

KAZALO

| | |
|--|-----------|
| POVZETEK | 3 |
| ABSTRACT | 4 |
| SEZNAM OKRAJŠAV | 5 |
| 1. UVOD | 7 |
| 1.1. Razvoj protimikrobnih učinkovin..... | 7 |
| 1.2. Protimikrobne učinkovine | 7 |
| 1.3. Rezistenca bakterij na protimikrobne učinkovine | 8 |
| 1.3.1. Širjenje rezistence na antibiotike | 9 |
| 1.3.2. Problem rezistence in njeno zmanjševanje | 9 |
| 1.4. Bakterijska celična stena | 10 |
| 1.4.1. Peptidoglikan..... | 11 |
| 1.4.2. Biosinteza peptidoglikana..... | 13 |
| 1.4.3. Bakterijska celična stena kot prijemališče za protimikrobne učinkovine | 16 |
| 1.5. Mur ligaze | 17 |
| 1.5.1. Mur C | 18 |
| 1.5.2. Mur D | 20 |
| 1.5.3. Inhibitorji Mur ligaz | 23 |
| 1.5.3.1. Inhibitorji Mur C..... | 23 |
| 1.5.3.2. Inhibitorji Mur D..... | 26 |
| 1.5.3.3. Inhibitorji, ki delujejo na Mur C in Mur D..... | 27 |
| 2. NAČRT ZA DELO | 30 |
| 3. MATERIALI IN METODE | 33 |
| 3.1. Materiali | 33 |
| 3.2. Metode..... | 33 |
| 3.2.1. Tankoplastna kromatografija (TLC)..... | 33 |
| 3.2.2. Kolonska kromatografija | 33 |
| 3.2.3. Jedrska magnetna resonanca (NMR)..... | 33 |
| 3.2.4. Masna spektrometrija (MS)..... | 33 |
| 3.2.5. IR spektroskopija (IR) | 34 |
| 3.2.6. Tališča | 34 |
| 3.2.7. Biokemijska testiranja | 34 |
| 3.2.8. Risanje spojin in nomenklatura | 34 |
| 4. EKSPERIMENTALNO DELO | 35 |
| 4.1. Sinteza naftalen-2-sulfonohidrazidijevega klorida (OAH 0)..... | 35 |
| 4.2. Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)benzojske kisline (OAH 1)..... | 36 |
| 4.3. Sinteza <i>N</i> -(3,4-dimetoksibenzil)-4-(1,3-dioksolan-2-il)benzamida (OAH 3A)..... | 37 |
| 4.4. Sinteza <i>N</i> -(3,4-dimetoksibenzil)-4-formilbenzamida (OAH 6A)..... | 38 |
| 4.5. Sinteza <i>N</i> -(3,4-dimetoksibenzil)-4-((2-(2-naftilsulfonyl)hidrazono)metil)benzamida (OAH 2) | 39 |
| 4.6. Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)- <i>N</i> -(4-fluorofenil)benzamida (OAH 2A) | 40 |
| 4.7. Sinteza <i>N</i> -(fluorofenil)-4-formilbenzamida (OAH 8A)..... | 41 |
| 4.8. Sinteza <i>N</i> -(fluorofenil)-4-((2-(2-naftilsulfonyl)hidrazono)metil)benzamida (OAH 3) | 42 |
| 4.9. Sinteza <i>N</i> -(3,4-dimetoksifenil)-4-(1,3-dioksolan-2-il)benzamida (OAH 4A) | 43 |
| 4.10. Sinteza <i>N</i> -(3,4-dimetoksifenil)-4-formilbenzamida (OAH 9A)..... | 44 |

