.....	18
3.2	Kromatografske metode.....	18
3.3	Spektroskopske metode	19
3.4	Določanje temperature tališča spojin	20
3.5	Risanje in poimenovanje struktur	20
3.6	Biokemično testiranje	20
3.7	Protibakterijsko delovanje	21
4	EKSPERIMENTALNO DELO	22
4.1	Sinteza etrov (spojine 1 , 2 , 4 , 5 in 6)	22

4.2	Sinteza 2-substituiranih kinazolinonov.....	24
4.3	Sinteza metil 2-(2-(furan-2-il)-4-oksokinazolin-3(4 <i>H</i>)-il)acetata (29).....	42
4.4	Sinteza 2-(2-(furan-2-il)-4-okso-kinazolin-3(4 <i>H</i>)-il)etanojske kisline (30).....	43
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	45
5.1	Komentar sinteznih postopkov	45
5.1.1	Sinteza etrov 1, 2, 3, 4, 5 in 6	45
5.1.2	Sinteza 2-substituiranih derivatov kinazolinona.....	46
5.1.3	Sinteza spojine 29	47
5.1.4	Sinteza spojine 30	48
5.2	Testiranje	49
5.2.1	Rezultati biokemičnega testiranja.....	49
5.2.2	Komentar rezultatov protibakterijskega delovanja.....	53
6	SKLEP.....	54
7	LITERATURA	55

KAZALO SLIK

Slika 1: Celična stena G ⁺ in G ⁻ bakterij; povzeto po (8).....	5
Slika 2: Zgradba peptidoglikana; povzeto po (5, 11).....	6
Slika 3: Biosinteza peptidoglikana.....	9
Slika 4: Reakcija, ki so katalizira MurA; povzeto po (14)	10
Slika 5: A-odprta konformacija MurA, B-zaprta konformacija MurA; povzeto po (10) ...	11
Slika 6: Struktura fosfomicina; povzeto po (16).....	11
Slika 7: Strukture zaviralcev MurA; povzeto po (15,16).....	14
Slika 8: Kinazolinonski derivati s protibakterijskim delovanjem; povzeto po (19)	15
Slika 9: Struktura 3-benzil-2-(4-klorofenil) kinazolin-4(3H)-ona; povzeto po (21)	15
Slika 10: Mehanizem Williamsove sinteze etrov; povzeto po (24)	45
Slika 11: Mehanizem aerobne oksidacije v DMSO-ju; povzeto po (25).....	46
Slika 12: Mehanizem <i>N</i> -alkiliranja kinazolinona; povzeto po (26)	48
Slika 13: Mehanizem hidrolize estra v alkalnem; povzeto po (27)	48

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Prikaz uporabljenih aldehydov in benzil halidov	23
Preglednica II: Prikaz uporabljenih aldehydov pri sintezi 2-substituiranih kinazolinonov	24
Preglednica III: Prikaz rezultatov biokemičnega testiranja podanih kot RA vrednosti [%] ali IC ₅₀ vrednost [μM] in rezultati protibakterijskega delovanja podani kot MIC [μg/ml].	50

POVZETEK

Zaradi povečanega razvoja odpornosti bakterij na obstoječe protibakterijske učinkovine predstavlja načrtovanje in sinteza učinkovin z novimi mehanizmi protibakterijskega delovanja eno izmed pomembnih področij raziskovanja. Encimi, ki sodelujejo pri sintezi peptidoglikana, ključne komponente bakterijske celične stene, predstavljajo interesantne tarče za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Enega izmed tarčnih encimov predstavlja encim MurA, ki deluje kot UDP-GlcNAc enolpiruvil transferaza in ima pomembno nalogo v začetni stopnji biosinteze peptidoglikana.

Edini zaviralec encima MurA, ki se klinično že uporablja, je fosfomicin, vendar pa je zaradi pojava odpornosti bakterij na fosfomicin potreben razvoj novih strukturno drugačnih zaviralcev encima MurA.

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali in ovrednotili potencialne zaviralce encima MurA s kinazolinonskim skeletom. Pri sintezi derivatov smo izhajali iz spojine s kinazolinonskim skeletom, ki je bila odkrita s pomočjo virtualnega rešetanja in izkazuje zaviralno delovanje na encim MurA iz sevov *E. coli* z določeno vrednostjo $IC_{50} = 82 \mu M$. Sintetizirali smo derivate z različnimi substituenti na mestu 2, substituirali pa smo tudi dušikov atom na mestu 3 kinazolinonskega obroča. Sintetiziranim spojinam smo ovrednotili zaviralno delovanje na izoliranem encimu MurA iz *E. coli* in *S. aureus* ter protibakterijsko delovanje na sevih *E. coli* in *S. aureus*.

Izkazalo se je, da encim MurA iz *E. coli* najmočneje zavirajo derivati, ki imajo na mestu 2 kinazolinonskega skeleta pripet substituiran furan ali na *para* mestu substituiran 3-benziloksifenilni fragment. Najmočnejši zaviralec encima je spojina **22** z IC_{50} vrednostjo $19 \mu M$. Protibakterijskega delovanja pa ta spojina ni izkazovala. Med derivati 2-furan-kinazolinonov, je spojina **16** izkazala najmočnejše zaviralno delovanje z IC_{50} vrednostjo $47 \mu M$ in protibakterijskim delovanjem z minimalno inhibitorno koncentracijo $1 \mu g/ml$ proti *E. coli* in $8 \mu g/ml$ proti *S. aureus*.

Ugotovili smo, da 2-substituirani derivati kinazolinonov izkazujejo zaviralno delovanje na encimu MurA in lahko služijo kot izhodišče za nadaljnje optimizacije, s katerimi bi še izboljšali zaviralno in dosegli tudi protibakterijsko delovanje.

Ključne besede: encim, MurA, kinazolinon, peptidoglikan, protibakterijsko delovanje

ABSTRACT

Due to increased development of resistant bacteria to existing antibacterial agents, the design and synthesis of agents with novel mechanisms of action is one of the important areas of research. The enzymes involved in the synthesis of peptidoglycan, a key component of bacterial cell wall, represent interesting targets for the development of novel antibacterial agents. One of the target enzymes represent the enzyme MurA, which acts as UDP-GlcNAc enolpyruvyl transferase and plays an important role in peptidoglycan biosynthesis.

The only inhibitor of MurA enzyme that has been used in the clinics is fosfomicin, however, due to occurrence of bacterial resistance to fosfomicin, the development of new structurally diverse MurA inhibitors, is needed.

Within this master's thesis, we synthesized and evaluated the potential inhibitors of the MurA enzyme with the quinazolinone scaffold. The synthesis was based on a compound with a quinazolinone scaffold discovered by virtual screening that inhibited the activity of the MurA enzyme from *E. coli* with an IC₅₀ value of 82 μM. We synthesized the derivatives with different substituents at the position 2 and furthermore, we also substituted the nitrogen atom at the position 3 of the quinazolinone ring. The synthesized compounds were then evaluated for their inhibitory activity on the isolated MurA enzyme from *E. coli* and *S. aureus* and antibacterial activity against strains *E. coli* and *S. aureus*.

We found out that the MurA enzyme from *E. coli* is significantly inhibited by derivatives with the attached substituted furan ring or a *para*-substituted 3-benzyloxyphenyl fragment at the 2-position of the quinazolinone scaffold. The most potent enzyme inhibitor is derivate **22** with an IC₅₀ value of 19 μM, however no antibacterial activity was observed for this derivate. Among the derivatives of 2-furan-quinazolinones, derivate **16** exhibited the most potent inhibitory activity with an IC₅₀ value of 47 μM and also some antibacterial activity with minimal inhibitory concentration against *E. coli* of 1 μg/ml, and against *S. aureus* of 8 μg/ml.

We discovered that the 2-substituted quinazolinone derivatives exhibit inhibitory activities on the MurA enzyme and can serve as a starting point for further optimization to improve the inhibitory activity and also obtain antibacterial activity.

Key words: enzyme, MurA, quinazolinone, peptidoglycan, antibacterial activity

SEZNAM OKRAJŠAV

Ac	acetil
ADP	adenozin difosfat
Ala	alanin
A ₂ pm	diaminopimelinska kislina
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	asparaginska kislina
ATP	adenozin trifosfat
Cys	cistein
δ	kemijski premik
DMF	<i>N, N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DMSO- <i>d</i> ₆	devteriran dimetilsulfoksid (topilo pri NMR)
DNA	deoksiiribonukleinska kislina
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ESI-HMRS	masna spektrometrija z elektrorazpršilno inonizacijo
G-	gram negativne bakterije
G+	gram pozitivne bakterije
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
GlmM	fosfoglukozamin mutaza
GlmS	glukozamin-6-fosfat sintaza
GlmU	glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza in <i>N</i> -acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferaza
Glu	glutaminska kislina
His	histidin
HMRS	masna spektrometrija visoke ločljivosti
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
Hz	Hertz
IC ₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
Lys	lizin

M	molarnost (mol/L)
MF	mobilna faza
mDAP	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
MBC	minimalna baktericidna koncentracija
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MraY	UDP- <i>N</i> -acetilmuramil-pentapeptid fosfotransferaza
MRSA	proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	masna spektrometrija
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozaminolpiruvil 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-Lsy ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat-L-Ala-D-Glu- <i>mezo</i> A ₂ pm: D-Ala-D-Ala ligaza
MurG	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin- <i>N</i> -acetilmuramil-pentapeptid-pirofosforil-udekaprenol <i>N</i> -acetilglukozamin transferaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NMR	jedrska magnetna resonanca
PEP	fosfoenolpiruvat
RA	rezidualna aktivnost
Rf	retencijski faktor
S. Aureus	<i>Staphylococcus aureus</i>
Ser	serin
TFA	trifluorocetna kislina (topilo pri NMR)
TMS	tetrametilsilan
TLC	tankoplastna kromatografija
Trp	triptofan
UTP	uridintrifosfat
UDP	uridindifosfat
UMP	uridinmonofosfat
Val	valin

1 UVOD

1.1 PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE IN REZISTENCA

Za zdravljenje bakterijskih okužb uporabljamo učinkovine, ki so lahko naravnega ali sinteznega izvora. Večina antibiotikov, ki jih danes uporabljamo, so sicer polysintezni derivati naravnih protibakterijskih učinkovin, ki jih proizvajajo in izločajo različne bakterije in glive. V skupino sinteznih protibakterijskih učinkovin pa spadajo tiste, ki jih v naravi ne srečamo, vendar so načrtovane tako, da izkazujejo protibakterijsko delovanje (1). Bistvo protibakterijskega delovanja je, da učinkovine delujejo zoper bakterije, hkrati pa ne škodujejo organizmu gostitelja. Selektivna toksičnost protibakterijskih učinkovin temelji na zaviranju biosinteze celične stene, ki v celicah sesalcev ni prisotna, in pa prek zaviranja encimskih reakcij, ki niso značilne za celice gostitelja. Lahko pa zaviralno delujejo tudi na encime, ki so sicer značilni za sesalske celice, vendar se od bakterijskih strukturno razlikujejo (2).

Protibakterijske učinkovine imajo lahko bakteriostatični ali baktericidni. Če delujejo bakteriostatično, to pomeni, da s svojim delovanjem preprečujejo nadaljnjo delitev in rast bakterije, vendar pa bakterije ne ubijejo direktno. Take učinkovine niso priporočljive za uporabo pri ljudeh, ki imajo oslabiljen imunski sistem, saj igra ta glavno vlogo pri odstranitvi bakterij iz organizma. Na tak način delujejo: sulfonamidi, kinoloni, tetraciklini, makrolidi. Protibakterijske učinkovine, ki imajo baktericidni učinek, pa s svojim mehanizmom delovanja povzročijo direktno smrt bakterij. V to skupino spadajo betalaktamski antibiotiki, vankomicin, aminoglikozidi, valinomicin, gramicidin A in daptomicin (1, 3).

1.1.1 Pregled protibakterijskih učinkovin

Protibakterijske učinkovine glede na način delovanja razdelimo na pet skupin.

Poznamo protibakterijske učinkovine, ki delujejo tako, da posnemajo naravni substrat določenega encima, namesto njega interagirajo z encimom in tako zaustavijo metabolizem celic. Tak primer antimetabolitov so sulfonamidi, ki s svojo strukturo posnemajo *p*-aminobenzojsko kislino (PABA) in s tem zavirajo delovanje dihidropteroat sintaze. S tem je onemogočena sinteza tetrahidrofolata, ki je kot kofaktor pomemben pri sintezi

pirimidinskih in purinskih baz. Posledično se biosinteza DNA ustavi in bakterijska celica odmre, saj ni sposobna nadaljnje delitve. Sinergistično s sulfonamidi deluje trimetoprim, ki zavira delovanje dihidrofolat reduktaze in tako še dodatno zaustavi sintezo folne kisline. Medtem ko sulfonamidi delujejo na encim, ki je značilen samo za bakterijske celice, ki folno kislino pridelajo same, pa trimetoprim deluje na encim, ki je prisoten tudi v celicah gostitelja, vendar ima večjo afiniteto do bakterijskega encima. Uporabljajo se za zdravljenje infekcij urinarnega in gastrointestinalnega trakta (1, 2, 3).

Učinkovine iz skupine kinolonov in fluorokinolonov delujejo proti bakterijskim okužbam tako, da stabilizirajo kompleks med bakterijsko DNA in topoizomerazo IV oz. DNA-girazo ter tako zavirajo transkripcijo, replikacijo in zvijanje bakterijske DNA. Topoizomeraza IV in DNA-giraza sta topoizomerazi tipa II. Ta se sicer nahaja tudi v sesalskih celicah, vendar se strukturno razlikuje od bakterijske, kar omogoča selektivno delovanje kinolonov. Poznamo več generacij kinolonov, ki delujejo proti G⁺, G⁻ bakterijam in tudi anaerobnim bakterijam (1, 2, 3).

Najboljšo selektivno toksičnost imajo protibakterijske učinkovine, ki zavirajo biosintezo peptidoglikana – glavne komponente celične stene, saj je celična stena značilna samo za bakterijske celice ne pa tudi za celice sesalcev. Učinkovine, ki delujejo na tak način spadajo v skupino betalaktamskih antibiotikov (penicilini, cefalosporini, karbapenemi in monobaktami) in glikopeptidov (vankomicin). Betalaktamski antibiotiki so mimetiki D-Ala-D-Ala terminalnega dela pentapeptida in delujejo kot ireverzibilni zaviralci transpeptidaze. Transpeptidazo acilirajo in tako onemogočijo tvorbo peptidnih vezi med pentapeptidi osnovnih verig peptidoglikana. Za peniciline in cefalosporine je značilen širok spekter delovanja. Vankomicin zavira sintezo peptidoglikana na drugačen način kot betalaktamski antibiotiki. S svojo strukturo deluje kot »umetni receptor« za D-Ala-D-Ala-L-Lys ostanek pentapeptida ter tako prepreči prečno premreženje peptidoglikana. Deluje samo proti G⁺ bakterijam, saj zaradi svoje velike strukture ne more prehajati skozi zunanjo membrano G⁻ celic (1, 2, 3).

Zaviranje sinteze proteinov bakterij je še eden od načinov delovanja protibakterijskih učinkovin. V to skupino spadajo učinkovine, ki tvorijo različne interakcije s 30S ali 50S podenoto ribosoma in tako na različnih stopnjah preprečijo izgradnjo funkcionalnih proteinov. Tetraciklini in aminoglikozidi se vežejo na 30S podenoto, medtem ko se makrolidni antibiotiki, kloramfenikol in oksazolidinoni vežejo na 50S podenoto ribosoma. Za tetracikline je značilno, da delujejo proti G⁺ in G⁻ bakterijam. Makrolidi in

oksazolidinoni delujejo bolj na G+ bakterije in manj na G-, medtem ko so aminoglikozidi bolj uspešni pri G- kot pri G+ bakterijah. Učinkovine selektivno delujejo na bakterijske ribosome, saj se ti strukturno razlikujejo od ribosomov evkariontskih celic (1, 2, 3).

Poznamo tudi učinkovine, ki delujejo tako, da tvorijo interakcije s celično membrano in na ta način povečajo njeno prepustnost. Valinomicin, gramicidin A in daptomicin so predstavniki te skupine. V celični membrani delujejo kot ionofori in tako povzročijo nekontroliran pretok ionov iz celice, kar povzroči odmrtnje celice. Zaradi velikosti molekule daptomicin deluje zgolj na G+ bakterije, MRSA in VRE (1, 2).

1.1.2 Razvoj odpornosti na protibakterijske učinkovine

Bakterijske okužbe so že od nekdaj ogrožale življenja ljudi in živali, vendar se je z odkritjem prvih antibiotikov in začetkom njihove uporabe v medicini okrog leta 1940 povečalo preživetje, potek bolezni pa se je bistveno izboljšal. A kaj, ko se je skoraj istočasno z začetkom uporabe protibakterijskih učinkovin začela razvijati odpornost bakterij proti njim. V zadnjih letih je vedno več bakterij odpornih na do sedaj znane učinkovine, kar nas lahko hitro pripelje do stanja, ki je vladalo pred odkritjem protibakterijskih učinkovin. Bakterije so lahko naravno odporne na nekatere učinkovine (npr. vankomicin zaradi svoje velike strukture ne more prehajati skozi membrano G-bakterij in tako ne pride do mesta delovanja – peptidoglikana, zato z njim ne moremo zdraviti okužb z G- bakterijami), lahko pa odpornost pridobijo. Največji problem predstavlja prav ta pridobljena odpornost bakterij, ki jo lahko pridobijo prek mutacije ali genetske transformacije. Mutacije bakterij se dogajajo povsem naravno in lahko povzročijo odpornost tako, da se tekom mutacije spremeni vezavno mesto za učinkovino, poveča se sinteza encimov, ki razgrajujejo učinkovino, zmanjša se produkcija proteinov, ki omogočajo vstop učinkovin v celico prek zunanje membrane ali pa se poveča število efluks prenašalcev, ki učinkovino črpajo ven iz celice. Prisotnost protibakterijskih učinkovin ni nujna za nastanek mutacij. Znani so primeri, ko so nekateri bakterijski sevi odporni proti učinkovini, še preden se je to odkrilo. Bakterije pa lahko odpornost proti eni ali več protibakterijskim učinkovinam pridobijo brez mutacij, od že odpornih bakterij prek prenosa genetske informacije s transdukcijo, konjugacijo ali transformacijo. Pri transdukciji se gen za odpornost iz ene bakterije prenese v drugo prek bakteriofaga. Na tak način se lahko prenaša gen za sintezo beta laktamaz in povzroči odpornost bakterij na betalaktamske antibiotike. Pri konjugaciji, ki je značilna bolj za G- bakterije, se plazmidi z

rezistentnim genom prenesejo direktno iz ene celice v drugo prek pilusov. Za transformacijo pa je značilno, da celica pridobi in vključi DNA segmente iz bakterije, ki je ob lizi spustila svojo DNA v okolje (2, 4).

1.2 BAKTERIJSKA CELIČNA STENA

Bakterijske celice na zunanji strani celične membrane obdaja celična stena. Glede na sestavo same celične stene ločujemo bakterije na Gram pozitivne (G+) in Gram negativne (G-). G+ bakterije imajo celično steno sestavljeno iz debelejšje plasti peptidoglikana (od 50 do 100 plasti), medtem ko je pri G- bakterijah plast peptidoglikana tanjša (2 plasti) in je na zunanji strani obdana z membrano (1, 2).

Celična stena je za preživetje bakterij nujnega pomena. Predstavlja fleksibilno polprepustno pregrado, skozi katero omogoča celici izmenjavo pomembnih snovi za preživetje, hkrati pa je dovolj toga, da celico ščiti pred poškodbami zaradi sprememb osmotskega tlaka v okolici. Celična stena daje celici tudi obliko in jo ščiti pred encimsko razgradnjo v gostitelju ter drugimi toksini v okolju (1, 5, 6).