| | |
|--|-----------|
| 4.11. Sinteza <i>N</i> -(3,4-dimetoksifenil)-4-((2-(2-naftilsulfonyl)hidrazono)metil)benzamida (OAH 5A) | 45 |
| 4.12. Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)- <i>N</i> -(2-hidroksi-5-nitrofenil)benzamida (OAH 5B)..... | 46 |
| 4.13. Sinteza 4-formil- <i>N</i> -(2-hidroksi-5-nitrofenil)benzamida (OAH 500A)..... | 47 |
| 4.14. Sinteza <i>N</i> -(2-hidroksi-5-nitrofenil)-4-((2-(2-naftilsulfonyl)hidrazono)metil) benzamida (OAH 9)..... | 48 |
| 4.15. Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)- <i>N</i> -(4-hidroksifenil)benzamida (OAH 4B)..... | 49 |
| 4.16. Sinteza 4-formil- <i>N</i> -(4-hidroksifenil)benzamida (OAH 200)..... | 50 |
| 4.17. Sinteza <i>N</i> -(4-hidroksifenil)-4-((2-(2-naftilsulfonyl)hidrazono)metil)benzamida (OAH 7)..... | 51 |
| 4.18. Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)- <i>N</i> -fenetilbenzamida (OAH 2B)..... | 52 |
| 4.19. Sinteza 4-formil- <i>N</i> -fenetilbenzamida (OAH 6B)..... | 53 |
| 4.20. Sinteza 4-((2-(2-naftilsulfonyl)hidrazono)metil)- <i>N</i> -fenetilbenzamida (OAH 13)..... | 54 |
| 4.21. Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)- <i>N</i> -(4-heptilfenil)benzamida (OAH 800)..... | 55 |
| 4.22. Sinteza 4-formil- <i>N</i> -(4-heptilfenil)benzamida (OAH 800A)..... | 56 |
| 4.23. Sinteza <i>N</i> -(4-heptilfenil)-4-((2-(2-naftilsulfonyl)hidrazono)metil)benzamida (OAH 16)..... | 57 |
| 4.24. Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)- <i>N</i> -(2-((5-nitro-2-piridinil)amino)etil)benzamida (OAH 13A)..... | 58 |
| 4.25. Sinteza 4-formil- <i>N</i> -(2-((5-nitro-2-piridinil)amino)etil)benzamida (OAH 13AA)..... | 59 |
| 4.26. Sinteza 4-((2-(2-naftilsulfonyl)hidrazono)metil)- <i>N</i> -(2-((5-nitro-2-piridinil)amino)etil)benzamida(OAH 12)..... | 60 |
| 4.27. Sinteza terc-butyl-4-hidroksifenilkarbamata (OAH 17)..... | 61 |
| 4.28. Sinteza 2-(4-((terc-butoksikarbonil)amino)fenoksi)propanojske kisline (OAH 24)..... | 62 |
| 4.29. Sinteza etil 2-(4-aminofenoksi)propanoata (OAH 28)..... | 63 |
| 4.30. Sinteza etil 2-(4-((4-(1,3-dioksolan-2-il)benzoil)amino)fenoksi)propanoata(OAH 32)..... | 65 |
| 4.31. Sinteza 2-(4-((4-(1,3-dioksolan-2-il)benzoli)amino)fenoksi)propanojske kisline (OAH 32A)..... | 66 |
| 4.32. Sinteza 2-(4-((4-formilbenzoil)amino)fenoksi)propanojske kisline (OAH 32AA)..... | 67 |
| 4.33. Sinteza 2-(4-((4-((2-(2-naftalensulfonyl)hidrazono)metil)benzoil)amino)fenoksi) propanojske kisline (OAH 36)..... | 68 |
| 4.34. Sinteza etil 4-(aminometil)benzoata (OAH 19)..... | 69 |
| 4.35. Sinteza etil 4-(((4-(1,3-dioksolan-2-il)benzoil)amino)metil)benzoata (OAH 21)..... | 70 |
| 4.36. Sinteza 4-(((4-(1,3-dioksolan-2-il)benzoil)amino)metil) benzojske kisline (OAH 21A)..... | 71 |
| 4.37. Sinteza 4-(((formilbenzoil)amino)metil)benzojske kisline (OAH 21AA)..... | 72 |
| 4.38. Sinteza 4-(((4-((2-(2-naftalensulfonyl)hidrazono)metil)benzoil)amino)benzojske kisline (OAH 31).... | 73 |
| 5. REZULTATI IN DISKUSIJA..... | 75 |
| 5.1. Razprava o sintezi 4-(arilsulfonylhidrazonoil)benzamidnih inhibitorjev Mur C in Mur D..... | 75 |
| 5.1.1. Sinteza naftalen-2-sulfonylhidrazida (OAH 0)..... | 75 |
| 5.1.2. Zaščita aldehidne skupine 4-formilbenzojske kisline..... | 75 |
| 5.1.3. Zaščita anilinske NH ₂ skupine (OAH 17)..... | 76 |
| 5.1.4. Tvorba estra s klorpropionsko kislino (OAH 24)..... | 77 |
| 5.1.5. Alkalna hidroliza etilnega estra..... | 78 |
| 5.1.6. Odstranitev zaščite z aminske skupine in tvorba estra s kislinskim kloridom (OAH 28)..... | 79 |
| 5.1.7. Tvorba amidne vezi..... | 80 |
| 5.1.8. Odstranitev zaščite z aldehidne skupine..... | 82 |
| 5.1.9. Pripenjanje naftalen-2-sulfonylhidrazida..... | 82 |
| 5.2. Rezultati biokemičnega testiranja spojin..... | 84 |
| 6. SKLEP..... | 89 |
| 7. LITERATURA..... | 90 |

POVZETEK

Rezistenca mikroorganizmov na antibiotike predstavlja velik problem pri današnjem zdravljenju mikrobnih infekcij. Iz dneva v dan se pojavlja več bakterijskih sevov, ki so rezistentni na večino antibiotikov na tržišču, zato imamo pri številnih boleznih, ki so bile še nedolgo nazaj ozdravljive z določeno protimikrobno učinkovino, velike težave v terapiji. Ravno zato je nujno potreben razvoj novih protimikrobnih učinkovin. Idealna tarča, na katero lahko delujemo je peptidoglikan, ki ga imajo le prokariotske celice, zato lahko dosežemo selektivno toksičnost. Prve stopnje biosinteze peptidoglikana, ki potekajo v citoplazmi, katalizirajo Mur encimi, ki so esencialni za obstoj bakterij in ravno zaradi tega primerne tarče za razvoj novih potencialnih inhibitorjev.

V okviru dipolomske naloge smo sintetizirali serijo spojin, ki so potencialni inhibitorji Mur C in Mur D. Kot spojino vodnico smo pri sintezi spojin uporabili benziliden rodanine. Sintetizirane spojine imajo sulfonhidrazonoilno skupino, ki vsebuje kislo NH skupino, ki je nujno potrebna za inhibicijo omenjenih encimov. Poleg sulfonhidrazonoilne skupine vsebujejo naše spojine še benzilidensko skupino, naftalenski obroč, ter substituiran aromatski obroč, ki je z amidno vezjo povezan z ostalim delom molekule. Pri sintezi končnih spojin smo izhajali iz 4-formilbenzojske kisline. Zaščitili smo reaktivno formilno skupino, ter tvorili amidno vez med karboksilno skupino in primarnim aminom s karbodiimidno metodo. Odstranili smo zaščito ter na aldehidno skupino pripeli še naftalen-2-sulfonhidrazid.

Spojinam, ki smo jih sintetizirali, smo *in vitro* umerili inhibitorno aktivnost na Mur C in na Mur D. Kot najučinkovitejši inhibitor encima Mur C se je izkazala spojina 4-((2-(2-naftilsulfonil)hidrazono)metil)-*N*-fenetilbenzamid (**OAH 13**), kot najučinkovitejši inhibitor encima MurD pa spojina *N*-(4-hidroksifenil)-4-((2-(2-naftilsulfonil)hidrazono)metil)benzamid (**OAH 7**).

Rezultati naših raziskav predstavljajo pomemben prispevek k širitvi znanja o načrtovanju, sintezi in SAR potencialnih inhibitorjev bakterijske celične stene, hkrati pa tudi ponujajo iztočnice za nadaljnji razvoj protimikrobnih učinkovin.

ABSTRACT

The resistance of microorganisms to the antibiotics represents a great problem in today's treatment of microbial infection. Every day there are more and more bacterial strains which are resistant to the majority of antibiotics available on the market. Several diseases that have until recently been treatable with a particular antimicrobial agent, now present a serious health problem. It is thus urgent to develop new antimicrobial agents. Peptidoglycane is the essential component of the bacterial cell wall and enables us to achieve selective toxicity. The first stages of the biosynthesis of peptidoglycane that occur in the cytoplasm are catalysed by the Mur enzymes, which are essential for the existence of the bacteria and because of that represent an appropriate target for the development of new potential inhibitors.

In our thesis we synthesised a series of compounds which are potential inhibitors of Mur C and Mur D. In the synthesis of compounds we used benzylidene rodanine as the lead compound. The synthesized compounds have a sulfonylhydrazonoyl group, which contains an acidic NH group and is necessary for the inhibition of the previously mentioned enzymes. Besides sulfonylhydrazonoyl group, our compounds also contain the benzylidene substituent, the naphthalene ring and the substituted monocyclic aromatic ring, attached to the rest of the molecule by the amide bond. The starting compound for the synthesis was the 4-formylbenzoic acid. We protected the reactive formyl group and formed the amide bond between the carboxy group and the amino group, which was done by the carbodiimide method. We removed the protection and added the naphthalen-2-sulfonylhydrazide to the aldehyde group.