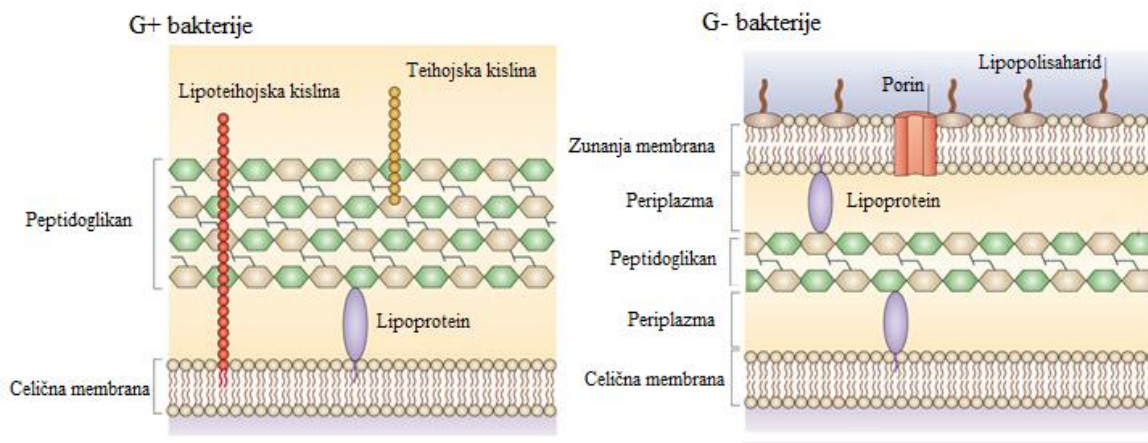
Ker je celična stena značilna za bakterijske celice ne pa tudi za celice sesalcev, predstavlja pomembno tarčo za razvoj protibakterijskih učinkovin, ki delujejo tako, da zavirajo njeno biosintezo (1).

1.2.1 Celična stena gram pozitivnih bakterij

Na zunanji strani je celična stena G+ bakterij sestavljena iz polisaharidov in proteinov, ki so značilni za posamezno vrsto bakterij. Polisaharidi in proteini skupaj predstavljajo antigensko determinanto, ki omogoča bakteriji vezavo na tarčno celico. Nato sledi plast peptidoglikana, ki predstavlja 90% celične stene. Plast peptidoglikana je preprejena s teihojsko in lipoteihojsko kislino, ki dajeta G+ bakterijski celici negativni naboj. Sestavljeni sta iz glicerol fosfata ali ribitol fosfata, vsebujeta pa tudi sladkorni del ali D-alanin. Teihojska kislina je prisotna le v plasteh peptidoglikana, medtem ko lipoteihojska kislina sega do celične membrane in tvori kovalentno povezavo z fosfolipidi v membrani. Zaradi negativnega naboja naj bi regulirali transport kationov (Ca^{2+} in Mg^{2+}) skozi celično steno. Prav tako naj bi sodelovali pri celični rasti in preprečevali lizo celic. Pod plastjo peptidoglikana se nahaja citoplazemska membrana, v kateri so prisotni številni proteini in encimi, ki sodelujejo pri izgradnji in obnovi celične stene (1, 5, 6, 7).

1.2.2 Celična stena gram negativnih bakterij

G- bakterije se od G+ ločijo predvsem po sestavi celične stene. Ta je pri G- bakterijah tanjša in na zunanji strani še obdana z lipidno membrano. Na površini te zunanje membrane so prisotni lipopolisahardi – endotoksini, ki so odgovorni za antigeni odziv v organizmu gostitelja ter omogočajo opredelitev bakterij. Pomembna struktura zunanje membrane so tudi porini – skupek 2 ali 3 proteinov, ki tvorijo poro v zunanji membrani in omogočajo prehod hidrofilnih snovi skozi njo. Porini lahko vsebujejo receptorje, ki dovolijo prehod le določenim molekulam, lahko pa so nespecifični in skozi njih prehaja veliko število različnih snovi. Med zunanjo in notranjo celično membrano je še periplazemski prostor. V periplazemskem prostoru je plast peptidoglikana, ki je pri G- bakterijah precej tanjša kot pri G+ in predstavlja okrog 10 % celične stene. Zaradi tanjše plasti peptidoglikana so G- bakterije bolj občutljive na mehanske vplive. Poleg peptidoglikana se v periplazmi nahajajo še različni encimi, kot so hidrolitični encimi, vezavni in transportni proteini pa tudi β laktamaze – encimi, ki razgrajujejo β laktamske antibiotike, ki bi bakteriji škodovali. G+ bakterije β laktamaze izločajo v svojo okolico. Sledi še citoplazemska membrana, v kateri so tako kot pri G+ bakterijah prisotni številni proteini in encimi, ki sodelujejo pri izgradnji celične stene in drugi (5, 6, 7).

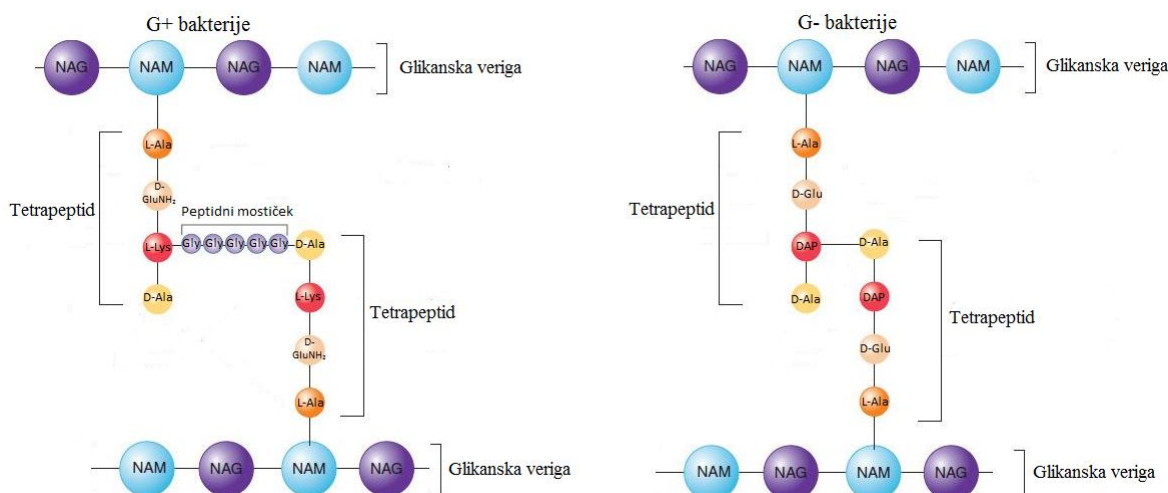


Slika 1: Celična stena G+ in G- bakterij; povzeto po (8)

1.3 BAKTERIJSKI PEPTIDOGLIKAN

Peptidoglikan je ena izmed najpomembnejših sestavin celične stene, saj ji daje trdnost in štiti celico pred poškodbo zaradi spremembe osmotskega tlaka. Prisoten je tako pri G+ kot tudi pri G- bakterijah. Sestavljen je iz glikanske verige, ki je prečno premrežena s peptidi. Taka 3D struktura je odgovorna za trdnost in rigidnost peptidoglikana v vseh smereh. Glikanski del peptidoglikana je sestavljen iz izmenjujočih molekul *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc), ki sta med seboj povezana z glikozidno β 1-4 vezjo. Na terminalnih koncih glikana je GlcNAc in 1,6-dehidro MurNAc. To je MurNAc z intramolekularno etersko vezjo med C1 in C6 (5, 6, 9).

Na D-laktoilno skupino vsake MurNAc je vezana peptidna veriga sestavljena iz 5 aminokislin, ki se lahko razlikujejo glede na vrsto bakterij. Običajno pentapeptid sestavljajo: L-alanin, D-glutaminska kislina, *mezo* diaminopimelinska kislina (mDAP) pri G- bakterijah oz. L-lizin pri G+ bakterijah ter dva D-alanina, pri čemer se zadnji D-alanin odcepi pri tvorbi prečne peptidne vezi in tako nastane tetrapeptid. Dva tetrapeptida sta med seboj povezana s peptidno vezjo, katere nastanek katalizira encim transpeptidaza. Peptidna vez nastane med amino skupino mDAP oz. L-Lys na mestu 3 enega in karboksilno skupino D-Ala na mestu 4 drugega tetrapeptida. Pri G- bakterijah pride do direktne tvorbe peptidne vezi med aminokislinama, za G+ bakterije pa je značilen peptidni mostiček med L-Lys in D-Ala, ki se razlikuje glede na vrsto bakterij. Za *S. aureus* je tako značilen pentaglicinski mostiček (5, 6, 10).



Slika 2: Zgradba peptidoglikana; povzeto po (5, 11)

1.3.1 Sinteza peptidoglikana

Biosinteza peptidoglikana vključuje približno 20 reakcij, ki potekajo znotraj citoplazme, v celični membrani in zunaj nje.

Prvi del sinteze, pri kateri nastanejo nukleotidni prekurzori in poteka znotraj citoplazme, lahko razdelimo na 4 sklope reakcij: tvorba UDP-GlcNAc, tvorba UDP-MurNAc, tvorba UDP-MurNAc pentapeptida in stranska reakcija nastanka D-glutaminske kisline in dipeptida D-Ala-D-Ala (3).

Tvorba UDP-GlcNAc

UDP-GlcNAc v bakteriji nastane iz fruktoze-6-fosfata ob pomoči štirih encimov. Najprej se fruktoza-6-fosfat ob pomoči encima iz skupine amidotransferaz, glukozamin-6-fosfat sintaze (GlmS), pretvori v glukozamin-6-fosfat. N-terminalna glutaminazna domena encima je odgovorna za hidrolizo glutamina v glutamat in amonijak, C-terminalna izomerazna domena pa je odgovorna za samo pretvorbo fruktoze-6-fosfata v glukozamin-6-fosfat. Pri tem se kot vir dušika uporablja amonijak, ki se prehodno sproti ob hidrolizi glutamina. Nato sledi izomerizacija glukozamin-6-fosfata v glukozamin-1-fosfat, kar katalizira encim fosfoglukozamin mutaza (GlmM). Temu sledi še acetiliranje aminske skupine glukozamin-1-fosfata, pri čemer nastane GlcNAc-1-fosfat, in pripenjanje uridila, kar vodi v nastanek končnega produkta UDP-GlcNAc. Zadnji dve reakciji katalizira encim GlmU, ki ima dvojno delovanje. C-terminalna domena encima deluje kot glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza (katalizira prenos acetilne skupine iz acetil CoA na glukozamin-1-fosfata.), N-terminalna domena pa deluje kot *N*-acetil-glukozamin-1-fosfat uridiltransferaza in ob prisotnosti Mg^{2+} ionov in UTP katalizira nastanek UDP-GlcNAc in pirofosfata (3).

Tvorba UDP-MurNAc

Nastanek UDP-MurNAc katalizirata encima MurA in MurB. Prvo reakcijo, ki vodi v nastanek UDP-GlcNAc-enolpiruvata in fosfata kot stranskega produkta, katalizira encim MurA. Gre za reakcijo prenosa enolpiruvata s fosfoenolpiruvata na tretjo OH skupino UDP-GlcNAc. Temu sledi redukcija UDP-GlcNAc-enolpiruvata v UDP-MurNAc, ki jo katalizira encim MurB. Pri reakciji pride do redukcije enolpiruvata v laktilni eter, pri čemer se porabi en ekvivalent NADPH (3).

Tvorba UDP-MurNAc pentapeptida

Encimi iz skupine Mur ligaz (MurC, MurD, MurE, MurF) katalizirajo adicijo petih aminokislin na laktoilno skupino UDP-MurNAc, pri čemer nastane UDP-MurNAc pentapeptid.

Mur ligaze imajo tri skupne značilnosti:

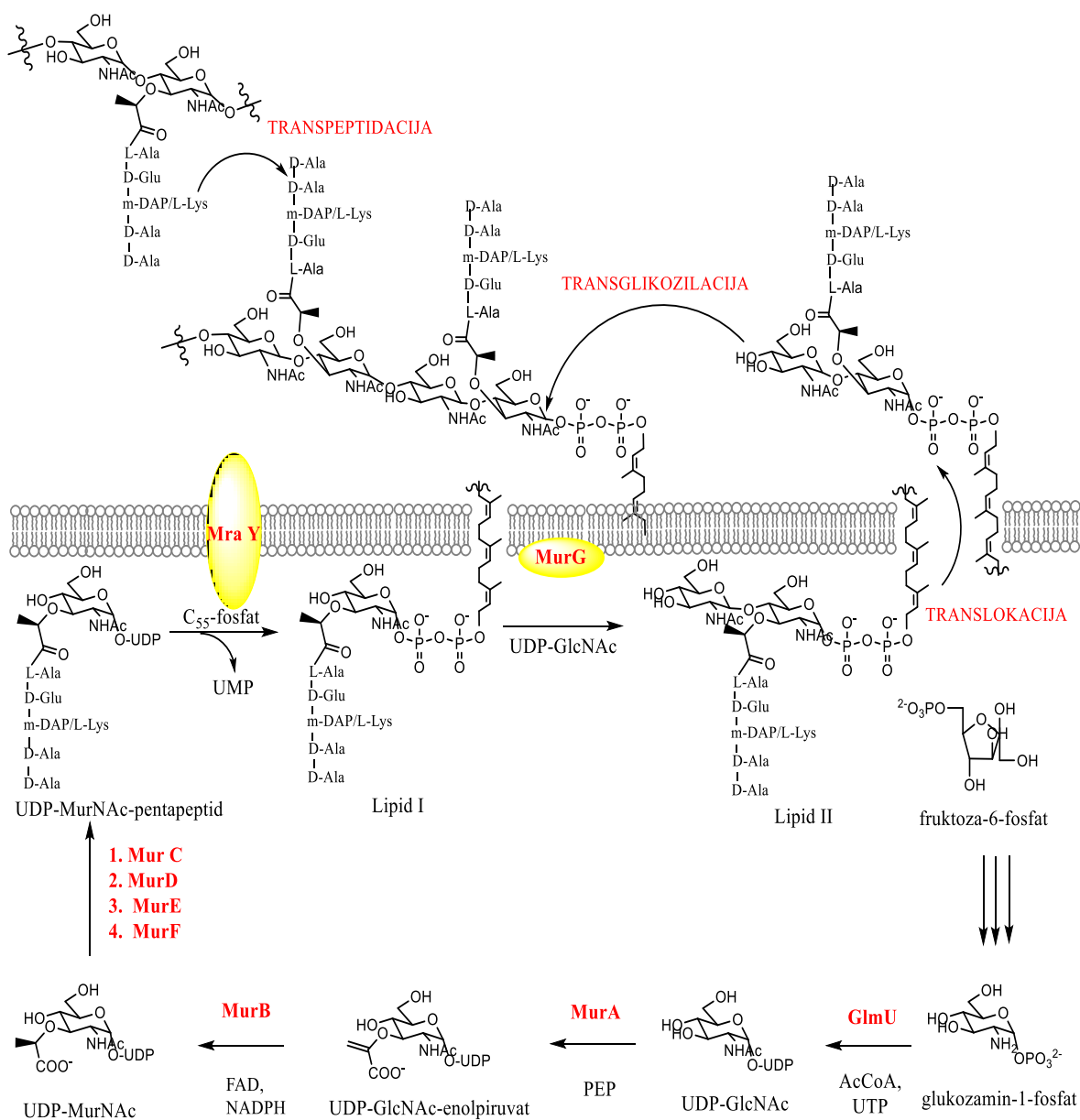
- Vsi encimi imajo enak mehanizem delovanja, pri katerem se porablja ATP. Najprej pride do aktivacije karboksilne skupine UDP-MurNAc z ATP, pri tem pa nastane acilfosfatni intermediat in ADP. Intermediat je nato podvržen nukleofilnemu napadu aminske skupine pripenjajoče se aminokislina oz. dipeptida, kar vodi v nastanek tetraedične intermediata, ki razpade na amid oz. peptid in fosfat.
- Vsi encimi, ki spadajo v družino Mur ligaz, imajo poleg vezavnega mesta za ATP skupnih še 6 nespremenjenih aminokislinskih ostankov.
- Vse so sestavljene iz treh domen, pri čemer N-terminalna domena služi za vezavo UDP-MurNAc, sredinska domena predstavlja vezavno mesto za ATP, na C-terminalno domeno pa se veže ustrezna aminokislina oz. dipeptid. Tudi strukturno so si domene različnih encimov med seboj podobne. Večje razlike, ki so pogojene z dolžino UDP-prekursorja, so značilne le za N-terminalno domeno. Za encime Mur je značilna odprta in zaprta konformacija, ki jo povzroči vezava liganda.

Najprej encim MurC pripne prvo aminokislino pentapeptida, ki je običajno L-Ala. Nato sledi adicija naslednje aminokislina, D-glutaminske kisline, z encimom MurD. Tretjo aminokislino v pentapeptidu pripenja encim MurE. Za G⁺ bakterije je ta običajno L-Lys, za G⁻ in bacile pa mDAP. Na koncu sledi še adicija dipeptida D-Ala-D-Ala, ki jo katalizira encim MurF. Tako nastane UDP-MurNAc pentapeptid (3).

S tem korakom se biosinteza prekursorjev peptidoglikana v citoplazmi konča in prenese na celično membrano.

Membranski encim, fosfotransferaza, MraY katalizira vezavo UDP-MurNAc pentapeptida na undekaprenil-fosfat, C₅₅-poliizoprenoidni lipidni prenašalec, ki je zasidran v celični membrani. Pri tem nastane lipid I-undekaprenil pirofosforil-MurNAc-pentapeptid. Nato glikozil-transferaza MurG katalizira nastanek β -1,4 glikozidne vezi med Glc-NAc iz UDP-Glc-NAc in MurNAc, sladkornim delom lipida I, pri čemer nastane končni prekursor peptidoglikana lipid II. Lipid II se prek flipaz prenese na zunanjo stran celične membrane oz. v perioplazmo, kjer se biosinteza peptidoglikana zaključi (9, 12).

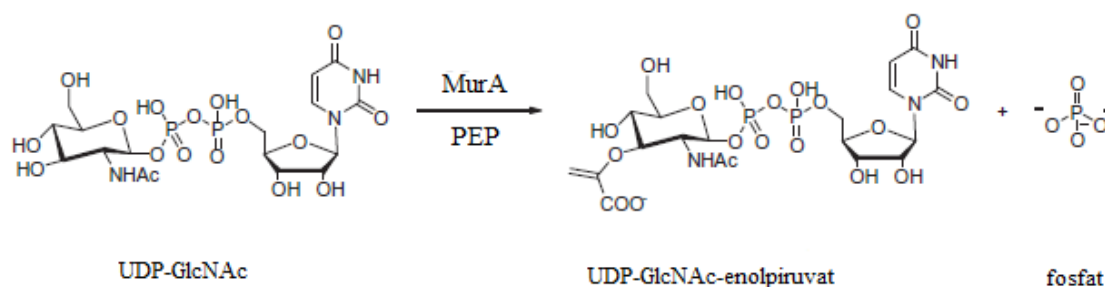
Zunaj celice penicilin vezavni proteini z glikoziltransferazno in transpeptidazno aktivnostjo najprej katalizirajo tvorbo β -1,4 glikozidne vezi, prek katere se lipid II vgradi v nastajajočo peptidoglikansko verigo. Nato pa sledi še transpeptidacija peptidoglikana. Pri tem pride do odcepa zadnjega D-Ala pentapeptida in nastanka peptidne vezi med amino skupino mDAP oz. L-Lys na mestu 3 enega in karboksilno skupino D-Ala na mestu 4 drugega pentapeptida. Pri G⁻ bakterijah se peptidna vez tvori direktno med aminokislinama tetrapeptida, za G⁺ bakterije pa je značilen peptidni mostiček. Po končani transpeptidaciji sledi še odcep lipidnega prenašalca iz peptidoglikanske verige (9, 12).



Slika 3: Biosinteza peptidoglikana

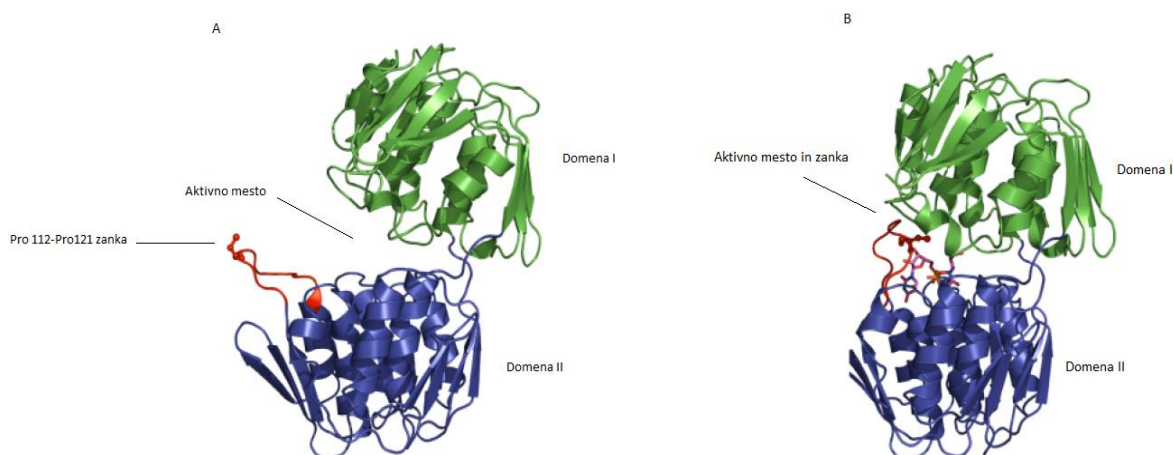
1.4 ENCIM MURA

Encim MurA se nahaja znotraj celice v citoplazmi in katalizira reakcijo prenosa enolpiruvata s fosfoenolpiruvata na tretjo OH skupino UDP-GlcNAc, pri čemer nastane UDP-GlcNAc-enolpiruvat in fosfat. To je ena izmed prvih reakcij, ki vodijo do sinteze peptidoglikana (3,13).



Slika 4: Reakcija, ki so katalizira MurA; povzeto po (14)

Encim MurA je sestavljen iz 2 domen, med katerima se nahaja aktivno mesto. Po vezavi UDP-GlcNAc v aktivno mesto pride do inducirane prilagoditve in zaprtja domen. Domena I je nepremična, medtem ko se domena II, ki vsebuje zanko, premika in rotira. Zanka, ki je pokrita z regijo Pro112-Pro121 in vsebuje Cys115, je v odprti konformaciji na površini in izpostavljena v okolico, pri zaprtju domen pa se skriva v prostor med domenama in bližino aktivnega mesta encima. Nato sledi še vezava fosfoenolpiruvata. Mehanizem reakcije, ki jo encim katalizira, je adicija s sledečo eliminacijo, pri čemer nastane nekovalentno vezan tetraedični intermediat fosfolaktoil-UDP-GlcNAc. Pri samem poteku reakcije imajo pomembno vlogo aminokislinski ostanki Cys115, Asp305 in Lys22. Cys115 naj bi sprva imel vlogo kislinsko-bazičnega katalizatorja, vendar je po zdajšnjih ugotovitvah pomemben zgolj za sprostitev produkta. Ostanek Asp305 sodeluje pri deprotonizaciji tretje OH skupine UDP-GlcNAc in pri deprotonizaciji tretjega C atoma tetraedičnega intermediata, ki ji sledi sprostitev fosfata. Lys22 pa sodeluje pri vezavi fosfoenolpiruvata in spremembi konformacije encima, ki tako pridobi katalitično aktivnost (10, 13, 15).



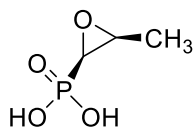
Slika 5: A-odprta konformacija MurA, B-zaprta konformacija MurA; povzeto po (10)

MurA je prisoten tako pri G⁺ kot tudi pri G⁻ bakterijah. Za G⁻ bakterije je značilno da imajo le eno kopijo murA gena, medtem ko sta pri G⁺ prisotni 2 kopiji gena (MurA in MurZ), ki sta si po katalitičnih lastnostih podobni. Encim MurA je izredno pomemben za preživetje celic, saj je inaktivacija gena za MurA v bakterijah *E. coli*, *S. pneumoniae* in *S. aureus* zaradi izgube celične stene in spremembe osmotskega tlaka letalna (10, 13).

Zaradi slednjega in dejstva, da encim MurA ni prisoten v celicah sesalcev, le-ta predstavlja odlično tarčo za načrtovanje in sintezo učinkovin, ki bi njegovo delovanje zavirale in tako zdravile okužbe predvsem z G⁺ bakterijami.

1.5 ZAVIRALCI ENCIMA MURA

Najbolj poznan in klinično že uporabljen zaviralec encima MurA je fosfomicin. Fosfomicin je bil naprej izoliran iz sevov *Streptomyces* in deluje baktericidno tako proti G⁺ kot tudi G⁻ bakterijah. Uporablja se ga predvsem za zdravljenje infekcij urinarnega trakta. Uporablja se ga tako peroralno kot intravenozno. Sinergistično deluje v kombinaciji z betalaktamskimi antibiotiki, aminoglikozidi in fluorokinoloni (13, 14, 16, 17).



Slika 6: Struktura fosfomicina; povzeto po (16)

Fosfomicin je strukturni analog fosfoenolpiruvata in deluje tako, da se kovalentno veže na aminokislinski ostanek Cys115 v aktivnem mestu encima in ireverzibilno zavre njegovo delovanje. Njegovo delovanje je časovno odvisna in pospešeno, če je v aktivno mesto vezan substrat encima – UDP-GlcNAc, ki je odgovoren za strukturno spremembo encima.

Kompleks UDP-GlcNAc-MurA-fosfomicin se nahaja v zaprti konformaciji encima, kjer je fosfomicin skrit v prostor med domenama (13, 14, 16, 17).

Bakterije *Mycobacterium tuberculosis*, *Chlamydia trachomatis* in *Borrelia burgdorferi* imajo v aktivnem mestu namesto cisteinskega ostanka aspartatni ostanek. Ta zamenjava ene same aminokislina ne vpliva na katalitično delovanje encima, vodi pa v naravno odpornost zgoraj omenjenih bakterij na fosfomicin. Rezistenca bakterij na fosfomicin se lahko kaže tudi kot zmanjšan privzem fosfomicina v celico zaradi okvar genov, ki kodirajo prenašalce. Fosfomicin namreč vstopa v celico z aktivnim transportom prek prenašalcev za L- α -glicerofosfat (α -GP) in glukoza-6-fosfat (G6P). Poleg tega pa lahko pri bakterijah odpornih na fosfomicin pride tudi do raznih modifikacij aktivnega mesta encima, povečanega izražanja encima ali encimskih sprememb samega fosfomicina. Navzkrižne rezistence z drugimi antibiotiki fosfomicin nima, saj deluje na povsem drugo tarčo pri sintezi peptidoglikana kot večina drugih antibiotikov (13, 14, 16, 17, 18).

Razvoj rezistence bakterij na fosfomicin kaže na potrebo po iskanju in sintezi novih zaviralcev encima MurA, ki se bodo po delovanju in strukturi razlikovali od slednjega.

Nekaj novih, potencialnih zaviralcev encima MurA je bilo že odkritih:

- Pirazolopirimidin in purinski analog zavirata delovanje encima v bakteriji *E. coli* in *S. aureus*. Ti zaviralci naj bi se nekovalentno vezali v oz. v bližino aktivnega mesta encima. Prisotnost UDP-GlcNAc zmanjša IC_{50} vrednosti, kar pomeni, da je sprememba konformacije encima ključna za delovanje teh spojin. Ugotovljeno pa je bilo, da poleg sinteze peptidoglikana zavirajo tudi biosintezo DNA, RNA in proteinov, kar doprinese k protibakterijskemu delovanju (13, 16).
- Dva derivata 5-sulfonoksi-antranilske kisline delujeta kot kompetitivna zaviralca MurA. Z UDP-GlcNAc tekmujeta za vezavo v aktivno mesto in preprečujeta konformacijsko spremembo encima iz odprte v zaprto strukturo, ki je nujna za katalitično aktivnost encima (13, 16).
- Seskviterpenska laktone cinicin in cinaropikrin sta se izkazala za ireverzibilna zaviralca encima MurA iz bakterij *E. coli* in *P. aeruginosa*. Encim MurA katalizira nastanek kovalentne vezi med zaviralcem in UDP-GlcNAc, kar vodi v nastanek »samomorilnega zaviralca«, ki oponaša tetraedričen intermediat, ki nastane pri reakciji, katero katalizira MurA. Čeprav je mehanizem zaviranja poznan, ne moremo z vso gotovostjo trditi, da je protibakterijsko delovanje seskviterpenskimi laktone posledica samo zaviranja encima MurA. Elektrofилne skupine zaviralcev

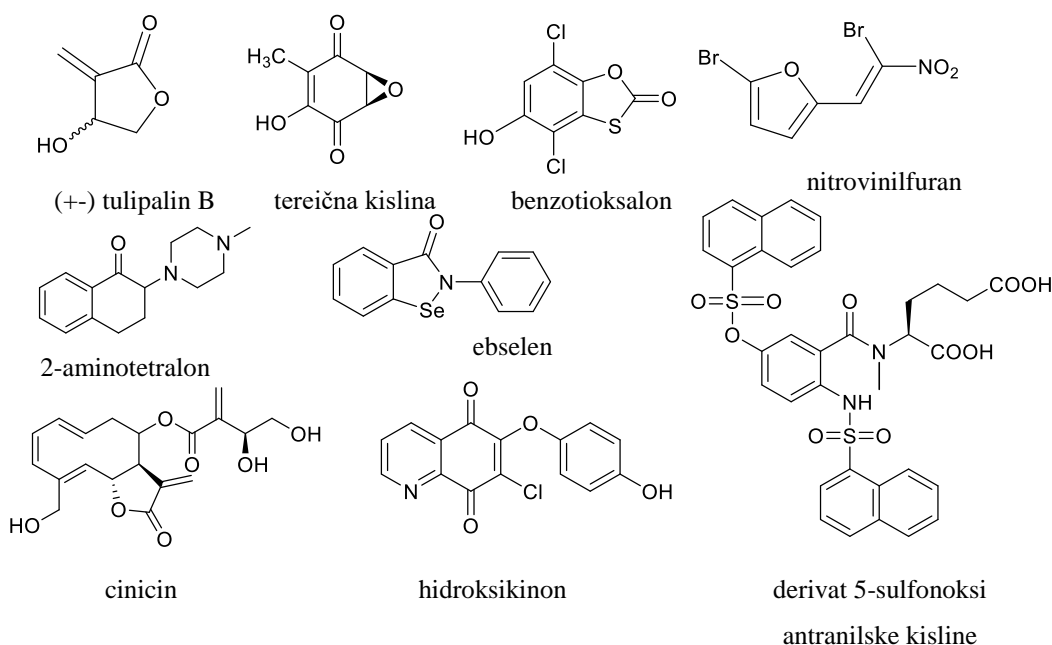
lahko reagirajo s številnimi nukleofili, ki se nahajajo v celici in tako izkazujejo protibakterijsko delovanje (13, 16).

- 1-Tuliposide B in (+-) tulipaline B sta tudi potencialna zaviralca encima MurA iz *E. coli*. Njihovo delovanje je časovno odvisno in pogojeno z OH skupino v njihovi strukturi. Tulipaline A in 1-tuliposide, ki nimata OH skupine, se nista izkazala za zaviralca MurA. Mehanizem delovanja je podoben kot pri zgoraj opisanem cinicinu – nastanek »samomorilskega zaviralca« (13, 16).
- Derivati nitrovinilfurana in bromonitrometana prav tako delujejo kot zaviralci MurA in imajo širok spekter delovanja. Zaradi nespecifičnega delovanja in interakcije s številnimi drugimi proteini poleg encima MurA so nadaljnje raziskave opustili (16).
- Tereična kislina je metabolit glive *Aspergillus terreus* in deluje kot kovalentni zaviralec MurA iz *Enterobacter cloacae* in *E. coli*. Zaviranje encima je časovno odvisno in pogojeno s prisotnostjo substrata – UDP-GlcNAc, podobno kot je značilno za fosfomicin. Kinonski obroč kisline se kovalentno veže na tiolno skupino aminokislinskega ostanka Cys115. Za razliko od kompleksa MurA-fosfomicin, pri katerem UDP-GlcNAc po vezavi fosfomicina ostane vezan v aktivnem mestu, se po vezavi tereične kisline na ostanek Cys115 UDP-GlcNAc sprosti iz vezavnega mesta. Kompleks MurA-tereična kislina se nahaja v odprti konformaciji, pri kateri je tereična kislina »štrli« v okolico. Kompleks MurA-fosfomicin ostane v zaprti konformaciji s fosfomicinom skritim med domenama encima. Čeprav imata tereična kislina in fosfomicin podobno jakost zaviranja encima, tereična kislina izkazuje boljše protibakterijsko delovanje v primerjavi s fosfomicinom. To je verjetno posledica tega, da encim MurA ni edina tarča delovanja tereične kisline (13, 16).
- Derivati 2-aminotetralona izkazujejo zaviranje MurA z *E. coli*, *S. aureus* z IC₅₀ vrednostmi v mikromolarnem območju in MIC vrednostmi od 8 µg/ml do 128 µg/ml. Za zaviralno delovanje je odgovoren α-amino ketonski del, ki tvori kovalentno oz. zelo močno nekovalentno vez (13, 16).
- Benzotioksalonski derivati delujejo tako, da tvorijo kovalentno povezavo s Cys115 in ireverzibilno zavrejo delovanje encima (16).
- Zaviralci encima MurA iz *Haemophilus influenzae* ebselen, tiomerosal in tiram delujejo tako, da se kovalentno vežejo in preoblikujejo aminokislinski ostanek

Cys177. Tako stabilizirajo odprto konformacijo encima in preprečijo vezavo substrata UDP-GlcNAc v aktivno mesto. Ti zaviralci naj bi zavirali rast tudi G-bakterij, kot so *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* v koncentracijah od 1-2 µg/ml (13, 16).

- Derivati s kinolinskim ali naftokinonskim skeletom prav tako zavirajo delovanje MurA s tvorbo kovalentne vezi s cisteinskim ostankom. Ne izkazujejo pa protibakterijskega delovanja (16).

Čeprav večina od zgoraj omenjenih zaviralcev izkazuje signifikantno zaviranje encima MurA, imajo le redki izmed njih tudi dobro protibakterijsko delovanje. Razlog za to je verjetno slabo prehajanje teh zaviralcev skozi celično membrano, kar ima za posledico nizko koncentracijo zaviralcev na samem mestu delovanja (13, 16).



Slika 7: Strukture zaviralcev MurA; povzeto po (15,16)

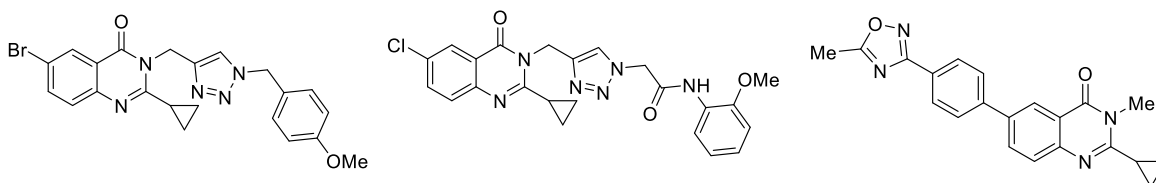
1.6 KINAZOLINONI

Kinazolinon je heterociklična spojina z molekulsko formulo $C_8H_6N_2O$. Obstajata dva strukturna izomera: 2-(1*H*)kinazolinon in bolj pogosto zastopan, 4-(3*H*)kinazolinon. Okrog 150 izoliranih naravnih alkaloidov iz različnih vrst rastlin, mikroorganizmov in živali ima v svoji strukturi kinazolinonski sklet, kot na primer: sperlikin C, sclerotigenin, cirkumdatin F, benzomalvin A. Kinazolinoni in njihovi različno substituirani derivati so zanimivi zaradi zelo raznolikih terapevtskih in farmakoloških lastnosti. Znano je, da imajo protivirusno,

protimikrobno, protiglivično, protimalarijsko, protivnetno, antikonvulzivno, antihipertenzivno in protirakavo delovanje. Delujejo pa tudi kot antihiperlipemiki, antidiabetki, antihistaminiki, diuretiki, sedativi in analgetiki (19, 20, 21).

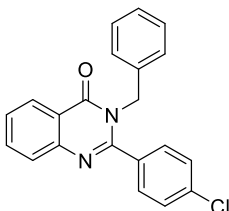
1.6.1 Primer protibakterijskega delovanja kinazolinonov

Znanih je kar nekaj derivatov kinazolin-4(3H)-ona, ki izkazujejo potencialno protibakterijsko delovanje. Spodnji trije derivati izkazujejo protibakterijsko delovanje na G+ bakterije (*S. aureus* in *B. subtilis*) in na G- bakterije (*E. coli* in *P. aeruginosa*) (19).



Slika 8: Kinazolinonski derivati s protibakterijskim delovanjem; povzeto po (19)

Med derivati 2 aminobenzamida je 3-benzil-2-(4-klorofenil)-kinazolin-4(3H)-on izkazoval najmočnejše protibakterijsko delovanje z MIC vrednostmi $25.6 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ (*S. aureus*), $24.3 \pm 0.4 \mu\text{g/ml}$ (*B. subtilis*), $30.1 \pm 0.6 \mu\text{g/ml}$ (*P. aeruginosa*) in $25.1 \pm 0.5 \mu\text{g/ml}$ (*E. coli*).



Slika 9: Struktura 3-benzil-2-(4-klorofenil) kinazolin-4(3H)-ona; povzeto po (21)

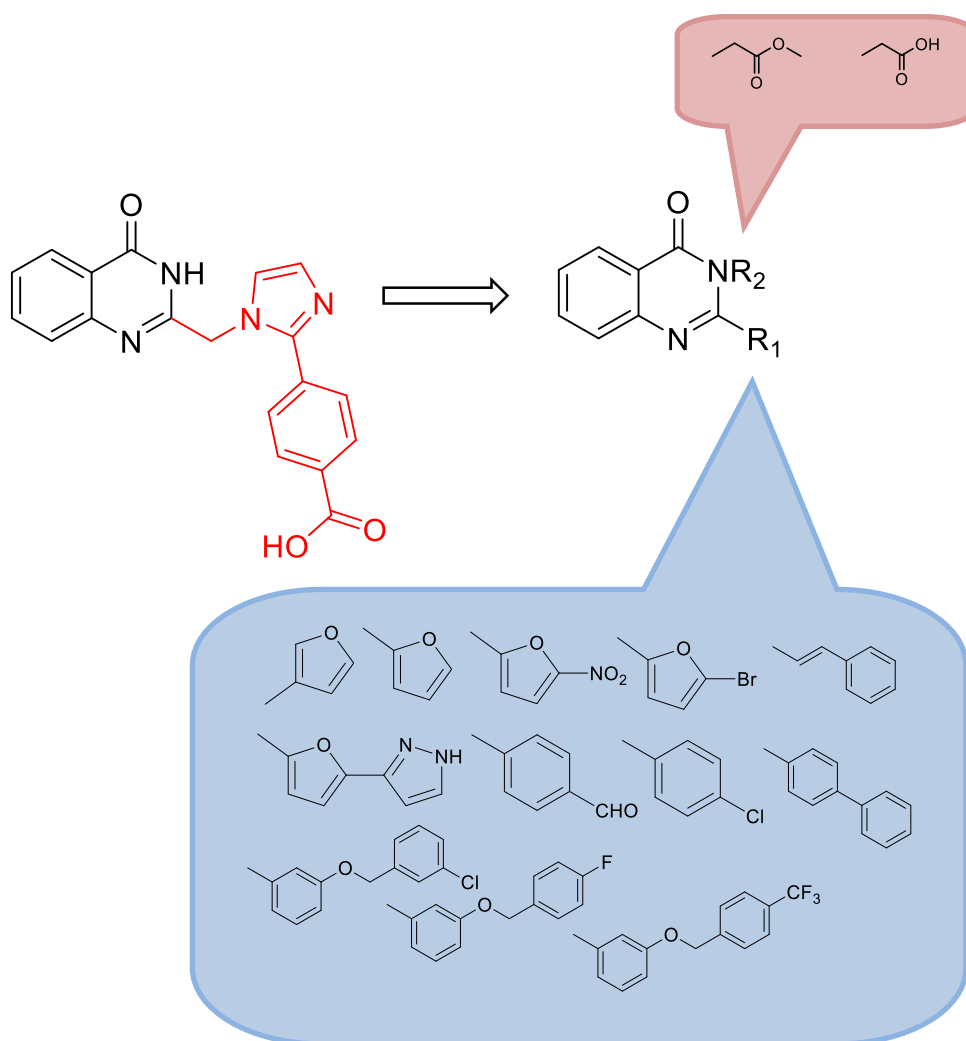
Deloval naj bi kot zaviralec encima sortaze A in njegovo protibakterijsko delovanje je po moči podobno že znani protibakterijski učinkovini streptomycinu. Izkazoval pa je tudi proti glivično delovanje proti *Aspergillus fumigatus*, *Saccharomyces cerevisiae*, in *Candida albicans* (20, 21).

2 NAMEN DELA

Namen magistrske naloge je sinteza in biokemično vrednotenje kinazolinonskih derivatov kot potencialnih zaviralcev encima MurA. Encimi Mur namreč predstavljajo eno izmed validiranih tarč, ki omogoča razvoj novih protibakterijskih učinkovin.