We tested inhibitory activity of the synthesised compounds to Mur C and Mur D, which was done *in vitro*. The most potent inhibitor of the Mur C enzyme proved to be the compound 4-((2-(2-naphthylsulfonyl)hydrazono)methyl)-N-phenethylbenzamide (**OAH 13**) and the most potent inhibitor of Mur D was the compound N-(4-hydroxyphenyl)-4-((2-(2-naphthylsulfonyl)hydrazono)methyl)benzamide (**OAH 7**).

The results of our study represent an important contribution towards the expansion of knowledge about design, synthesis and SAR of potential inhibitors of the bacterial cell wall. At the same time, they leave an open ground for further development of the antimicrobial agents.

SEZNAM OKRAJŠAV

| | |
|------------------|---|
| ADP | adenozindifosfat |
| AMPPNP | nehidrolizirajoči analog ATP |
| Ar | aromat |
| ATP | adenozintrifosfat |
| DMSO | dimetilsulfoksid |
| d | dublet (NMR) |
| dd | dublet dubleta (NMR) |
| EDC | 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid |
| EI | elektronska ionizacija (electron ionisation) (MS) |
| FAB | obstreljevanje s hitrimi elektroni (fast atom bombardment) (MS) |
| GluNAc | N-acetilglukozamin |
| HOBT | 1-hidroksibenzotriazol hidrat |
| IR | infrardeča spektroskopija |
| IC ₅₀ | srednja inhibitorna koncentracija |
| J | sklopitvena konstanta (NMR) |
| M | molekulska masa |
| m | multiplet (NMR) |
| Mf | mobilna faza |
| Mr | molekulska masa |
| MurA | UDP-N-acetilglukozamin enolpiruvat-transferaza |
| MurB | UDP-N-acetilglukozamin enolpiruvat-reduktaza |
| MurC | UDP-N-acetilmuraminska kislina: L-alanin-ligaza |
| MurD | UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin: D-glutamat-ligaza |
| MurE | UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat: mezodiaminopimelinat-ligaza |
| MurF | UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-mezodiaminopimelinat D-alanin-D-alanin-ligaza |
| MurG | UDP-N-acetilglukozamin-transferaza |
| MurNAc | N-acetilmuraminska kislina |
| MS | masna spektrometrija |
| NMR | jedrska magnetna resonanca |
| NADPH | nikotinamid-adenin-dinukleotid-fosfat |

| | |
|------|--|
| NAM | N-acetil-D-muraminska kislina |
| PEP | fosfoenolpiruvat |
| Ph | fenilna skupina |
| Pi | organski fosfat |
| PRSP | na penicilin odporni <i>Staphylococcus pneumoniae</i> |
| PTSA | <i>p</i> -toluensulfonska kislina |
| q | kvartet (NMR) |
| RA | rezidualna aktivnost |
| SAR | odnos med strukturo in delovanjem |
| s | singlet (NMR) |
| t | triplet (NMR) |
| TLC | tankoplastna kromatografija |
| UDP | uridindifosfat |
| UMP | uridinmonofosfat |
| UMA | UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin |
| UMAG | UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat |
| UNAG | UDP-N-acetilglukozamin |
| UNAM | UDP-N-acetilmuraminska kislina |
| VRE | na vankomicin odporni <i>Enterococcus faecium</i> in <i>faecalis</i> |
| VRSA | na vankomicin odporni <i>Staphylococcus aureus</i> |

1. UVOD

1.1. Razvoj protimikrobnih učinkovin

Odkritje bakterij pred približno 300 leti ter poznejše odkritje njihove vloge pri nastanku infekcij, je privedlo do razvoja protimikrobnih učinkovin. V 19. stoletju je Robert Koch ugotovil, da lahko določene mikroorganizme izoliramo iz tkiv okuženih ljudi in da so ponavadi odsotni pri zdravih ljudeh. Pasteur in Joubert sta med prvimi spoznala, da lahko določene produkte sekundarnega metabolizma pri mikroorganizmih uporabimo v terapevtske namene. Moderna doba razvoja protimikrobnih učinkovin pa se je dejansko začela z Domagkovim odkritjem sulfonamidov, za kar je bila podeljena tudi Nobelova nagrada.