Postavili smo si naslednje cilje:

1. Sintetizirali bomo derivate s kinazolinonskim skeletom in opredelili njihovo zaviralno delovanje. Na Fakulteti za farmacijo je bila s pomočjo virtualnega reševanja odkrita in sintetizirana spojina s kinazolinonskim skeletom, ki z vrednostjo $IC_{50} = 82 \mu M$ izkazuje zaviralno delovanje na encim MurA iz sevov *E. coli*. Sintetizirali bomo derivate te spojine in sicer tako, da bomo spreminjali fragmente na mestu 2 in substituivali dušikov atom na mestu 3 kinazolinonskega skeleta.



2. Pri sintezi bomo izhajali iz antranilamida in različnih aldehydov (aromatskih in heteroaromatskih), iz katerih bomo po postopku aerobne oksidativne ciklizacije v DMSO brez dodatka oksidantov pripravili veliko število derivatov 2-substituiranega kinazolinona.
3. Poskušali bomo tudi substituirati dušikov atom na mestu 3 in pri tem ojačati zaviralno delovanje.
4. Sintetiziranim potencialnim zaviralcem encima MurA bomo z izvedbo biokemičnega testiranja določili jakost zaviralnega delovanja, IC_{50} vrednosti za aktivne spojine in minimlano inhibitorno koncentracijo (MIC).
5. Na podlagi rezultatov biokemičnega testiranja bomo pridobili pomembne informacije o odnosu med strukturo in delovanjem sintetiziranih spojin.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu magistrske naloge smo uporabljali reagente in topila naslednjih proizvajalcev: Sigma Aldrich, Acros Organics, Merck, Carlo Erba reagents, Gram-mol, J.T. Baker, Maybridge.

Uporabljeni reagent: antranilamid, 4-difenilkarbaldehid, furan-2-karbaldehid, 5-bromo-2-furaldehid, 4-fluorobenzaldehid, 3-klorobenzaldehid, 3,4-difluorobenzaldehid, 5-nitro-2-furaldehid, 3-benziloksibenzaldehid, 4-(dietiloksimetil)benzaldehyd, 5-metil-2-furaldehid, 5-(1*H*-pirazol-5-il)-furaldehid, 5-hidroksimetil-2-furaldehid, 3-furaldehid, cinamaldehyd, 4-(piridin-4-il)benzaldehyd, 5-fenil-2-furaldehid, 3-hidroksibenzaldehid, 4-hidroksibenzaldehid, 1-(bromometil)-3-klorobenzen, 1-(bromometil)-4-metilbenzen, 1-(klorometil)-4-fluorobenzen, 1-(bromometil)-4-(trifluorometil)benzen, 1-(klorometil)-4-klorobenzen, 2-bromopropan, 2-bromoacetat, kalijev karbonat, kalijev jodid

Nevtralizacijska sredstva: 1 M natrijev hidroksid, 3 M klorovodikova kislina

Sušilna sredstva: natrijev sulfat, nasičena raztopina natrijevega klorida.

Topila: prečiščena voda, etilacetat, *n*-heksan, etanol, metanol, DMSO, aceton, DMF

Plini: argon

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

3.2 KROMATOGRFSKE METODE

Tankoplastna kromatografija (TLC)

Tankoplastno kromatografijo smo uporabljali za spremljanje poteka reakcij, določanje vsebine reakcijske zmesi in ugotavljanja čistosti sintetiziranih spojin. Uporabili smo Merck TLC plošče Silica Gel 60 GF254 z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Kot mobilno fazo smo uporabljali predvsem etilacetat in *n*-heksan v različnih razmerjih, ki so navedena ob posamezni spojini. Ker so reagenti in sintetizirane spojine večinoma aromati z dobro konjugiranimi sistemi, smo jih detektirali z uporabo UV svetlobe z valovnima dolžinama 254 in 366 nm.

Kolonska kromatografija

S pomočjo kolonske kromatografije smo očistili nekatere produkte. Uporabljali smo steklene kolone različnega premera. Kot stacionarno fazo smo uporabljali Silikagel 60 proizvajalca Merck-a z velikostjo delcev med 0,040 in 0,063 mm. Uporabljene mobilne faze, ki so navedene pri posamezni spojini, so se razlikovale glede na lastnosti produkta in njegovo zadrževanje na stacionarni fazi.

Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)

Tekočinsko kromatografijo visoke ločljivosti smo uporabili za določanje čistosti sintetiziranih spojin. Spojine smo analizirali na sistemu Agilent Technologies HP 1100, opremljenim s kvarterno črpalko in G1365B UV-VIS detektorjem več valovnih dolžin.

Kromatografski pogoji:

Kolona: Luna C18 column (4.6 × 250 mm)	Mobilna faza: 0.1 % TFA v vodi in acetonitril (ACN)
Temperatura sistema: 25 °C	Gradient elucije:
Valovna dolžina: 220 in 254 nm	0 – 15 min: 20-90 % ACN;
Pretok: 1 ml/min	15 – 19 min: 90 % ACN;
Volumen injiciranja: 15 µL	19 – 20 min: 90-20 % ACN,
Post time: 6 min	

3.3 SPEKTROSKOPSKE METODE

S spektroskopskimi metodami smo si pomagali pri določanju strukture in čistosti sintetiziranih spojin.

Masna spektroskopija

Masno spektroskopijo smo uporabili za natančno določitev molekulske mase. Analize so bile opravljene na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani (Center za masno spektroskopijo) in sicer na Q-TOF Premier spektrometru z ESI in HRMS tehniko.

Jedrski magnetna resonanca (NMR)

Za sintetizirane spojine smo posneli ¹H-NMR in ¹³C-NMR spektre. Spektri smo posneli na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani na Bruker Avance III 400 MHz spektrometru. Kot devterirana topila smo uporabili DMSO-*d*₆ in TFA, za interni standard pa smo uporabili TMS. Analizo NMR spektrov smo opravili s programom MestRe-C. Rešeni spektri so zapisani pod analitiko posamezne spojine pri čemer smo kemijske premike (δ) podajali v

»parts per million« (ppm), sklopitvene konstante (J) pa v hertzih (Hz). Oznake signalov so sledeče: s za singlet, d za dublet, dd za dublet dubleta, ddd za dublet dublet dubleta, m za multiplet, q za kvartet, t za triplet in td za triplet dubleta.

Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektre za spojine smo posneli na Thermo Nicolet FR-IR Nexus spektrometru. Uporabili smo ATR tehniko.

3.4 DOLOČANJE TEMPERATURE TALIŠČA SPOJIN

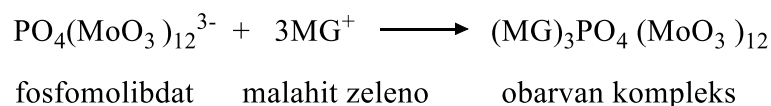
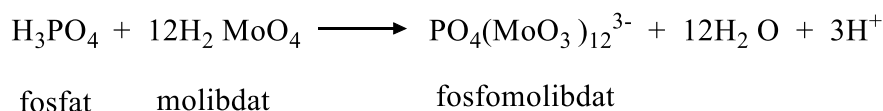
Temperature tališč sintetiziranih spojin smo določali s Kofflerjevim mikroskopom Leica z ogrevalno mizico. Vrednosti niso korigirane.

3.5 RISANJE IN POIMENOVANJE STRUKTUR

Za risanje in IUPAC poimenovanje struktur smo uporabljali ChemBioDraw Professional 16.00, proizvajalca Cambridge Soft. Sintezne postopke smo poiskali s pomočjo brskalnika SciFinderja.

3.6 BIOKEMIČNO TESTIRANJE

Sintetiziranim spojinam smo določili zaviralno delovanje na encimu MurA iz *E. coli* in *S. aureus*. Encim MurA katalizira prenos enolpiruvata s fosfoenol piruvata na UDP-GlcNAc, pri čemer nastane UDP-GlcNAc-enolpiruvat in fosfat. Zaviralno delovanje spojin na encim MurA ovrednotimo posredno s pomočjo reagenta Biomol Green®, s katerim detektiramo nastali fosfat. Reagent Biomol Green® vsebuje barvilo malahitno zeleno in amonijev molibdat. Sproščeni fosfat ob prisotnosti molibdata tvori kompleks z malahitno zelenim, ki daje modro-zeleno barvo. Količino obarvanega kompleksa določamo spektrofotometrično pri valovni dolžini 650 nm. Več kot je sproščenega fosfata, bolj intenzivno je obarvanje in manj je učinkovita spojina, saj je množina sproščenega fosfata sorazmerna aktivnosti encima (22).



V mikrotitrski ploščice smo nanесли:

Spojino v DMSO (100 μ M)	0,005 % Triton X114 (%)
Encim MurA	50 mM hepes pH 7,8;
100 μ M PEP	1 mM DTT
200 μ M UDP-GlcNAc	H ₂ O

V reakcijsko zmes smo dodali Triton X114, površinsko aktivno snov, z namenom preprečitve lažno pozitivnih rezultatov. Hidrofobne molekule spojin bi se lahko v polarnem okolju združevale v skupke, se nespecifično vezale na encim in na ta način spremenile njegovo konfiguracijo, kar bi povzročilo lažno pozitivni rezultat. Pufri smo dodali antioksidant DTT, ki ščiti sam encim.

Reakcijsko zmes (50 μ l) smo inkubirali 15 min na 37°C, nato pa smo dodali še reagent Biomol Green® (100 μ l) in pustili razvijati barvo 5min. Po 5-ih minutah smo izmerili absorbanco pri valovni dolžini 650 nm.

Rezultate testiranja za posamezne spojine podamo kot rezidualno aktivnost (RA) v odstotkih, ki jo izračunamo tako, da aktivnost encima ob prisotnosti testirane spojine delimo z aktivnostjo encima brez prisotnosti spojine z zaviralnim delovanjem, pri čemer smo predhodno od aktivnosti encima odšteli ozadje (spojina v DMSO, v primeru aktivnosti encima ob prisotnosti spojine), kontrola substrata (fosfoenolpiruvat-PEP), Triton X-114, HEPES ter vodo). Spojinam, ki so imele RA vrednost nižjo od 50 %, smo določili še vrednosti IC₅₀. To je koncentracija spojine, pri kateri je rezidualna aktivnost 50 %.

3.7 PROTIBAKTERIJSKO DELOVANJE

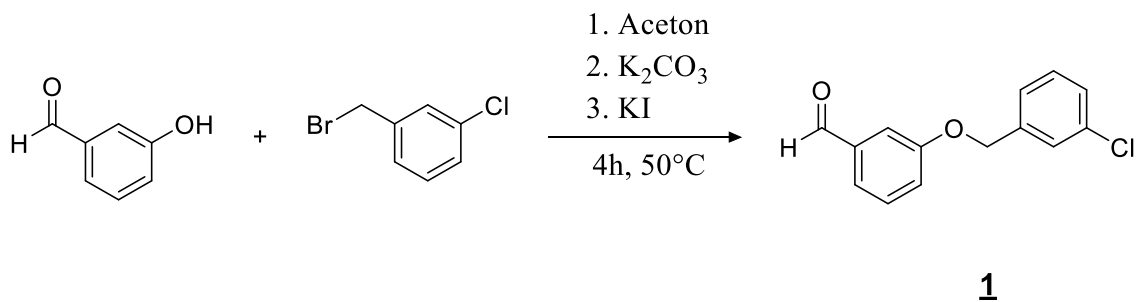
Spojinam smo določili minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) za *E. coli* in *S. aureus*. MIC je najnižja koncentracija spojine, ki po izpostavljenosti 18 – 24h še prepreči rast bakterij. Določitve MIC je izvedla asist. Kaja Rožman, mag. farm.

MIC smo določili tako, da smo pripravili različne koncentracije spojin: 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.03125 mg/ml v DMSO-ju in jih nanесли na mikrotitrsko ploščico ter jim dodali bakterijski sev v ustreznem mediju (pri *E. coli* in *S. aureus* je to LB Broth). Po dodatku bakterijskega seva v mediju so končne koncentracije spojin znašale: 128, 64, 32, 16, 8, 4, 2 in 1 μ g/ml. Ploščice smo pokrili in inkubirali čez noč (18 – 24h) ter jim pomerili optično gostoto (OD) pri 600 nm. Vrednosti MIC smo določili na podlagi primerjave s pozitivno kontrolo (tetraciklin koncentracije 10 μ g/ml) in negativno kontrolo (DMSO).

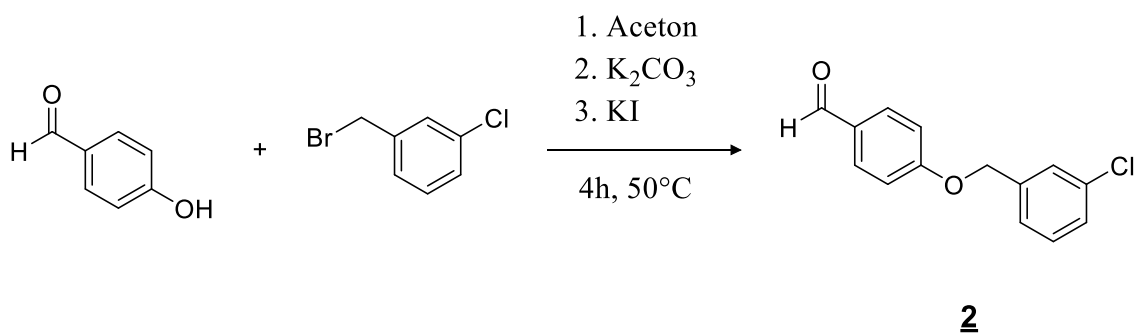
4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 SINTEZA ETROV (SPOJINE 1, 2, 4, 5 IN 6)

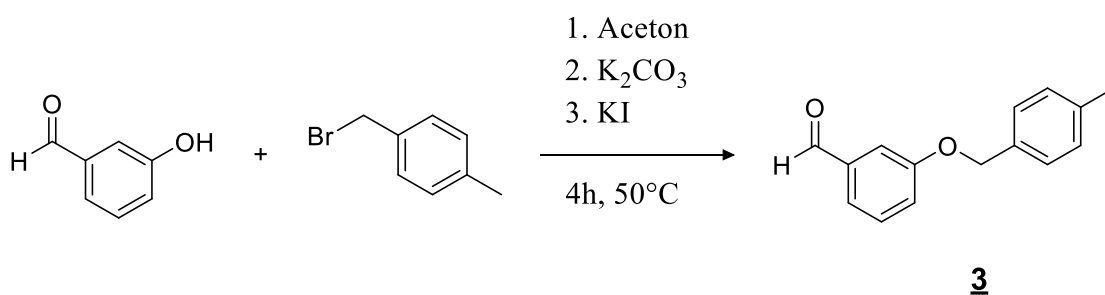
3-((3-klorobenzil)-oksi)benzaldehyd (1)



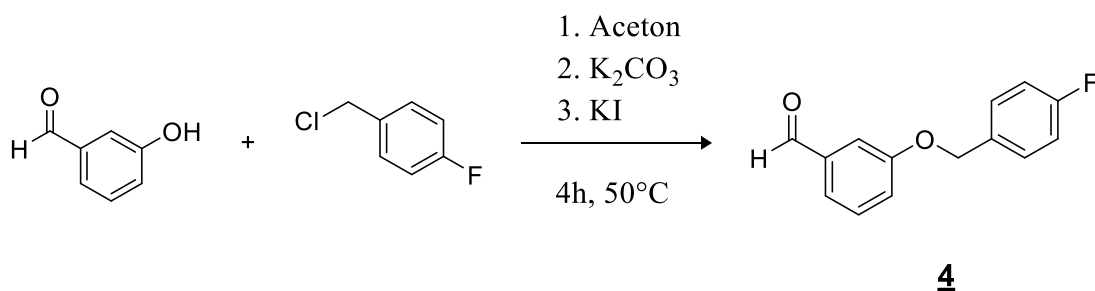
4-((3-klorobenzil)-oksi)benzaldehyd (2)

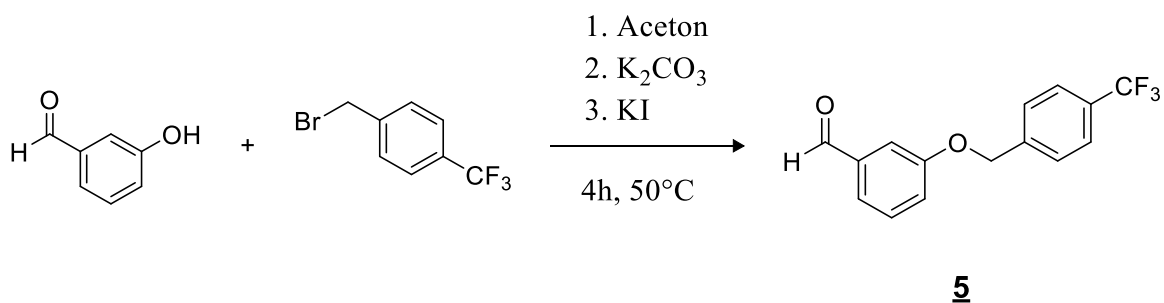
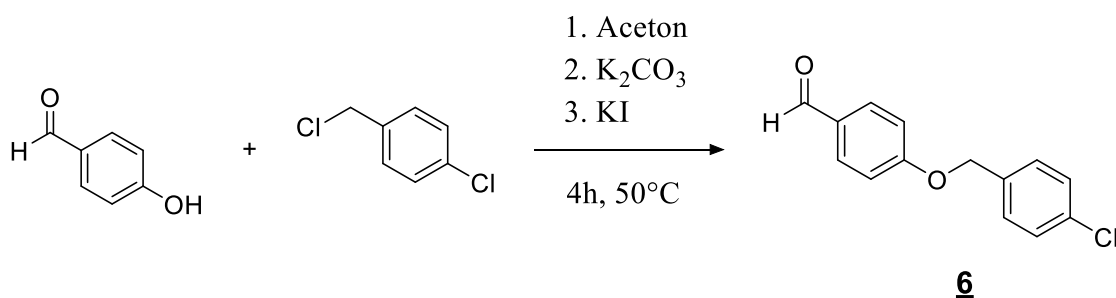


3-((4-metilbenzil)oksi)benzaldehyd (3)



3-((4-fluorobenzil)oksi)benzaldehyd (4)



3-((4-(trifluorometil)benzil)oksi)benzaldehyd (**5**)4-((4-klorobenzil)oksi)benzaldehyd (**6**)

Aldehyd (3 mmol) smo raztopili v acetonu (8 ml) in dodali kalijev karbonat (456 mg, 3,3 mmol), benzil halid (1 ekv., 3 mmol) in za konico spatule kalijevega jodida. Aldehydi in benzil halidi, ki smo jih uporabili pri sintezah spojin so podani v spodnji tabeli.

Preglednica I: Prikaz uporabljenih aldehydov in benzil halidov

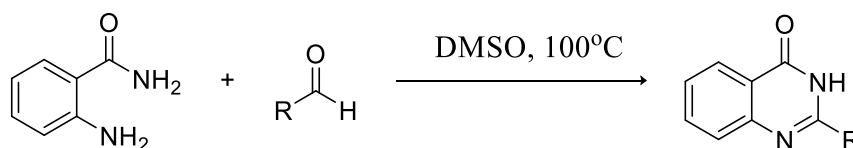
Sintetizirana spojina	Aldehyd	Benzil halid
1	3-hidroksibenzaldehyd	1-(bromometil)-3-klorobenzen
2	4-hidroksibenzaldehyd	1-(bromometil)-3-klorobenzen
3	3-hidroksibenzaldehyd	1-(bromometil)-4-metilbenzen
4	3-hidroksibenzaldehyd	1-(klorometil)-4-fluorobenzen
5	3-hidroksibenzaldehyd	1-(bromometil)-4-(trifluorometil)benzen
6	4-hidroksibenzaldehyd	1-(klorometil)-4-klorobenzen

Reakcijsko zmes smo segrevali 4 ure pri 50 °C. Po 4-ih urah smo s TLC-jem preverili, če je reakcija potekla. Če so bili vidni še izhodni reagenti, smo reakcijo pustili teči, dokler ni potekla v celoti. Po končani reakciji smo topilo odparili pod znižanim tlakom, ostanku pa dodali 50 ml etilacetata in 30 ml vode. Organsko fazo smo nato sprali z nasičeno raztopino

natrijevega klorida ter jo posušili z natrijevim sulfatom. Sušilno sredstvo smo odfiltrirali, topilo pa odparili pod znižanim tlakom. Pri spojini **6** smo organsko fazo prehodno spirali še z 1 M natrijevim hidroksidom. Pri produktih **2** in **4** je bil prisoten še izhodni aldehyd, zato smo ju očistili s kolonsko kromatografijo. Uporabili smo sledeče mobilne faze:

- **2** (MF: etilacetat/heksan = 1/4)
- **4** (MF: etilacetat/heksan = 1/2)

4.2 SINTEZA 2-SUBSTITUIRANIH KINAZOLINONOV



V 25 ml bučko smo dali antranilamid (136,15 mg, 1 mmol) in aldehyd. Uporabljeni aldehydi in njihova količina so podani v spodnji tabeli.

Preglednica II: Prikaz uporabljenih aldehydov pri sintezi 2-substituiranih kinazolinonov

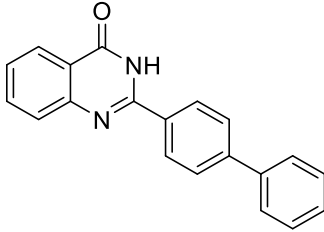
Spojina	Aldehyd	Količina
7	4-difenilkarbaldehyd	182 mg (1 mmol)
8	furan-2-karbaldehyd	84 μ L (1 mmol)
9	5- bromo-2-furaldehyd	175 mg (1 mmol)
10	3-((3-klorobenzil)oksi)benzaldehyd	260 mg (1 mmol)
11	4-((3-klorobenzil)oksi)benzaldehyd	271 mg (1,1 mmol)
12	3-((4-metilbenzil)oksi)benzaldehyd	260 mg (1,15mmol)
13	4- fluorobenzaldehyd	116 μ L (1,1 mmol)
14	3- klorobenzaldehyd	155 mg (1,1 mmol)
15	3, 4–difluorobenzaldehyd	121 μ L (1,1 mmol)
16	5-nitro-2-furaldehyd	155 mg (1,1 mmol)
17	5-nitro-2-furaldehyd	155 mg (1,1 mmol)
18	3-benziloksibenzaldehyd	233 mg (1,1 mmol)
19	4- (dietiloksimetil)benzaldehyd	219 μ L (1,1 mmol)
20	5-metil-2-furaldehyd	100 μ L (1 mmol)
21	5-(1 <i>H</i> - pirazol-5-il)furaldehyd	162 mg (1 mmol)

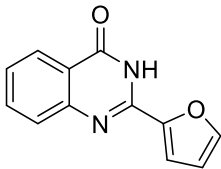
<u>22</u>	3-((4-fluorobenzil)oksi)benzaldehyd	253 mg (1,1mmol)
<u>23</u>	3-((4-(trifluorometil)benzil)oksi)benzaldehyd	308 mg (1,1mmol)
<u>24</u>	5-hidroksimetil-2-furaldehyd	126 mg (1 mmol)
<u>25</u>	3-furaldehyd	87 μ L (1 mmol)
<u>26</u>	4-((4-klorobenzil)oksi)benzaldehyd	299 mg (1,1mmol)
<u>27</u>	Cinamaldehyd	126 μ L (1 mmol)
<u>28</u>	4-(piridin-4-il)benzaldehyd	183 mg (1 mmol)

Reagentoma smo dodali 5 ml DMSO. Reakcijsko zmes smo nato segrevali pri 100 °C čez noč. Drugi dan smo s TLC-jem preverili, če je reakcija v celoti potekla, nato smo reakcijsko zmes zlili v 50 ml hladne vode. Oborino, ki je pri tem nastala, smo odfiltrirali s presesavanjem. Produkt smo očistili s prekrizalizacijo iz etanola oz. metanola (spojina **8**). Spojine **13**, **15**, **16** in **26** je bilo potrebno še dodatno očistiti s kolonsko kromatografijo.

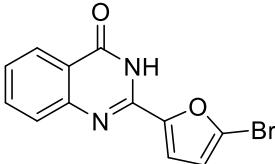
Pri spojini **13** smo čiščenje začeli z mobilno fazo etilacetat/heksan = 1/2, nato pa smo zmanjšali delež heksana in uporabili etilacetat/heksan= 1/1. Za izolacijo spojin **15** in **26** smo kot mobilno fazo uporabili etilacetat/heksan= 1/1.

Nekoliko več težav smo imeli pri čiščenju spojine **16**. Po končani reakciji med antranilamidom in 5-nitro-2-furaldehydom smo na TLC-ju opazili dve lisi, zgornja je pripadala želeni spojini **16**, spodnja lisa pa je bil neoksidiran produkt **17**. Očistiti in izolirati smo želeli obe spojini. Reakcijo smo ponovili in produkta iz vode izolirali z ekstrakcijo z etilacetatom. Po ekstrakciji smo organsko fazo sprali z nasičeno raztopino natrijevega klorida ter jo posušili z natrijevim sulfatom. Sušilno sredstvo smo odfiltrirali, topilo pa odparili pod znižanim tlakom. Za čiščenje smo uporabili kolonsko kromatografijo z različnimi mobilnimi fazami. Začeli smo z etilacetat/heksan= 1/1, pri kateri smo izolirali spojino **16**, nato pa smo polarnost mobilne faze postopoma povečevali na etilacetat/heksan= 2/1, etilacetat/heksan= 3/1 in na koncu uporabili mobilno fazo etilacetat/metanol= 10/1, saj je spojina **17** bolj polarna.

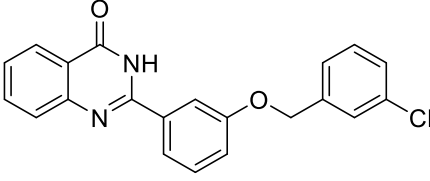
Spojina 7	
2-((1,1-bifenil)-4-il)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: bela trdna snov	Izkoristek reakcije: 78 %
Molekulska formula: C ₂₀ H ₁₄ N ₂ O	Rf (mobilna faza): 0,52 (etilacetat/heksan = 1/1)
Molekulska masa: 298,338 g/mol	Tališče: 268-271 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO- <i>d</i> ₆) δ (ppm)	7,42-7,61 (m, 4H, Ar-H), 7,71-7,95 (m, 6H, Ar-H), 8,11-8,38 (m, 3H, Ar-H), 12,59 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, TFA) δ (ppm)	120,30; 121,96; 123,76; 129,41; 130,52; 131,14; 131,26; 131,41; 131,90; 133,26; 139,88; 140,24; 141,16; 153,43; 159,86; 164,12
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 299, 1184 [M+H] ⁺ izmerjena vrednost (m/z): 299, 1182
IR (ATR)	3029, 1664, 1596, 1578, 1482, 1444, 1303, 1287, 940, 849, 765, 735, 696, 684, 652, 621, 555, 545, 534, 509 cm ⁻¹
HPLC	tr = 11,357 min (99,4 % čistost)

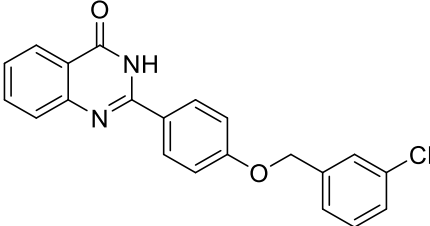
Spojina 8	
2-(furan-2-il)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: rjavi kristali	Izkoristek reakcije: 32 %
Molekulska formula: C ₁₂ H ₈ N ₂ O ₂	Rf (MF): 0,26 (etilacetat/heksan = 1/1)
Molekulska masa: 212,059 g/mol	Tališče: 155-158 °C
¹H NMR	6,76 (q, 1H, <i>J</i> = 1,8 Hz, Ar-H), 7,50 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 7,9 Hz, <i>J</i> ₂

(400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm)	= 7,0 Hz, $J_3 = 1,0$ Hz, Ar-H), 7,64 (d, 1H, $J = 3,4$ Hz, Ar-H), 7,70 (d, 1H, $J = 7,6$ Hz, Ar-H), 7,82 (td, 1H, $J_1 = 7,7$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, Ar-H), 8,01 (d, 1H, $J = 1,4$ Hz, Ar-H), 8,13 (dd, 1H, $J_1 = 7,9$ Hz, $J_2 = 1,3$ Hz, Ar-H), 12,52 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm)	112,49; 114,47; 121,12; 125,90; 126,45; 127,22; 134,62; 143,97; 146,07; 146,58; 148,63; 161,54
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 213,0664 [M+H] ⁺ izmerjena vrednost (m/z): 213,0670
IR (ATR)	3122, 3025, 1659, 1601, 1621, 1552, 1501, 1458, 1448, 1311, 1241, 964, 900, 883, 770, 755, 685, 623, 594, 552, 529, 505 cm ⁻¹
HPLC	tr = 6,050 min (99,7 % čistost)

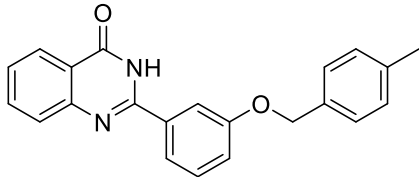
Spojina 9 2-(5-bromofuran-2-il)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: svetlo rjavi kristali	Izkoristek reakcije: 44 %
Molekulska formula: C ₁₂ H ₇ BrN ₂ O ₂	Rf (MF): 0,57 (etilacetat/heksan = 1/1)
Molekulska masa: 289,969 g/mol	Tališče: 249-254 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm)	6,88 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, Ar-H), 7,47-7,53 (m, 1H, Ar-H), 7,66 (d, 1H, $J = 3,6$ Hz, Ar-H), 7,70-7,74 (m, 1H, Ar-H), 7,79-7,84 (m, 1H, Ar-H), 8,11 (dd, 1H, $J_1 = 7,9$ Hz, $J_2 = 0,8$ Hz, Ar-H), 12,54 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm)	114,56; 116,83; 121,19; 125,90; 126,34; 126,67; 127,30; 134,67; 142,95; 147,83; 148,41; 161,44
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 290, 9769[M+H] ⁺ izmerjena vrednost (m/z): 290, 9763
IR (ATR)	3100, 3014, 2891, 1651, 1621, 1602, 1553, 1501, 1456, 1344,

	1223, 1038, 975, 905, 855, 776, 558, 505 cm^{-1}
HPLC	tr = 8,337 min (95,4% čistost)

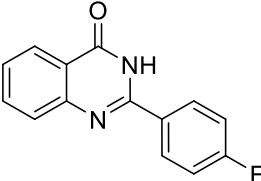
Spojina 10	
2-(3-((3-klorobenzil)oksi)fenil)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: bela trdna snov	Izkoristek reakcije: 74 %
Molekulska formula: $\text{C}_{21}\text{H}_{15}\text{ClN}_2\text{O}_2$	Rf (MF): 0,52 (etilacetat/heksan = 1/1)
Molekulska masa: 362,809 g/mol	Tališče: 215-218 $^{\circ}\text{C}$
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm)	5,25 (s, 2H, CH_2), 7,24 (ddd, 1H, $J_1 = 8,0$ Hz, $J_2 = 2,6$ Hz, $J_3 = 0,6$ Hz, Ar-H), 7,40-7,58 (m, 6H, Ar-H), 7,74-7,76 (m, 1H, Ar-H), 7,81-7,88 (m, 3H, Ar-H), 8,16 (dd, 1H, $J_1 = 8,0$ Hz, $J_2 = 1,2$ Hz, Ar-H), 12,55 (s, 1H, NH)
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm)	68,52; 113,64; 118,21; 120,49; 120,98; 125,85; 126,23; 126,67; 127,35; 127,44; 127,81; 129,85; 130,41; 133,12; 134,02; 134,63; 135,48; 136,42; 139,44; 158,21; 162,24
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 363,0900 $[\text{M}+\text{H}]^+$ izmerjena vrednost (m/z): 363,0905
IR (ATR)	3044, 1672, 1612, 1582, 1471, 1311, 1249, 1219, 1032, 867, 850, 767, 721, 681, 535, 522 cm^{-1}
HPLC	tr = 12,670 min (96,1 % čistost)

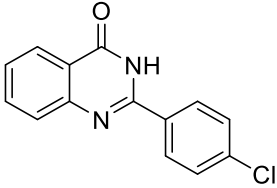
Spojina 11	
2-(4-((3-klorobenzil)oksi)fenil)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: bela trdna snov	Izkoristek reakcije: 67 %

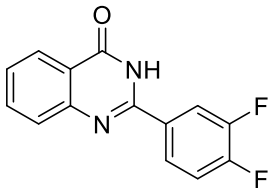
Molekulska formula: C ₂₁ H ₁₅ ClN ₂ O ₂	Rf (MF): 0,43 (etilacetat/heksan = 1/1)
Molekulska masa: 362,809 g/mol	Tališče: 237-239 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	5,24 (s, 2H, CH ₂), 7,18 (d, 2H, <i>J</i> = 8,6 Hz, Ar-H), 7,43-7,56 (m, 5H, Ar-H), 7,70 (d, 1H, <i>J</i> = 8,1 Hz, Ar-H), 7,82 (t, 1H, <i>J</i> = 7,0 Hz, Ar-H), 8,14 (d, 1H, <i>J</i> = 7,7 Hz, Ar-H), 8,20 (d, 2H, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H), 12,43 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	68,42; 114,80; 118,20; 120,67; 125,08; 125,80; 126,08; 126,16; 127,18; 127,29; 127,77; 128,60; 129,37; 130,42; 133,02; 134,55; 139,23; 148,78; 151,77; 160,63; 162,16
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 363,0900[M+H] ⁺ izmerjena vrednost (m/z): 363,0906
IR (ATR)	3067, 1667, 1605, 1562, 1524, 1486, 1291, 1250, 1226, 1190, 1034, 941, 834, 767, 703, 680, 623 cm ⁻¹
HPLC	tr = 11,887 min (95,8 % čistost)

Spojina <u>12</u>	
2-(3-((4-metilbenzil)oksi)fenil)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: bela trdna snov	Izkoristek reakcije: 66 %
Molekulska formula: C ₂₂ H ₁₈ N ₂ O ₂	Rf (MF): 0,50 (etilacetat/heksan = 1/1)
Molekulska masa: 342,391 g/mol	Tališče: 193-195 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	2,31 (s, 3H, CH ₃), 5,17 (s, 2H, CH ₂), 7,21 (d, 3H, <i>J</i> = 6,9 Hz), 7,38 (d, 2H, <i>J</i> = 7,2 Hz, Ar-H), 7,45 (t, 1H, <i>J</i> = 7,4 Hz, Ar-H), 7,53 (t, 1H, <i>J</i> = 7,4 Hz, Ar-H), 7,74-7,85 (m, 4H, Ar-H), 8,16 (d, 1H, <i>J</i> = 7,5 Hz, Ar-H), 12,54 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	20,66; 69,27; 113,47; 118,25; 120,24; 121,00; 125,83; 126,64; 127,53; 127,85; 129,00; 129,76; 133,77; 133,95; 134,62; 137,15; 148,63; 151,92; 158,37; 162,10
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 343,1447 [M+H] ⁺

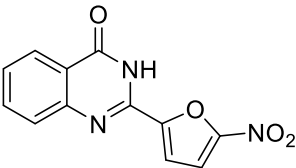
	izmerjena vrednost (m/z): 343,1445
IR (ATR)	3030, 2918, 2875, 1670, 1611, 1585, 1562, 1470, 1310, 1266, 1250, 1222, 1214, 1028, 1040, 905, 851, 800, 768, 721, 683, 635, 540 cm ⁻¹
HPLC	tr = 12,450 min (99,1 % čistost)

Spojina <u>13</u>	
2-(4-fluorofenil)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: beli igličasti kristali	Izkoristek reakcije: 56 %
Molekulska formula: C ₁₄ H ₉ FN ₂ O	Rf (MF): 0,45 (etilacetat/heksan = 1/1)
Molekulska masa: 240,232 g/mol	Tališče: 281 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	7,38-7,49 (m, 2H, Ar-H), 7,50-7,59 (m, 1H, Ar-H), 7,71-7,91 (m, 2H, Ar-H), 8,13-8,21 (m, 1H, Ar-H), 8,23-8,33 (m, 2H, Ar-H), 12,58 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	115,61 (d, J _{C,F} = 22,34 Hz); 120,86; 125,82; 126,60; 127,44; 129,20; 130,35 (d, J _{C,F} = 9,0 Hz); 134,63; 148,62; 151,33; 162,22; 163,98 (d, J _{C,F} = 250,2 Hz)
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 21,0777 [M+H] ⁺ izmerjena vrednost (m/z): 241,0778
IR (ATR)	3171, 3047, 1660, 1601, 1581, 1483, 1470, 1288, 1232, 1166, 939, 839, 809, 764, 734, 685, 633, 613, 572, 542, 519 cm ⁻¹
HPLC	tr = 8,240 min (99,8 % čistost)

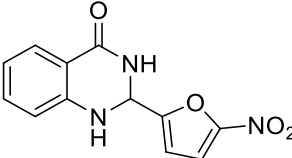
Spojina 14	
2-(4-klorofenil)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: bela trdna snov	Izkoristek reakcije: 59 %
Molekulska formula: C ₁₄ H ₉ ClN ₂ O	Rf (MF): 0,51 (etilacetat/heksan = 1/1)
Molekulska masa: 256,687 g/mol	Tališče: 310-313 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	7,54 (t, 1H, <i>J</i> = 7,3 Hz, Ar-H), 7,63 (d, 2H, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H), 7,75 (d, 1H, <i>J</i> = 8,0 Hz, Ar-H), 7,85 (t, 1H, <i>J</i> = 7,5 Hz, Ar-H), 8,16 (d, 1H, <i>J</i> = 7,8 Hz, Ar-H), 8,20 (d, 2H, <i>J</i> = 8,5 Hz, Ar-H), 12,62 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	120,95; 125,85; 126,77; 127,49; 128,67; 129,60; 131,51; 134,67; 136,27; 148,53; 151,32; 162,17
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 257,0482 [M+H] ⁺ izmerjena vrednost (m/z): 257,0485
IR (ATR)	3052, 1671, 1599, 1557, 1477, 1443, 1281, 1094, 938, 841, 826, 761, 722, 683, 623, 555, 538, 505 cm ⁻¹
HPLC	tr = 9,717 min (99,7 % čistost)

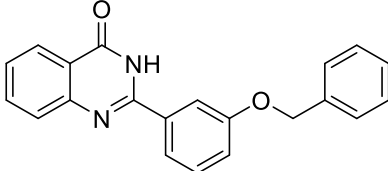
Spojina 15	
2-(3,4-difluorofenil)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: beli igličasti kristali	Izkoristek reakcije: 12 %
Molekulska formula: C ₁₄ H ₈ F ₂ N ₂ O	Rf (MF): 0,46 (etilacetat/heksan = 1/1)
Molekulska masa: 258,223 g/mol	Tališče: 270-275 °C
¹H NMR	7,55 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 1,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,2 Hz, <i>J</i> ₃ = 8,1 Hz, Ar-H),

(400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm)	7,65 (td, 1H, $J_1 = 10,5$ Hz, $J_2 = 8,5$ Hz, Ar-H), 7,75-7,78 (m, 1H, Ar-H), 7,84-7,88 (m, 1H, Ar-H), 8,08-8,12 (m, 1H, Ar-H), 8,16 (dd, 1H, $J_1 = 7,9$ Hz, $J_2 = 1,1$ Hz, Ar-H), 8,25 (ddd, 1H, $J_1 = 12,0$ Hz, $J_2 = 7,8$ Hz, $J_3 = 2,2$ Hz, Ar-H), 12,61 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm)	117,12 (d, $J_{C,F} = 19,5$ Hz); 117,92 (d, $J_{C,F} = 17,7$ Hz); 120,96; 125,25 (dd, $J_{C,F} = 3,3$ Hz, $J_{C,F} = 7,2$ Hz); 125,90; 126,94; 127,49; 130,31 (dd, $J_{C,F} = 2,3$ Hz, $J_{C,F} = 6,1$ Hz); 134,75; 148,37; 149,33 (dd, 1H, $J_{C,F} = 23,4$ Hz, $J_{C,F} = 235,1$ Hz); 150,47; 155,12 (m); 162,29
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 259,0683 [M+H] ⁺ izmerjena vrednost (m/z): 259,0678
IR (ATR)	3056, 2962, 2918, 2893, 1676, 1608, 1598, 1524, 1495, 1452, 1323, 1271, 1260, 1189, 1106, 979, 871, 769, 723, 691, 643, 575, 523 cm ⁻¹
HPLC	tr = 9,530 min (99,8 % čistost)