Naključna kontaminacija bakterijske kulture s penicilinom in njegovo čiščenje od poznih 1930 do zgodnjih 1940 let je raziskovalcem dala nov zagon in tako so v začetku leta 1941, prvič izvedli klinične študije z surovim penicilinom, ki so bile uspešne. Kmalu za tem so bili s preudarnim preiskovanjem metabolnih produktov velikega števila raznolikih mikrobov odkriti tudi streptomycin, kloramfenikol, neomicin ter eritromicin. Danes, skoraj 70 let kasneje, nam znanje in tehnologija omogočata načrtovanje in sintezo protimikrobnih učinkovin v zelo kratkem času (1,2).

1.2. Protimikrobne učinkovine

Antibiotiki so sekundarni metaboliti, ki jih proizvajajo različne vrste mikroorganizmov (bakterije, glive), ali njihovi polysintezni analogi, ki v nizkih odmerkih zavirajo rast drugih mikroorganizmov, torej delujejo bakteriostatično, ali pa povzročijo njihovo smrt, delujejo baktericidno. Poleg tega so relativno netoksični za gostitelja, kar pomeni da delujejo po principu selektivne toksičnosti. Antibiotiki se izrazito razlikujejo v fizikalnih, kemijskih in farmakoloških lastnostih (spekter delovanja) ter v mehanizmi delovanja. Nekateri med antibiotike prištevajo tudi sintezne protimikrobne učinkovine, kot so sulfonamidi in kinoloni, vendar jih običajno uvrščamo v večjo skupino kemoterapevtikov (1,2,3).

Protimikrobne učinkovine klasificiramo glede na kemijsko strukturo in mesto delovanja v bakteriji:

- Inhibitorji bakterijske celične stene (penicilini, cefalosporini, vankomicin, bacitracin in cikloserin)
- Učinkovine, ki delujejo direktno na membrano mikroorganizma in s tem spremenijo njeno permeabilnost, kar vodi v izgubo znotrajceličnih sestavin (polimiksini in amfotericin B)
- Učinkovine, ki delujejo na 30S in 50S podenoto ribosoma in s tem reverzibilno inhibirajo sintezo proteinov (kloramfenikol, tetraciklini, eritromicin, klindamicin)
- Učinkovine, ki se vežejo na 30S podenoto in tako spremenijo sintezo proteinov, kar posledično vodi do celične smrti (aminoglikozidi)
- Učinkovine, ki vplivajo na metabolizem nukleinskih kislin tako da inhibirajo RNA polimerazo (rifampicin) ali topoizomerozo (kinoloni)
- Antimetaboliti, ki inhibirajo encime, sodelujoče v sintezi tetrahidrofolne kisline (trimetoprim, sulfonamidi) (2).

1.3. Rezistenca bakterij na protimikrobne učinkovine

Rezistenca je velik problem protimikrobne terapije in predstavlja stanje neobčutljivosti ali zmanjšane občutljivosti mikroba na učinkovino, ki ponavadi povzroči inhibicijo celične rasti ali celično smrt. Rezistenca je lahko naravna ali pridobljena, kjer se prvotno na antibiotik občutljivi mikrobi sčasoma tako spremenijo, da postanejo manj občutljivi ali neobčutljivi na učinkovino. Klasičen primer za to je *Yersinia pestis*, povzročiteljica kuge, ki je bila občutljiva na antibiotike, kot so streptomycin, kloramfenikol in tetraciklini, vendar se v zadnjem času pojavlja visok nivo rezistence na našete antibiotike (4).

Obstajajo pa tudi mikrobi, ki so popolnoma rezistentni na antibiotike. Poznani primeri so na vankomicin rezistentna *Enterococcus faecium* in *faecalis* (VRE), na meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), na karbapenem rezistentna *Actinobacter baumannii* in *Pseudomonas aeruginosa* ter na penicilin in makrolidne antibiotike rezistenten *Streptococcus pneumoniae* (5).

Mehanizmi, po katerih pride do rezistence na protimikrobne učinkovine, so:

- Zmanjšan privzem ali povečano izločanje učinkovine iz celice (glavni mehanizem pri rezistenci na tetracikline)

- Inaktivacija učinkovine z bakterijskimi encimi (glavni mehanizem pri rezistenci na peniciline, aminoglikozide in kloramfenikol)
- Zmanjšana afiniteta receptorja za učinkovino (sulfonamidi, trimetoprim, streptomycin, eritromicin, rifampicin)
- Sprememba vezavnega mesta za antibiotike oz. tarčnega encima, ki ga protimikrobna učinkovina inhibira (trimetoprim, β -laktami)
- Povečana koncentracija metabolitov, ki ovirajo delovanje učinkovine (značilno za bakterije rezistentne na sulfonamide, kjer pride do povečane koncentracije para-aminobenzojske kisline) (4).