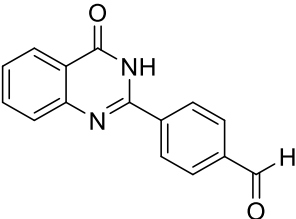
Spojina <u>16</u>	
2-(5-nitrofuran-2-il)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: rumena trdna snov	Izkoristek reakcije: 0,7 %
Molekulska formula: C ₁₂ H ₇ N ₃ O ₄	Rf (MF): 0,36 (etilacetat/heksan = 2/1)
Molekulska masa: 257,202 g/mol	Tališče: 310 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm)	7,60 (ddd, 1H, $J_1 = 8,1$ Hz, $J_2 = 7,0$ Hz, $J_3 = 1,3$ Hz, Ar-H), 7,83 (dd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 0,8$ Hz, Ar-H), 7,87-7,91 (m, 3H, Ar-H), 8,17 (dd, 1H, $J_1 = 7,9$ Hz, $J_2 = 1,0$ Hz, Ar-H), 12,94 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d₆) δ (ppm)	113,92; 116,33; 121,72; 125,98; 127,80; 134,92; 142,45; 147,20; 147,91; 152,41; 161,42

ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 258,0515 [M+H] ⁺ izmerjena vrednost (m/z): 258,0514
IR (ATR)	3096, 2925, 2858, 1686, 1536, 1474, 1391, 1350, 1337, 1289, 1248, 1027, 907, 807, 773, 738, 631, 563 cm ⁻¹
HPLC	tr = 7,693 min (95,2 % čistost)

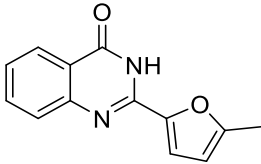
Spojina 17	
2-(5-nitrofuran-2-il)-2,3-dihidrokinazolin-4(1H)-on	
	
Izgled: rumena trdna snov	Izkoristek reakcije: 3,8 %
Molekulska formula: C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₄	Rf (MF): 0,20 (etilacetat/heksan = 2/1)
Molekulska masa: 259,221 g/mol	Tališče: 240 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	5,91-5,93 (t, 1H, CH), 6,60 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 3,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 0,7 Hz, Ar-H), 6,70-6,74 (m, 1H, Ar-H), 6,81 (d, 1H, <i>J</i> = 8,1 Hz, NH), 7,28 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,3 Hz, <i>J</i> ₃ = 1,6 Hz, Ar-H), 7,51 (s, 1H, Ar-H), 7,59-7,63 (m, 2H, Ar-H), 8,69 (d, 1H, <i>J</i> = 3,4 Hz, NH)
¹³C NMR (MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	59,79; 111,22; 113,72; 114,77; 114,90; 117,88; 127,41; 133,62; 146,46; 151,11; 158,60; 162,84
ESI- HRMS	Izračunana vrednost (m/z): 260,0671[M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 260,0671

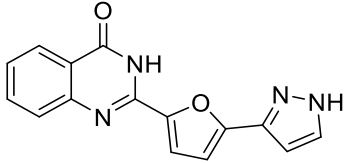
Spojina 18	
2-(3-(benziloksi)fenil)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: bela trdna snov	Izkoristek reakcije: 35 %

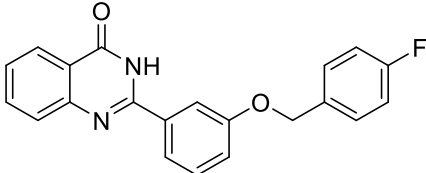
Molekulska formula: C ₂₁ H ₁₆ N ₂ O ₂	Rf (MF): 0,52 (etilacetat/heksan = 1/1)
Molekulska masa: 328,364 g/mol	Tališče: 205-206 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	5,23 (s, 2H, CH ₂), 7,23 (dd, 1H, J ₁ = 8,2 Hz, J ₂ = 1,9 Hz, Ar-H), 7,33-7,38 (m, 1H, Ar-H), 7,40-7,56 (m, 6H, Ar-H), 7,75 (d, 1H, J = 7,9 Hz, Ar-H), 7,81-7,89 (m, 3H, Ar-H), 8,17 (dd, 1H, J ₁ = 7,9 Hz, J ₂ = 1,1 Hz, Ar-H), 12,56 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	69,43; 113,52; 118,20; 120,27; 120,97; 125,80; 126,61; 127,49; 127,72; 127,87; 128,43; 129,75; 133,94; 134,59; 136,79; 148,59; 151,87; 158,42; 162,16
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 329,1290 [M+H] ⁺ izmerjena vrednost (m/z): 329,1293
IR (ATR)	3197, 1660, 1575, 1561, 1289, 1243, 1226, 1024, 901, 862, 804, 772, 747, 723, 700, 676, 623, 538, 521 cm ⁻¹
HPLC	tr = 11,573 min (97,1 % čistost)

Spojina <u>19</u>	
4-(4-okso-3,4-dihidrokinazolin-2-il)benzaldehyd	
	
Izgled: bela trdna snov	Izkoristek reakcije: 73 %
Molekulska formula: C ₁₅ H ₁₀ N ₂ O ₂	Rf (MF): 0,20 (etilacetat/heksan = 1/1)
Molekulska masa: 250,252 g/mol	Tališče: Nad 300 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	7,56 (t, 1H, J = 7,2 Hz, Ar-H), 7,76-7,79 (m, 1H, Ar-H), 7,84-7,89 (m, 1H, Ar-H), 8,06 (d, 2H, J = 8,3 Hz, Ar-H), 8,17 (d, 1H, J = 7,9 Hz, Ar-H), 8,37 (d, 2H, J = 8,4 Hz, Ar-H), 10,11 (s, 1H, CHO), 12,73 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	121,13; 125,85; 127,08; 127,67; 127,88; 128,50; 129,46; 134,68; 137,65; 148,42; 151,37; 162,06; 192,83
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 251,0821 [M+H] ⁺

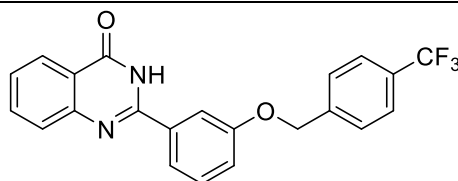
	izmerjena vrednost (m/z): 251,0824
HPLC	tr = 7,633 min (95,0 % čistost)

Spojina <u>20</u>	
2-(5-metilfuran-2-il)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: rumena trdna snov	Izkoristek reakcije: 14 %
Molekulska formula: C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₂	Rf (MF): 0,35 (etilacetat/heksan = 2/1)
Molekulska masa: 226,231 g/mol	Tališče: 195-206°C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	2,41 (s, 3H, CH ₃), 6,38 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 3,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 0,9 Hz, Ar-H), 7,47 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,1 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,2 Hz, <i>J</i> ₃ = 1,1 Hz, Ar-H), 7,55 (d, 1H, <i>J</i> = 3,4 Hz, Ar-H), 7,67-7,70 (m, 1H, Ar-H), 7,80 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,1 Hz, <i>J</i> ₃ = 1,6 Hz, Ar-H), 8,10 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 7,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,2 Hz, Ar-H), 12,38 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	13,59; 109,02; 115,93; 120,95; 125,94; 126,27; 127,15; 134,69; 143,98; 144,42; 148,82; 156,26; 161,66
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 227,0821 [M+H] ⁺ izmerjena vrednost (m/z): 227,0826
IR (ATR)	3117, 2960, 2923, 1653, 1626, 1604, 1580, 1563, 1528, 1466, 1450, 1346, 1316, 1247, 1045, 1000, 871, 852, 839, 802, 772, 785, 723, 621, 553, cm ⁻¹
HPLC	tr = 6,610 min (98,6 % čistost)

Spojina <u>21</u>	
2-(5-(1H-pirazol-3-il)furan-2-il)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: rjava trdna snov	Izkoristek reakcije: 31 %
Molekulska formula: C ₁₅ H ₁₀ N ₄ O ₂	Rf (MF): 0,15 (etilacetat/heksan = 3/1)
Molekulska masa: 278,266 g/mol	Tališče: 190–193 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	6,85 (d, 1H, <i>J</i> = 1,2 Hz, Ar-H), 6,95 (t, 1H, <i>J</i> = 2,1 Hz, Ar-H), 7,49 (t, 1H, <i>J</i> = 7,4 Hz, Ar-H), 7,68 (d, 1H, <i>J</i> = 2,2 Hz, Ar-H), 7,72 (d, 1H, <i>J</i> = 8,1 Hz, Ar-H), 7,82 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,2 Hz, <i>J</i> ₃ = 1,5 Hz, Ar-H), 7,88 (s, 1H, Ar-H), 8,13 (dd, 1H, <i>J</i> = 7,3 Hz, Ar-H), 12,55 (s, 1H, NH), 13,20 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	103,00; 107,57; 116,33; 120,98; 125,92; 126,27; 127,08; 129,83; 134,62; 141,98; 143,86; 144,64; 148,65; 152,39; 161,46
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 277,0726 [M-H] ⁻ izmerjena vrednost (m/z): 277,0734
IR (ATR)	3108, 1677, 1659, 1594, 1467, 1413, 1021, 910, 838, 805, 766, 684, 627, 601, 555, 529, 508 cm ⁻¹
HPLC	tr = 7,037 min (95,6 % čistost)

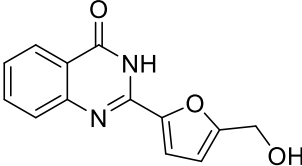
Spojina <u>22</u>	
2-(3-((4-fluorobenzil)oksi)fenil)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: bela trdna snov	Izkoristek reakcije: 81 %
Molekulska formula: C ₂₁ H ₁₅ FN ₂ O ₂	Rf (MF): 0,52 (etilacetat/heksan = 2/1)
Molekulska masa: 346,354 g/mol	Tališče: 205-208 °C

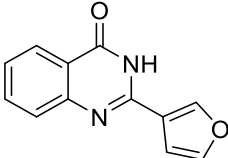
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	5,20 (s, 2H, CH ₂), 7,21-7,27 (m, 3H, Ar-H), 7,47 (t, 1H, <i>J</i> = 8,0 Hz, Ar-H), 7,51-7,57 (m, 3H, Ar-H), 7,74-7,77 (m, 1H, Ar-H), 7,81-7,87 (m, 3H, Ar-H), 8,16 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 7,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,1 Hz, Ar-H), 12,55 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	68,72; 113,51; 115,27 (d, <i>J</i> _{C,F} = 21,4 Hz); 118,20; 120,33; 120,97; 125,79; 126,58; 127,49; 129,74; 130,01 (d, <i>J</i> _{C,F} = 8.4 Hz); 133,05 (d, <i>J</i> _{C,F} = 3,0 Hz); 133,95; 134,56; 148,59; 151,83; 158,32; 161,76 (d, <i>J</i> _{C,F} = 243,8 Hz), 162,16
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 347,1196[M+H] ⁺ izmerjena vrednost (m/z): 347,1200
IR (ATR)	3046, 1656, 1605, 1576, 1562, 1513, 1470, 1248, 1226, 1211, 1158, 1025, 862, 820, 804, 766, 720, 682, 538, 523, cm ⁻¹
HPLC	tr = 11,703 min (99,0 % čistost)

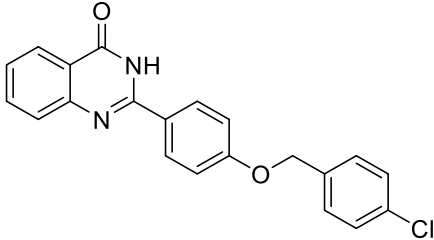
Spojina 23**2-(3-((4-(trifluorometil)benzil)oksi)fenil)kinazolin-4(3H)-on**

Izgled: bela trdna snov	Izkoristek reakcije: 71 %
Molekulska formula: C ₂₂ H ₁₅ F ₃ N ₂ O ₂	Rf (MF): 0,54 (etilacetat/ heksan = 2/1)
Molekulska masa: 396,362 g/mol	Tališče: 225-227 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	5,35 (s, 2H, CH ₂), 7,24 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,2 Hz <i>J</i> ₂ = 1.9 Hz, Ar-H), 7,48 (t, 1H, <i>J</i> = 8.0 Hz, Ar-H), 7,53 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,1 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,1 Hz, <i>J</i> ₃ = 1,1 Hz, Ar-H), 7,71-7,76 (m, 3H, Ar-H), 7,78-7,80 (m, 2H, 3 x Ar-H), 7,82-7,90 (m, 3H, 3 x Ar-H), 8,16 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 7,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,2 Hz, Ar-H), 12,55 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	68,58; 113,66; 118,24; 120,59; 121,01; 124,20 (q, <i>J</i> _{C,F} = 272,1 Hz); 125,42; 125,87; 126,73; 127,55; 128,07; 128,4 (d, <i>J</i> _{C,F} = 31,8 Hz); 129,92; 134,08; 134,69; 141,76; 148,63; 151,89;

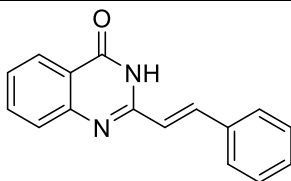
	158,20; 162,25
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 397,1164[M+H] ⁺ izmerjena vrednost (m/z): 397,1162
IR (ATR)	3084, 1668, 1600, 1573, 1319, 1249, 1221, 1209, 1163, 1147, 1111, 1067, 1043, 1020, 963, 901, 825, 772, 722, 677, 570, cm ⁻¹
HPLC	tr = 12,973 min (99,8 % čistost)

Spojina 24	
2-(5-(hidroksimetil)furan-2-il)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: rumeni igličasti kristali	Izkoristek reakcije: 17 %
Molekulska formula: C ₁₃ H ₁₀ N ₂ O ₃	Rf (MF): 0,28 (etilacetat/heksan = 3/1)
Molekulska masa: 242,230 g/mol	Tališče: 229-231 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	4,52 (d, 2H, <i>J</i> = 5,8 Hz, CH ₂), 5,48 (d, 1H, <i>J</i> = 5,9 Hz, OH), 6,56 (d, 1H, <i>J</i> = 3,5 Hz, Ar-H), 7,49 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,1 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,1 Hz, <i>J</i> ₃ = 1,2 Hz, Ar-H), 7,60 (d, 1H, <i>J</i> = 3,5 Hz, Ar-H), 7,70 (d, 1H, <i>J</i> = 7,6 Hz, Ar-H), 7,79-7,83 (m, 1H, Ar-H), 8,12 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 7,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,1 Hz, Ar-H), 12,44 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	55,73; 109,30; 115,31; 121,03; 125,86; 126,35; 127,16; 134,62; 143,90; 144,96; 148,66; 159,30; 161,53
ESI- HRMS	Izračunana vrednost (m/z): 243,0770 [M+H] ⁺ Izmerjena vrednost (m/z): 243,0776
IR (ATR)	3120, 2923, 1669, 1604, 1622, 1584, 1565, 1464, 1320, 1215, 1038, 1019, 994, 880, 801, 771, 743, 721, 685, 642, 557, 531 cm ⁻¹
HPLC	tr = 5,233 min (97,0 % čistost)

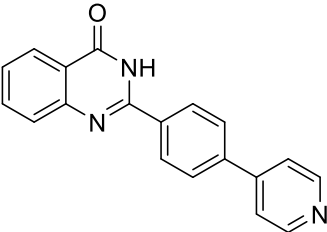
Spojina 25	
2-(furan-3-il)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: rjava trdna snov	Izkoristek reakcije: 38 %
Molekulska formula: C ₁₂ H ₈ N ₂ O ₂	Rf (MF): 0,41 (etilacetat/heksan = 2/1)
Molekulska masa: 212,204 g/mol	Tališče: 244-247 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	7,16 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 0,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,9 Hz, Ar-H), 7,47-7,51 (m, 1H, Ar-H), 7,66 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,1 Hz, <i>J</i> ₃ = 0,6 Hz, Ar-H), 7,81 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,1 Hz, <i>J</i> ₃ = 1,6 Hz, Ar-H), 7,86 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 1,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,5 Hz, Ar-H), 8,12 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,1 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,3 Hz, Ar-H), 8,63 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 1,5 Hz, <i>J</i> ₂ = 0,8 Hz, Ar-H), 12,42 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	109,01; 120,92; 121,41; 125,82; 126,23; 127,02; 134,53; 144,71; 145,01; 147,16; 148,80; 161,86
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 213,0664 [M+H] ⁺ izmerjena vrednost (m/z): 213,0661
IR (ATR)	3132, 2963, 1672, 1605, 1466, 1163, 1073, 1009, 909, 876, 862, 831, 779, 754, 723, 630, 598, 553 cm ⁻¹
HPLC	tr = 6,230 min (99,1 % čistost)

Spojina 26	
2-(4-((4-klorobenzil)oksi)fenil)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: bela trdna snov	Izkoristek reakcije: 25 %
Molekulska formula: C ₁₅ H ₁₁ ClN ₂ O ₂	Rf (MF): 0,75 (etilacetat/metanol = 3/1)

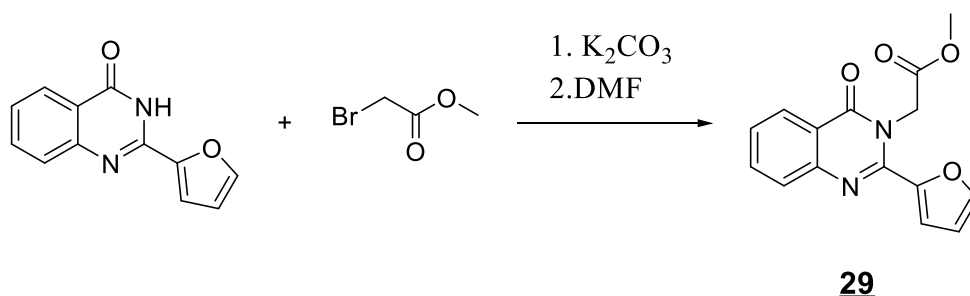
Molekulska masa: 362,813 g/mol		Tališče: 275-278 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO- d ₆) δ (ppm)	5,22 (s, 2H, CH ₂), 7,15-7,19 (m, 2H, Ar-H), 7,74-7,51 (m, 5H, Ar-H), 7,69-7,71 (m, 1H, Ar-H), 7,80-7,84 (m, 1H, Ar-H), 8,13 (dd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,0Hz, <i>J</i> ₂ = 1,2 Hz, Ar-H), 8,17-8,21 (m, 2H, Ar-H), 12,42 (s, 1H, NH)	
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d ₆) δ (ppm)	68,49; 114,77; 120,63; 125,07; 125,77; 126,13; 127,24; 128,38; 128,45; 129,42; 129,56; 132,49; 134,52; 135,66; 148,84; 151,75; 160,67;	
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 363,0900[M+H] ⁺ izmerjena vrednost (m/z): 363,0906	
IR (ATR)	3079, 2919, 1671, 1597, 1561, 1521, 1485, 1468, 1448, 1245, 1177, 1088, 1012, 940, 842, 815, 767, 741, 686, 614, 538 cm ⁻¹	
HPLC	tr = 11,873 min (94,8 % čistost)	

Spojina <u>27</u> (E)-2-stirilkinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: bela puhasta snov	Izkoristek reakcije: 60 %
Molekulska formula: C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O	Rf (MF): 0, 32 (etilacetat/heksan = 1/1)
Molekulska masa: 248, 279 g/mol	Tališče: 244–247 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO- d ₆) δ (ppm)	7,01 (d, 1H, <i>J</i> = 16,2 Hz, CH=CH), 7,39-7,50 (m, 4H, Ar-H), 7,65-7,69 (m, 3H, Ar-H), 7,82 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 8,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 7,1 Hz, <i>J</i> ₃ = 1,6 Hz, Ar-H), 7,95 (d, 1H, <i>J</i> = 16,2 Hz, CH=CH), 7,82 (ddd, 1H, <i>J</i> ₁ = 7,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 1,6 Hz, <i>J</i> ₃ = 0,5 Hz, Ar-H), 12,35 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO- d ₆) δ (ppm)	121,01; 121,04; 125,81; 126,18; 127,08; 127,57; 129,02; 129,73; 134,46; 134,92; 138,20; 148,94; 151,34; 161,68
ESI- HRMS	Izračunana vrednost (m/z): 249,1028 [M+H] ⁺

	Izmerjena vrednost (m/z): 249,1025
HPLC	tr = 8,327 min (97,5 % čistost)

Spojina <u>28</u>	
2-(4-(piridin-4-il)fenil)kinazolin-4(3H)-on	
	
Izgled: bela trdna snov	Izkoristek reakcije: 56 %
Molekulska formula: C ₁₉ H ₁₃ N ₃ O	Rf (MF): 0,10 (etilacetat/heksan = 3/1)
Molekulska masa: 299,326 g/mol	Tališče: Nad 300 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	7,54 (ddd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 7,1$ Hz, $J_3 = 1,2$ Hz, Ar-H), 7,76-7,79 (m, 1H, Ar-H), 7,82 (dd, 2H, $J_1 = 4,4$ Hz, $J_2 = 1,6$ Hz, Ar-H), 7,77 (ddd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 7,1$ Hz, $J_3 = 0,6$ Hz, Ar-H), 7,99-8,03 (m, 2H, Ar-H), 8,17 (dd, 1H, $J_1 = 7,9$ Hz, $J_2 = 1,1$ Hz, Ar-H), 8,33-8,36 (m, 2H, Ar-H), 8,69 (d, 2H, $J = 5,7$ Hz, Ar-H), 12,66 (s, 1H, NH)
¹³C NMR (100 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	121,02; 121,25; 125,83; 126,73; 126,96; 127,54; 128,50; 133,19; 134,64; 139,69; 145,76; 148,62; 150,33; 151,62; 162,17
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 300,1137 [M+H] ⁺ izmerjena vrednost (m/z): 300,1130
IR (ATR)	3027, 1669, 1593, 1561, 1468, 1304, 941, 862, 816, 767, 653, 546, 536, 510 cm ⁻¹
HPLC	tr = 5,693 min (99,4 % čistost)

4.3 SINTEZA METIL 2-(2-(FURAN-2-IL)-4-OKSOKINAZOLIN-3(4H)-IL)ACETATA (**29**)

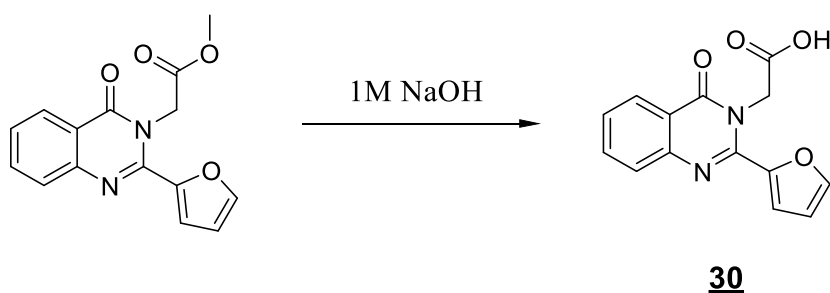


V bučko smo zatehtali 2-(furan-2-il)-kinazolin-4(3H)-on – spojino **8** (318,3 mg; 1,5 mmol), kalijev karbonat (311 mg; 2,25 mmol; 1,5 ekv.) in 8 mL DMF. Po petih minutah smo v reakcijsko zmes dodali še metil 2-bromoacetat (171 μ L; 1,8 mmol; 1,2 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. Celotno reakcijo smo izvajali v brezvodnih pogojih pod argonom. Drugi dan smo reakcijsko zmes ekstrahirali z etilacetatom in topilo odparili pod znižanim tlakom.

Spojina <u>29</u>	
metil 2-(2-(furan-2-il)-4-oksokinazolin-3(4H)-il)acetat	
Izgled: beli igličasti kristali	Izkoristek reakcije: 52 %
Molekulska formula: C ₁₅ H ₁₂ N ₂ O ₄	Rf (MF): 0,42 (etilacetat/heksan = 1/1)
Molekulska masa: 284,267 g/mol	Tališče: 117 °C
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d ₆) δ (ppm)	3,72 (s, 3H, CH ₃), 5,27 (s, 2H, CH ₂), 6,73 (dd, 1H, $J_1 = 3,4$ Hz, $J_2 = 1,8$ Hz, Ar-H), 7,28 (dd, 1H, $J_1 = 3,4$ Hz, $J_2 = 0,9$ Hz, Ar-H), 7,68 (ddd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 6,4$ Hz, $J_3 = 1,8$ Hz, Ar-H), 7,93-8,00 (m, 3H, Ar-H), 8,18 (ddd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 1,4$ Hz, $J_3 = 0,7$ Hz, Ar-H)
¹³C NMR (100 MHz, TFA)	55,78; 67,25; 115,81; 117,13; 121,12; 126,75; 127,63; 132,90; 141,65; 142,16; 146,43; 151, 52; 153,90; 171,96; 173,28

δ (ppm)	
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 285,0875 $[M+H]^+$ izmerjena vrednost (m/z): 285,0871
IR (ATR)	3143, 2953, 1744, 1578, 1480, 1434, 1393, 1363, 1346, 1218, 1180, 1157, 1102, 1005, 947, 883, 768, 712, 600 cm^{-1}
HPLC	tr = 9,053 min (99,6 % čistost)

4.4 SINTEZA 2-(2-(FURAN-2-IL)-4-OKSO-KINAZOLIN-3(4H)-IL)ETANOJSKE KISLINE (**30**)



V 5 ml acetona smo raztopili metil 2-(2-(furan-2-il)-4-oksokinazolin-3(4H)-il)acetat-spojino **30** in dodali 5 ml 1M natrijevega hidroksida. Reakcijsko zmes smo mešali na sobni temperaturi 40 min. Po 40-ih minutah smo pod nižanim tlakom odparili aceton (topilo) in dodali vodo ter 3M klorovodikovo kislino. Čez čas so izpadli beli kristali produkta.

Spojina 30	
2-(2-(furan-2-il)-4-okso-kinazolin-3(4H)-il)etanojska kislina	
Izgled: beli igličasti kristali	Izkoristek reakcije: 26 %
Molekulska formula: $\text{C}_{14}\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_4$	Rf (MF): 0,12 (etilacetat/metanol = 3/1)
Molekulska masa: 270,244 g/mol	Tališče: 225-229°C
^1H NMR (400 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm)	5,21 (s, 2H, CH_2), 6,75 (dd, 1H, $J_1 = 3,4$ Hz, $J_2 = 1,7$ Hz, Ar-H), 7,40 (dd, 1H, $J_1 = 3,4$ Hz, $J_2 = 0,9$ Hz, Ar-H), 7,68 (ddd, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 4,7$ Hz, $J_3 = 3,5$ Hz, Ar-H), 7,98-8,00

	(m, 3H, Ar-H), 8,18 (td, 1H, $J_1 = 8,2$ Hz, $J_2 = 1,1$ Hz, Ar-H), 1H iz COOH je izmenjan
^{13}C NMR (100 MHz, DMSO-d_6) δ (ppm)	59,25; 112,69; 115,91; 120,57; 125,62; 125,87; 126,62; 134,72; 144,14; 144,67; 146,50; 147,19; 161,05; 173,90
ESI- HRMS	izračunana vrednost (m/z): 271,0719 $[\text{M}+\text{H}]^+$ izmerjena vrednost (m/z): 271,0718
IR (ATR)	3327, 1728, 1583, 1567, 1471, 1459, 1405, 1233, 1105, 1007, 889, 792, 768, 590, 519 cm^{-1}
HPLC	tr = 6,050 min (99,8 % čistost)

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

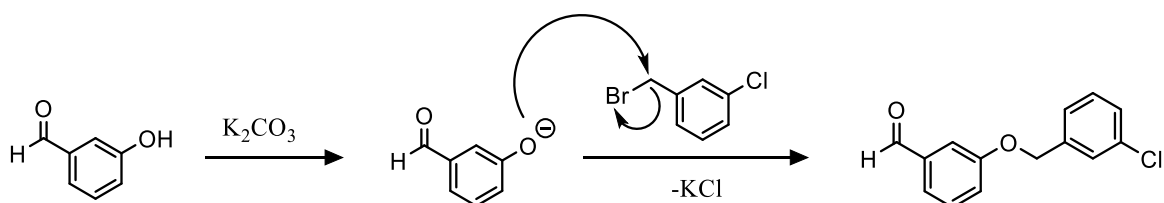
5.1 KOMENTAR SINTEZNIH POSTOPKOV

Kinazolinone lahko sintetiziramo po več različnih postopkih. Pogosto uporabljen postopek sinteze kinazolinonov je oksidativna ciklizacija iz Schiffove baze iz *o*-antranilamida in aldehydov ob prisotnosti oksidantov. Zaradi dodatka oksidantov nastane več stranskih produktov, kar vodi v manj čist produkt in posledično težje in dolgotrajnejše čiščenje produkta ter manjše izkoristke reakcije. Zato smo 2-substituirane derivate kinazolinona sintetizirali po novejšem postopku, z enostopenjsko reakcijo iz antranilamida in aldehyda ob prisotnosti kisika in topila DMSO (23).

Za sintezo spojin **10**, **11**, **12**, **22**, **23** in **26** smo predhodno z Williamsonovo sintezo etrov pripravili ustrezne benzaldehide. V primeru spojine **8** smo sintezo nadaljevali in substituirali amin na mestu 3 kinazolinonskega obroča ter tako dobili spojino **29**. Ester spojine **29** smo na koncu še hidrolizirali in tako dobili spojino **30**.

5.1.1 Sinteza etrov **1**, **2**, **3**, **4**, **5** in **6**

Spojine **1**, **2**, **3**, **4**, **5** in **6** smo sintetizirali po mehanizmu Williamsonove sinteze etrov. Po mehanizmu je reakcija nukleofilna substitucija drugega reda (S_N2). Pri reakciji z dodatkom baze povzročimo deprotonizacijo alkohola, ki tako postane boljši nukleofil. Alkoksidni anion nato reagira z ustreznim derivatom benzil halida, pri čemer nastane eter (24).



Slika 10: Mehanizem Williamsove sinteze etrov; povzeto po (24)

V našem primeru smo za reakcijo uporabili topilo aceton, za bazo pa K_2CO_3 . K reakcijski zmesi smo zaradi katalitičnega učinka dodali za konico spatule KI. Jodidni ion se zamenja z bromom oz. klorom benzil halida in ker je boljša izstopajoča skupina od broma oz. klora, nukleofilna substitucija lažje in hitreje poteče.

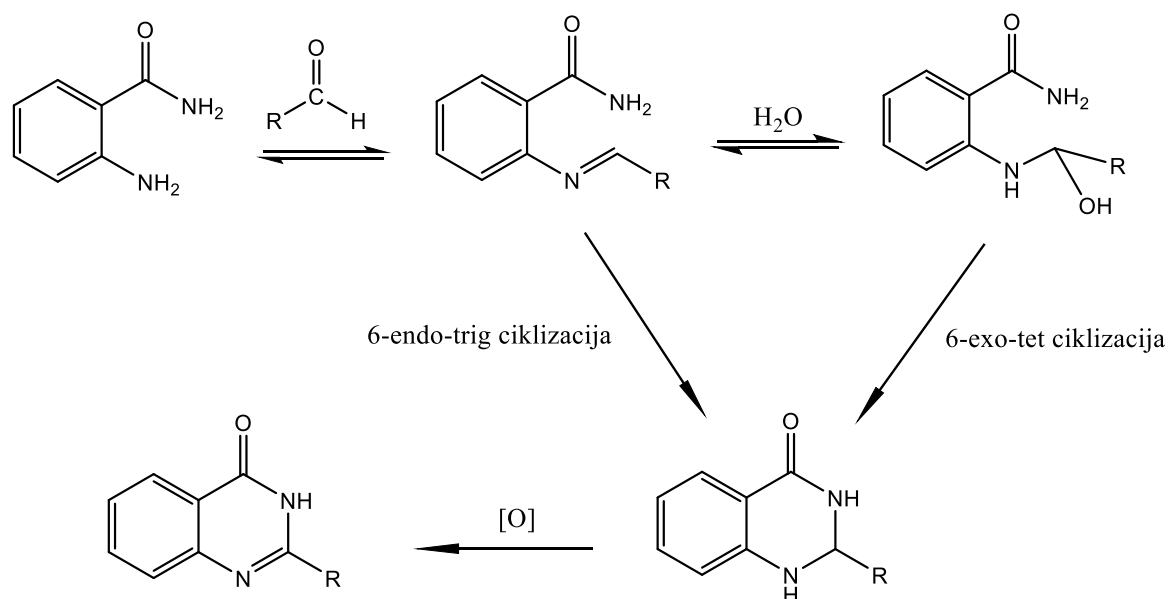
Najboljši izkoristek reakcije je bil pri sintezi spojine **1**, ki je znašal 92 %. Pri sintezi spojin **2**, **3**, **4** in **5** je bil izkoristek slabši, 24 %, 34%, 47% in 45 %. Slabši izkoristek pri spojinah

2 in 4 je posledica izgube produkta med čiščenjem s kolonsko kromatografijo, saj je v reakcijski zmesi bil prisoten še izhodni aldehyd. Najslabši izkoristek je bil pri sintezi spojine 6 in sicer le 17%, kar je prav tako posledica nedokončane reakcije in izgube produkta med izolacijo. Organsko fazo pri ekstrakciji spojine 6 smo dodatno spirali z 1M NaOH, da smo odstranili še prisoten izhodni aldehyd.

5.1.2 Sinteza 2-substituiranih derivatov kinazolinona

2-substituirane derivate kinazolinona smo sintetizirali z enostopenjsko reakcijo iz antranilamida in aldehyda ob prisotnosti kisika in topila (DMSO).

Po mehanizmu je reakcija oksidativna ciklizacija. Pri reakciji med antranilamidom in aldehydom pride najprej do tvorjenja imina oz. Schiffove baze. Mehanizem nastanka imina je nukleofilna substitucija s sledečo eliminacijo oz. kondenzacija, saj se pri reakciji odcepi voda. Nato sledi ciklizacija, ki lahko poteka po 2 mehanizmih. Hitrejša reakcija ciklizacije in z boljšim izkoristkom poteka po mehanizmu 6-ekso-tet ciklizacije. Za potek te reakcije ima pomembno vlogo voda, ki je prisotna v DMSO, saj deluje kot katalizator. Voda namreč reagira kot nukleofil in povzroči nastanek karbinolamina, ki se nato ciklizira po zgoraj omenjenem mehanizmu. Druga pot ciklizacije, ki je počasnejša od zgornje, poteka po mehanizmu 6-endo-trig ciklizacije direktno iz imina in ob odsotnosti vode. Na koncu se produkt pod vplivom kisika še oksidira, zato je tudi pomembno, da reakcijo izvajamo v odprti bučki (23, 25).



Slika 11: Mehanizem aerobne oksidacije v DMSO-ju; povzeto po (25)

Reakcijo smo izvajali v 25 mililitrskih bučkah z 1 mmol antranilamida in 1 mmol oz. 1,1 mmola aldehida v 5 ml DMSO, saj smo ugotovili, da reakcija z večjimi količinami ne poteče s tako dobrim izkoristkom. Prav tako ima tudi topilo vpliv na izkoristek reakcije in ta je najboljši, če reakcijo izvajamo v DMSO. Reakcijo smo izvajali čez noč (16–20h) pri 100 °C, saj sta tudi ta dva pogoja pripomogla k boljšemu izkoristku.

Po končani reakciji smo reakcijsko zmes zlili v 50 ml hladne vode, saj je produkt slabo topen v vodi in se izobori. Oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in na tak način enostavno izolirali produkt. Produkt smo nato očistili s prekristalizacijo iz etanola oz. metanola, v primeru spojine **8**. Pri sintezi spojin **13**, **15**, **16** in **26** tudi po kristalizaciji iz etanola nismo dobili čistega produkta, zato smo jih dodatno prečistili s kolonsko kromatografijo. Pri kolonski kromatografiji smo za mobilno fazo uporabili etilacetat in heksan v razmerju 1/1 za **15** in **26** in v razmerju etilacetat/hexan = 1/2 za spojino **13**.

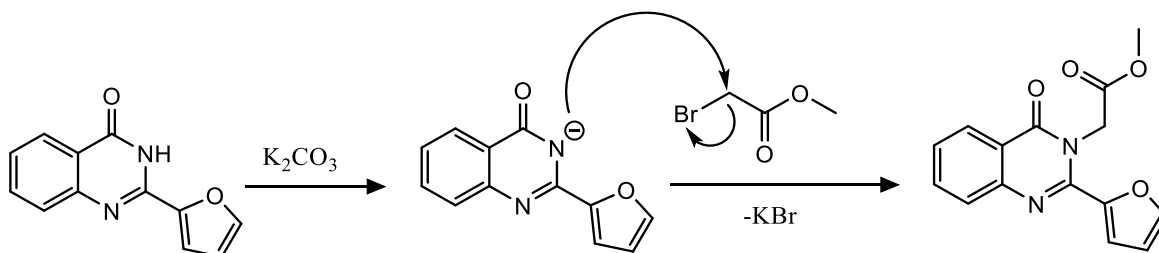
Nekoliko več težav smo imeli pri čiščenju spojine **16**. Po končani reakciji med antranilamidom in 5-nitro-2-furaldehidom smo na TLC plošči opazili dve lisi, zgornja je pripadala zeleni spojini **16**, spodnja lisa pa je bil neoksidiran produkt **17**. Ker je bila na TLC plošči spojine **17** konstantno prisotna zgornja lisa, ki pripada oksidirani obliki, smo predpostavili, da se spojina **17** sproti oksidira in prehaja v **16**. Spojino **16** smo uspeli očistiti do 95,2 % čistosti.

Pri spojini **19** smo opazili, da je med sintezo prišlo do odcepitve zaščitne skupine na aldehydni skupini na *para* mestu benzaldehida, saj ima končna spojina namesto dietiloksimetila aldehydno skupino.

Izkoristki reakcije so podani v tabeli za posamezno spojino. Najslabši izkoristki so pri sintezi spojin **16** in **17**, saj smo precej produkta izgubili pri ločevanju in čiščenju teh dveh spojin. Pri izolaciji spojin **15** in **24** se je izoborila manjša količina produkta, kar je opazno tudi pri samem izkoristku reakcije. Pri spojini **20** je slab izkoristek reakcije posledica topnosti spojine v etanolu, iz katerega smo jo izkristalizirali.

5.1.3 Sinteza spojine **29**

Z reakcijo *N*-alkiliranja spojine **8** z metil 2-bromoacetatom smo sintetizirali spojino **29**. *N*-alkiliranje je nukleofilna substitucija drugega reda. Substitucija poteče na sekundarnem aminu na mestu 3 2-substituiranega kinazolin-4(3*H*)-ona. Z bazo povzročimo odcep vodika z amina in nastanek resonančno stabiliziranega aniona. Anion kot nukleofil nato reagira z alkil halidom (metil 2-bromoacetatom), pri čemer nastane 2, 3 disubstituiran produkt.



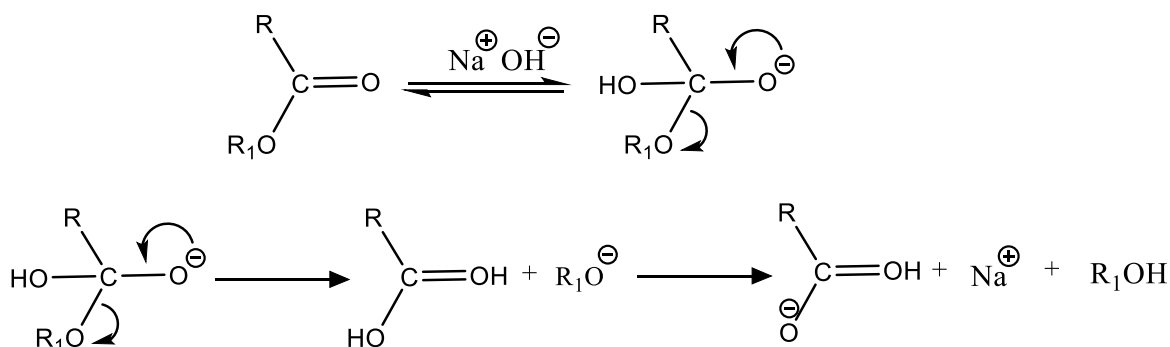
Slika 12: Mehanizem *N*-alkiliranja kinazolinona; povzeto po (26)

Reakcijo smo izvajali v polarnem aprotičnem topilu DMF, ki zaradi svojih lastnosti omogoča topnost nastalega aniona in favorizira potek nukleofilne substitucije (S_N2) (26).

2-substituiranemu kinazolin-4(3*H*)-onu smo dodali bazo K_2CO_3 , počakali 5 min in šele nato dodali izbrani alkil halid. S tem smo omogočili, da je najprej prišlo do deprotoniranja amina in nastanka nukleofila, ki je šele nato reagiral z alkil halidom. Celotno reakcijo smo izvajali v brezvodnih pogojih in v argonovi atmosferi. Izkoristek sinteze spojine **29** znaša 51 %.