1.3.1. Širjenje rezistence na antibiotike

Rezistenca na antibiotike se v populaciji bakterij lahko prenaša na treh nivojih:

- s prenosom bakterije iz človeka na človeka
- s prenosom r-genov (geni, ki nosijo zapis za rezistenco) med bakterijami, običajno s plazmidi
- s prenosom transpozonov (segmentov DNA) iz plazmida na plazmid znotraj patogenega organizma (3).

Do širjenja rezistence na antibiotike največkrat pride z prenosom DNA segmentov, ki vsebujejo rezistentne gene (r-gene). Prenos DNA lahko poteka z transformacijo (bakterija, ki je občutljiva na antibiotik, iz okolja privzame del DNA, ki vsebuje r-gen), transdukcijo (r-geni, ki vsebujejo informacijo za rezistenco, se v plazmidu prenesejo na drugo bakterijo s pomočjo bakteriofaga) in konjugacijo (r-geni se s pomočjo pilusa, ki ga tvorita dve bakteriji prenesejo iz ene bakterije na drugo) (4).

1.3.2. Problem rezistence in njeno zmanjševanje

Število bakterijskih vrst, ki so rezistentne na antibiotike, konstantno narašča. V prvi vrsti je glavni krivec za to pretirana in nenamenska uporaba antibiotikov. Prav zaradi tega bi bilo potrebno omejiti predpisovanje antibiotikov za zdravstvene težave, kjer zdravljenje z antibiotiki nima racionalne osnove. Eden izmen načinov zmanjševanja rezistence je tudi kombinirana uporaba antibiotikov, vendar ta metoda ni vedno učinkovita. Do rezistence lahko

privede tudi dolgotrajno zdravljenje z antibiotiki, ki bakterij ne uničijo, ter nepravilen, pogosto premajhen odmerek protimikrobne učinkovine, ki predstavlja stimulus za razvoj rezistence pri bakterijah (4,7).

Pomemben pristop, ki znatno vpliva na razvoj rezistence, je tudi nadzor porabe antibiotikov tako pri ljudeh, kot pri živalih (nadzor nad dodajanjem antibiotikov v krmo za živali), ter obveščanje in izobraževanje javnosti o pravilni uporabi antibiotikov (4,6).

Za zmanjšanje problema rezistence bi bilo potrebno tudi spremeniti način razmišljanja v številnih farmacevtskih podjetjih, kjer so zaradi visokih stroškov uvedbe novih učinkovin na tržišče, ustavili svoje programe iskanja protimikrobnih učinkovin. Posledično se je veliko število raziskav na tem področju preneslo na raziskovalne inštitute (6).

Kljub temu so v fazi kliničnih raziskav številne učinkovine z raznoliko kemijsko strukturo. Na tržišče občasno prihajajo nove protimikrobne učinkovine, ki delujejo proti širokemu spektru bakterij, vendar pa pojav vedno novih sevov rezistentnih bakterij teži k še hitrejšemu razvoju novih protimikrobnih učinkovin (8).

1.4. Bakterijska celična stena

Bakterijska celična stena je kompleksna struktura, ki jo sestavljajo posebne makromolekule, ki jih drugod v naravi ne najdemo. Najpomembnejši sestavni del je peptidoglikan, ki s svojo trdnostjo zagotavlja preživetje celice v hipotoničnem območju. Za preživetje celice je njegova celovitost nujna, zato predstavlja tudi eno izmed najpogostejših tarč za delovanje antibiotikov (9,10).