5.1.4 Sinteza spojine **30**

Končno spojino **30** smo pripravili s hidrolizo spojine **29**. Hidrolizo estra lahko izvajamo v kislinski ali bazični pogoji. Ker je hidroliza estra s kislino reverzibilna reakcija, se hidrolizo pogosteje izvaja z uporabo baze. Hidroliza estra v alkalnem je bimolekularna ireverzibilna reakcija, ki poteka v dveh stopnjah po spodnjem mehanizmu. V zadnji, ireverzibilni stopnji hidrolize v alkalnem dobimo kislino in alkoholat, ki se zaradi razlike v kislosti takoj pretvorita v alkohol in karboksilatni ion (27).



Slika 13: Mehanizem hidrolize estra v alkalnem; povzeto po (27)

V našem primeru smo za hidrolizo estra uporabili 1M NaOH. Po končani hidrolizi smo pod znižanim tlakom odparili topilo in nastali alkohol, nato pa spojini dodali vodo in 3M HCl. Čez čas so izpadli beli kristali spojine, izkoristek reakcije je znašal 26 %.

5.2 TESTIRANJE

Sintetizirane spojine smo testirali in jim določili zaviralno delovanje na izoliranem encimu MurA iz *E. coli* in *S. aureus*. Katalitično aktivnost encima smo določali posredno z uporabo reagenta Biomol Green® (malahitno zeleno). Z reagentom Biomol Green® detektiramo sproščeni fosfat, ki nastane pri reakciji prenosa enolpiruvata s fosfoenolpiruvata na UDP-GlcNAc, katero katalizira encim MurA. Sproščeni fosfat ob prisotnosti molibdata tvori kompleks z malahitno zelenim, ki daje modro-zeleno barvo. Bolj kot spojina zavira delovanje encima MurA, manj fosfata se sprosti in posledično nastane manj obarvanega kompleksa.

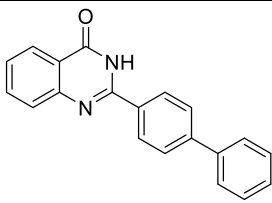
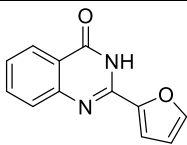
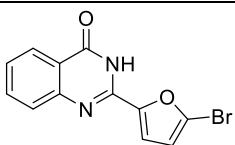
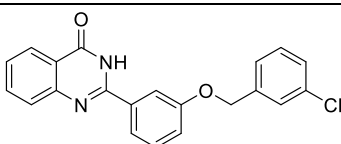
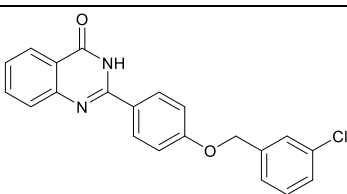
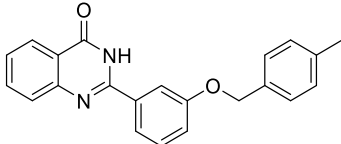
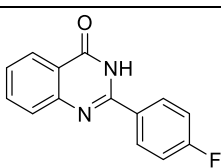
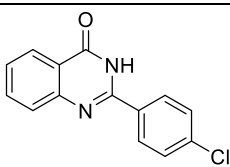
Rezultati testiranja za posamezne spojine so podani kot rezidualna aktivnost (RA), ki jo izračunamo tako, da aktivnost encima ob prisotnosti testirane spojine delimo z aktivnostjo encima brez prisotnosti spojine. Če je spojina močnejši zaviralec encima, določimo nižjo RA. Za spojine, ki so imele RA nižjo od 50 %, smo določili tudi vrednost IC₅₀. To je koncentracija spojine, pri kateri je rezidualna aktivnost 50 %. Določili smo jo tako, da smo izmerili RA pri 7 različnih koncentracijah spojine.

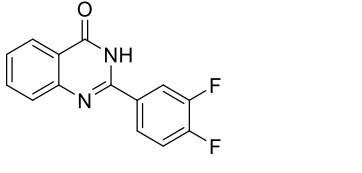
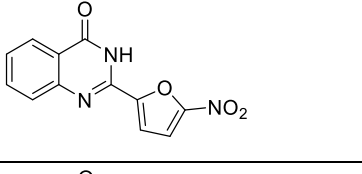
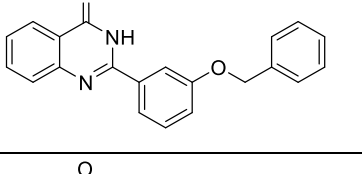
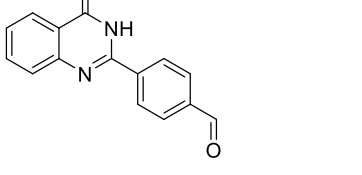
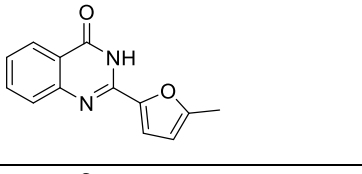
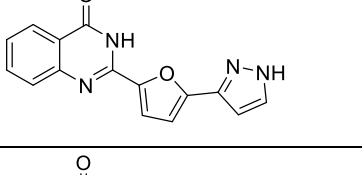
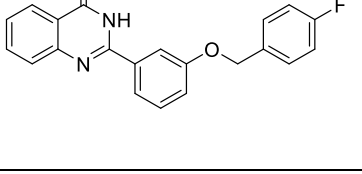
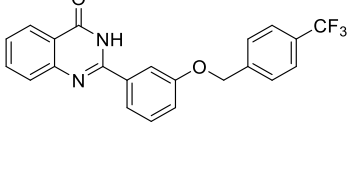
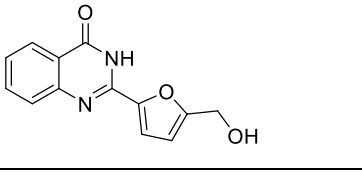
Spojinam smo določili tudi minimalno inhibitorno koncentracijo (MIC) in s tem ovrednotili protibakterijsko delovanje na *E. coli* in *S. aureus*.

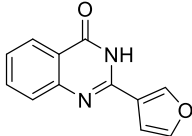
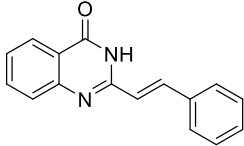
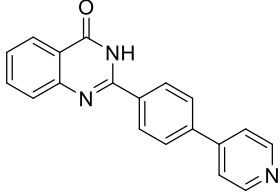
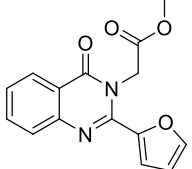
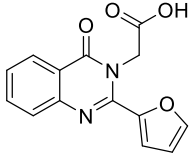
5.2.1 Rezultati biokemičnega testiranja

Vse sintetizirane spojine, razen spojini **17**, **26**, so bile testirane na encimu MurA iz bakterije *E. coli* in *S. aureus*. Rezultati testiranja na encimu MurA iz *E. coli* za posamezno spojino so podani v spodnji tabeli. Pri testiranih spojinah v koncentraciji 100µM pa nismo zaznali zaviralnega delovanja na encim MurA iz bakterije *S. aureus*.

Preglednica III: Prikaz rezultatov biokemičnega testiranja podanih kot RA vrednosti [%] ali IC₅₀ vrednost [μM] in rezultati protibakterijskega delovanja podani kot MIC [μg/ml]

Spojina	Kemijska struktura	RA (%) pri 100 μM spojine oz IC ₅₀ <i>E. coli</i>	MIC (<i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i>)
<u>7</u>		IC ₅₀ = 21 μM	>128
<u>8</u>		IC ₅₀ = 101 μM	>128
<u>9</u>		IC ₅₀ = 56 μM	>128
<u>10</u>		98	>128
<u>11</u>		95	>128
<u>12</u>		97	>128
<u>13</u>		89	>128
<u>14</u>		72	>128

<u>15</u>		67	>128
<u>16</u>		IC ₅₀ = 47 μM	<i>E. coli</i> : 1 μg/ml <i>S. aureus</i> : 8 μg/ml
<u>18</u>		IC ₅₀ = 23 μM	>128
<u>19</u>		58	>128
<u>20</u>		IC ₅₀ = 81 μM	>128
<u>21</u>		100	>128
<u>22</u>		IC ₅₀ = 19 μM	>128
<u>23</u>		88	>128
<u>24</u>		99	>128

<u>25</u>		91	>128
<u>27</u>		IC ₅₀ = 51 μM	>128
<u>28</u>		100	>128
<u>29</u>		66	>128
<u>30</u>		74	>128

Kot je razvidno iz zgornje tabele, so le spojine **7**, **8**, **9**, **16**, **18**, **20**, **22** in **27** izkazovale zaviralno delovanje na encim v takšni meri, da smo jim določili IC₅₀ vrednosti. Ostalim spojinam se je RA gibala med 58 % in 100 %. V večini gre za derivate, ki imajo na mestu 2 kinazolinonskega skeleta pripet različno substituiran fenilni obroč.

Spojine **12**, **18**, **22** in **23** se med seboj ločijo le v substituentu na *para* mestu 3-benziloksifenilnega fragmenta. Spojina **18** na tem mestu nima substituenta, v primeru spojine **12** je to metil, pri spojini **22** je to F, pri spojini **23** pa je CF₃. Spojina **18** ima IC₅₀ vrednost 23 μM, IC₅₀ vrednost za spojino **22** je 19 μM, spojinama **12** in **23** pa IC₅₀ vrednosti nismo določili, saj imata RA vrednost 97 oz. 88 %. Iz teh rezultatov lahko sklepamo, da je za najmočnejše zaviralno delovanje *para* mesto 3-benziloksifenilnega fragmenta nesubstituirano (**18**) ali pa je vezan majhen substituent (recimo fluor, **22**), medtem ko že malo večji substituent, kot sta metil in trifluorometil (**12** in **23**), negativno vpliva na zaviralno delovanje. Zanimivo je, da derivat z *meta* substituiranim 3-benziloksifenilnim fragmentom 2-(4-((3-klorobenzil)oksi)fenil)kinazolin-4(3*H*)-on (**11**) in

pa 2-(3-((3-klorobenzil)oksi)fenil)kinazolin-4(3*H*)-on (**10**) ne izkazujeta zaviralnega delovanja.

Strukturno podobne so si tudi spojine **8**, **9**, **16** in **20**, ki se ločijo po substituentu na mestu 5 furanskega obroča. Pri spojini **9** je furan substituiran z bromom, pri spojini **16** z nitro skupino, pri spojini **20** z metilom, pri spojini **8** pa ni substituiran. Vse štiri spojine so izkazovale zaviralno delovanje, ki pa se razlikuje v odvisnosti od substituenta. Le-to je bilo najmočnejše z IC₅₀ vrednostjo 47 μM, če kot substituent uporabimo nitro skupino (**16**), nekoliko šibkejšje je delovanje derivata z bromom (**9**), za katerega znaša IC₅₀ vrednost 56 μM, IC₅₀ vrednost za derivat z metilom (**20**) znaša 81 μM, najšibkejšje delovanje, z IC₅₀ vrednostjo 101 μM, pa izkazuje derivat brez substituenta na mestu 5 furanskega obroča (**8**). Spojini **29** in **30** sta derivata spojine **8** s substituiranim dušikovim atomom na mestu 3 kinazolinonskega skeleta. V primeru spojine **29** je substituent metil acetat, pri spojini **30** pa etanojska kislina. Glede na RA vrednosti spojin **29** in **30** in IC₅₀ vrednost spojine **8**, lahko zaključimo, da substituent na mestu 3 kinazolinonskega skeleta ne pripomore k boljšemu delovanju spojine oz. se le-to zmanjša.

Zaviralno delovanje sta izkazovali tudi spojini **7** in **27**. Spojina **7**, ki ima kot substituent na mestu 2 kinazolinonskega skeleta vezan 1,1-bifenil, ima IC₅₀ vrednost 21 μM. IC₅₀ vrednost za (*E*)-2-stirilkinazolin-4(3*H*)-on (**27**) pa znaša 51 μM.

Kasneje je bila izvedena *in silico* študija sidranja pri kateri je bilo ugotovljeno, da se kinazolinonski del spojine veže v polarni žep, ki ga definirajo Arg91, Arg120, Asp123, His125 in Ser162. 3-benziloksifenilni fragment na mestu 2 kinazolinonskega obroča pa deluje kot distančnik, ki omogoča pozicioniranje substituenta v prostor, ki ga tvorijo Trp95, Val163, Asn23, Glu190 in Arg232. Glede na rezultate biokemičnega testiranja je takšna struktura 2-substituiranih kinazolinonskih zaviralcev (**18** in **22**) verjetno nujna za samo zaviralno delovanje na MurA, saj derivati, ki imajo na mestu 2 kinazolinonskega obroča pripet manjši fragment ali pa 4-benziloksifenilni fragment (**11**) izkazujejo bistveno šibkejšje zaviralno delovanje (28).

5.2.2 Komentar rezultatov protibakterijskega delovanja

Protibakterijsko delovanje sintetiziranih spojin smo določevali na sevih *S. aureus* in *E. coli*. Rezultate smo podali kot vrednosti MIC. Od vseh testiranih spojin ima protibakterijsko delovanje le spojina **16**, ki deluje proti vsem testiranim sevom. MIC za *E. coli* je 1 μg/ml, za *S. aureus* pa znaša 8 μg/ml.

6 SKLEP

Živimo v času, ko je odpornost bakterij na antibiotike v porastu. Zato je pomembno, da načrtujemo nove učinkovine z alternativnim ali popolnoma novim mehanizmom protibakterijskega delovanja. Encimi Mur predstavljajo eno izmed validiranih tarč, ki omogoča razvoj novih protibakterijskih učinkovin.

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali kinazolinonske derivate z različnimi substituenti na drugem in tretjem mestu kinazolinonskega obroča. Pri sintezi in izolaciji spojin nismo imeli večjih težav. Sintetiziranim spojinam smo ovrednotili zaviralno delovanje na encimu MurA iz *E. coli* in *S. aureus* in protibakterijsko delovanje na sevih *E. coli* in *S. aureus*.

Sintetizirane spojine lahko glede na izraženo zaviralno delovanje razdelimo v dve skupini. Prvo skupino predstavljata spojini, ki imata na mestu 2 kinazolinonskega obroča pripet *para* substituiran 3-benziloksifenilni fragment in imata IC₅₀ vrednosti 19 µM in 23 µM. Najmočnejši zaviralec je 2-(3-((4-fluorobenzil)oksi)fenil)kinazolin-4(3*H*)-on (**22**), pri katerem pa nismo zaznali protibakterijskega delovanja. Drugo skupino predstavljajo derivati, ki imajo na mestu 2 kinazolinonskega skeleta vezan različno substituiran furanski obroč. IC₅₀ vrednosti za te derivate se gibljejo od 47 µM do 101 µM. Znotraj te skupine je najmočnejši zaviralec encima MurA 2-(5-nitrofuran-2-il)kinazolin-4(3*H*)-on (**16**), ki izkazuje tudi protibakterijsko delovanje z MIC od 1 µg/ml do 8 µg/ml na testiranih sevih. Dva derivata iz te skupine, ki sta imela substituiran tudi dušikov atom na tretjem mestu kinazolinonskega obroča, zaviralnega delovanja nista izkazovala. Med sintetiziranimi spojinami, ki smo jim določili IC₅₀ vrednosti, sta še spojini **7** in **27**, ki pa ne izkazujeta protibakterijskega delovanja. Ostale sintetizirane spojine niso izkazovale dovolj močnega zaviralnega delovanja, zato jim IC₅₀ vrednosti nismo določili.

Zaključimo lahko, da smo tekom magistrske naloge potrdili zaviralno delovanje 2-substituiranih derivatov kinazolinona na encimu MurA. Sintetizirane spojine z nizkimi vrednostmi IC₅₀, lahko služijo kot osnova za nadaljnje optimizacije, s katerimi bi lahko še izboljšali njihovo zaviralno delovanje in hkrati pridobili tudi protibakterijsko delovanje.

7 LITERATURA

1. Lemke TL, Williams DA, Roche VF, Zito SW: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 6th Edition, *Lippincott Williams & Wilkins, a Wolters Kluwer Company, Philadelphia* 2008, 1028-1081.
2. Graham LP: An introduction to medicinal chemistry, 5th edition, *Oxford University press, Oxford*, 2013, 414-467.
3. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G: Rang and Dale's Pharmacology, 7th edition, *Churchill Livingstone*, 2012, 622-637.
4. Tenover FC: Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria, *The American Journal of Medicine*, 119 (6A), 2006, S3-S5.
5. Madigan TM, Martinko MJ, Stahl AD, Clark PD: Biology of Microorganisms, 13th edition, *Pearson*, 2012, 58-62.
6. Tortora GJ, Funke BR, Case CL: Microbiology: an introduction, 12th edition, *Perason*, 2015, 80-85.
7. Willey JM, Sherwood LM, Woolverton CJ: Prescott's Microbiology, 9th edition, *Mc Graw Hill*, 2013, 53-59.
8. http://www.nature.com/nrmicro/journal/v13/n10/fig_tab/nrmicro3480_F1.html, dostopano 03.06.2017.
9. Vollmer W, Bertsche U: Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1778, 2008, 1715-1718.
10. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis, *Federation of European Microbiological Societies*, 32, 2008, 168-182.
11. <https://basicmedicalkey.com/structure-of-bacterial-cells/>, dostopano 03.06.2017.
12. Sobhanifar S, King DT, Strynadka NCJ: Fortifying the wall: synthesis, regulation and degradation of bacterial peptidoglycan, *Current Opinion in Structural Biology*, 23, 2013, 1-2.
13. Gautman A, Rishi P, Tewari R: UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyl transferase as a potential target for antibacterial chemotherapy: recent developments, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92, 2011, 211-225.

14. 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, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 27, 2017, 944-949.
15. Schönbrunn E, Svergun DI, Amrhein N, Koch MHJ: Studies on the conformational changes in the bacterial cell wall biosynthetic enzyme UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase (MurA), *European Journal of Biochemistry*, 253, 1998, 406-412.
16. Hrast M, Sosič I, Šink R, Gobec S: Inhibitors of the peptidoglycan biosynthesis enzymes MurA-F, *Bioorganic Chemistry*, 55, 2014, 2-5, 12-13.
17. Michalopoulos AS, Livaditis IG, Gougoutas V: The revival of fosfomycin, *International Journal of Infectious diseases*, 15, 2011, 732-739.
18. Takahata S, Ida T, Hiraishi T, Sakakibara S, Meabashi K, Terada S, Muratani T, Matsumoto T, Nakahama C, Tomono K: Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of Escherichia coli, *International Journal of Antimicrobial Agents*, 35, 2010, 333-334.
19. Khan I, Zaib S, Batool S, Abbas N, Ashraf Z, Saeed A: Quinazolines and quinazolinones as ubiquitous structural fragments in medicinal chemistry: An update on the development of synthetic methods and pharmacological diversification, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 24, 2016, 2377-2378.
20. Khan A, Ibrar W, Ahmed A, Saeed: Synthetic approaches, functionalization and therapeutic potential of quinazoline and quinazolinone skeletons: The advances continue, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 90, 2015, 154.
21. Mabkhot YN, Al-Har MS, Barakat A, Aldawsari FD, Aldalbahi A, Ul-Haq Z: Synthesis, Anti-microbial and Molecular Docking Studies of Quinazolin-4(3H)-one Derivatives, *Molecules*, 19, 2014, 8725-8739.
22. Lanzeta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia OA: An Improved Assay for Nanomole Amounts of Inorganic Phosphate, *Analytical Biochemistry*, 100, 1979, 95-97.
23. Kim NY, Cheon CH: Synthesis of quinazolinones from anthranilamides and aldehydes via metal-free aerobic oxidation in DMS, *Tetrahedron Letters*, 55, 2014, 2340-2344.

24. Solomons GTW, Fryhle CB: Organic Chemistry, 10th edition, *John Wiley&Sons, inc.*, 2011, 523-524.
25. <http://www.gaylordchemical.com/category/synthesis-corner/page/2/>, 21.05.2017.
26. Yu M, Stevenson K, Zhou G: N-alkylation of lactams with secondary heterobenzylic bromides, *Tetrahedron Letters*, 55, 2014, 5591-5592.
27. Tišler M: Organska kemija, *DZS*, 1991, 241, 242.
28. Hrast M, Rožman K, Jukič M, Patin D, Gobec S, Sova M: Synthesis and structure-activity relationship study of novel quinazolinone-based inhibitors of MurA, *Bioorganic and Medicinal Chemistry letters*, 27, 2017, 3532.