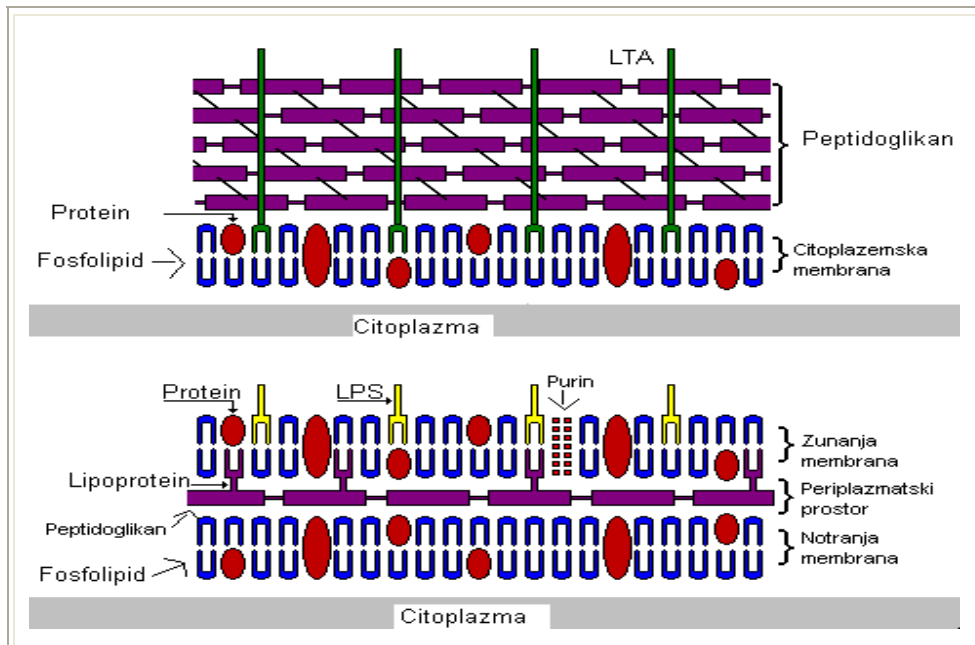
Glavne funkcije bakterijske celične stene so:

- zagotavljanje polprepustne bariere med bakterijo in okoljem
- zagotavljanje trdnosti, tako da je celica obvarovana pred spremembami zunanega okolja (osmotski tlak)
- zaščita pred encimi gostitelja.

Glede na barvanje po Gramu lahko bakterije razdelimo v po Gramu negativne in po Gramu pozitivne. Ta metoda je pomembna predvsem pri izbiri ustreznega antibiotika, saj lahko le-tega določimo glede na barvanje mikroorganizma bodisi modro ali rdeče (slika 1) (1).

Večino celične stene po Gramu pozitivnih bakterij sestavlja večplastni peptidoglikan (do štirideset plasti). Stena je dobro prepustna za raztopljene snovi (tudi za spojine z molekulsko maso 7000 ali več). Vsebuje še anionske polimere tehojske in teihuronske kisline. Tehojska kislina je sestavljena iz enot glicerolfosfata ali ribitolfosfata, medtem ko je teihuronska kislina anionski polimer s heksuronskimi kislinami.

Peptidoglikan po Gramu negativnih bakterij je samo enoplasten. Zaradi zunanje membrane, ki je kemijsko lipopolisaharidno-fosfolipidno-proteinska struktura, je prepustnost stene pri teh bakterijah zelo zmanjšana, saj je ta kompleks lipofilen. Membrane ne morejo prehajati hidrofilne nenabite molekule, pa tudi zelo lipofilne spojine kot so barvila, maščobne kisline, detergenti, antibiotiki (eritromicin, rifamicin, vankomicin in nekateri penicilini) (9).

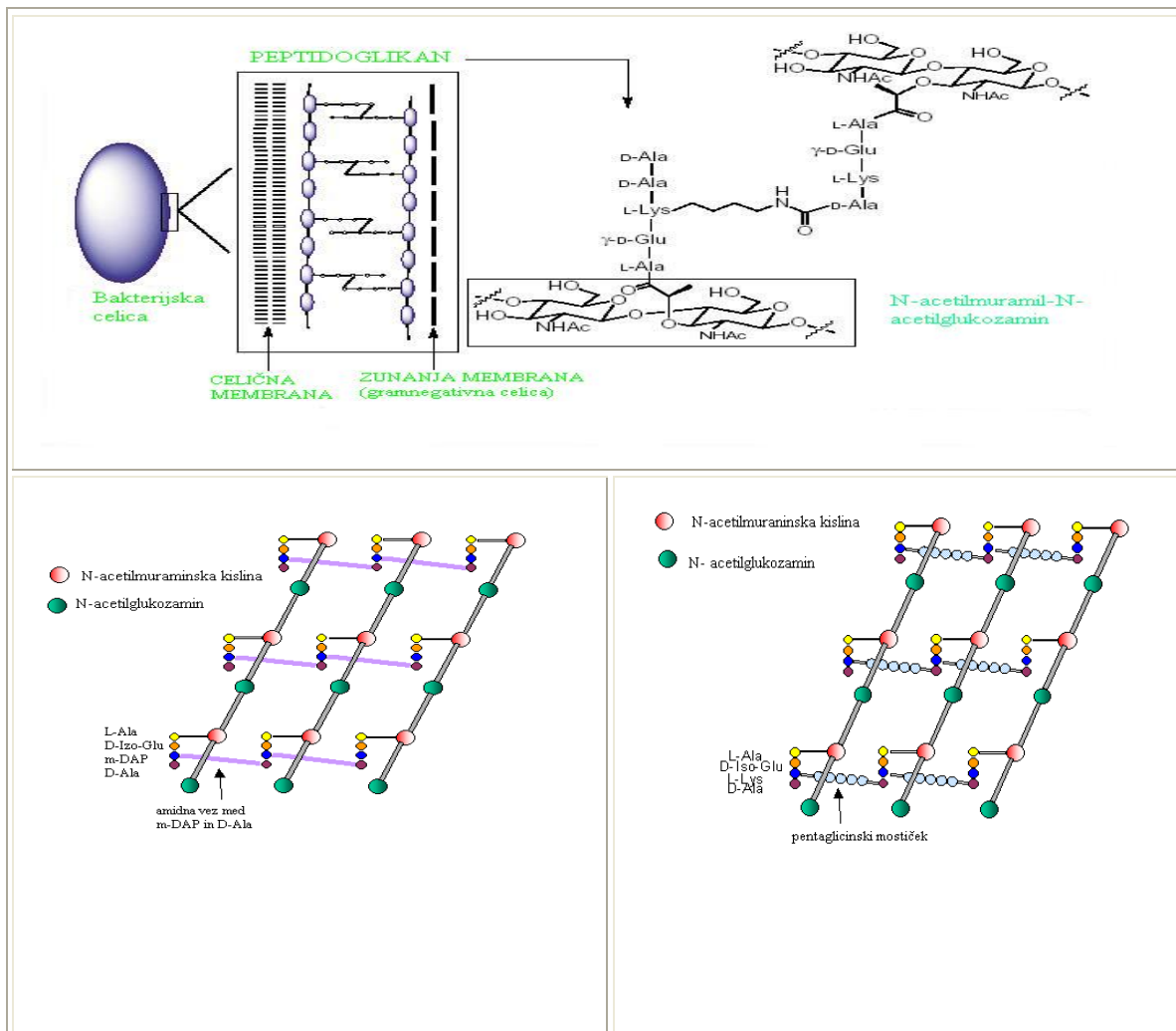


Slika 1: Zgradba bakterijske celične stene po Gramu pozitivnih bakterij (zgoraj) in po Gramu negativnih bakterij (spodaj)

1.4.1. Peptidoglikan

Peptidoglikan je bistvena sestavina bakterijske celične stene. Njegova glavna naloga je ohranjanje oblike celice in vzdrževanje celične integritete s kompenzacijo notranjega osmotskega tlaka. Hkrati pa peptidoglikan tvori tudi oporo drugim gradnikom celične membrane, kot so proteini in tehojska kislina. Sodeluje tudi v procesu celične rasti in delitve. Kakršnakoli motnja v biosintezi peptidoglikana lahko vodi v lizo celice (11,12).

Peptidoglikan tvorijo linearne glikanske verige, ki so prečno povezane s kratkimi peptidi. Glikanske verige tvorijo izmenjujoči se ostanki N-acetilglukoamina in N-acetilmuraminske kisline, povezani z 1-4 β vezjo. D-laktilna skupina vsakega ostanka N-acetilmuraminske kisline je substituirana s peptidno verigo, ki je najpogosteje sestavljena iz L-alanina, D-glutaminske kisline, A₂pm (2,6-diaminopimelinska kislina) ali L-lizina in dveh D-alaninov. Zadnja aminokislina D-alanin se med nastajanjem peptidoglikana odstrani. Prečno premreženje glikanskih vlaken poteče med karboksilno skupino D-alanina in med amino skupino stranske verige lizina ali diaminopimelinske kisline. Prečna povezava lahko poteče direktno (pri po Gramu negativnih bakterijah) ali pa s pomočjo peptidnega mostička (pri po Gramu pozitivnih bakterijah) (12). Shematski prikaz zgradbe peptidoglikana predstavlja slika 2.



Slika 2: Zgradba peptidoglikana pri po Gramu negativnih bakterijah (levo) in pri po Gramu pozitivnih bakterijah (desno) ter shematski prikaz osnovnih gradbenih enot peptidoglikana (zgoraj).

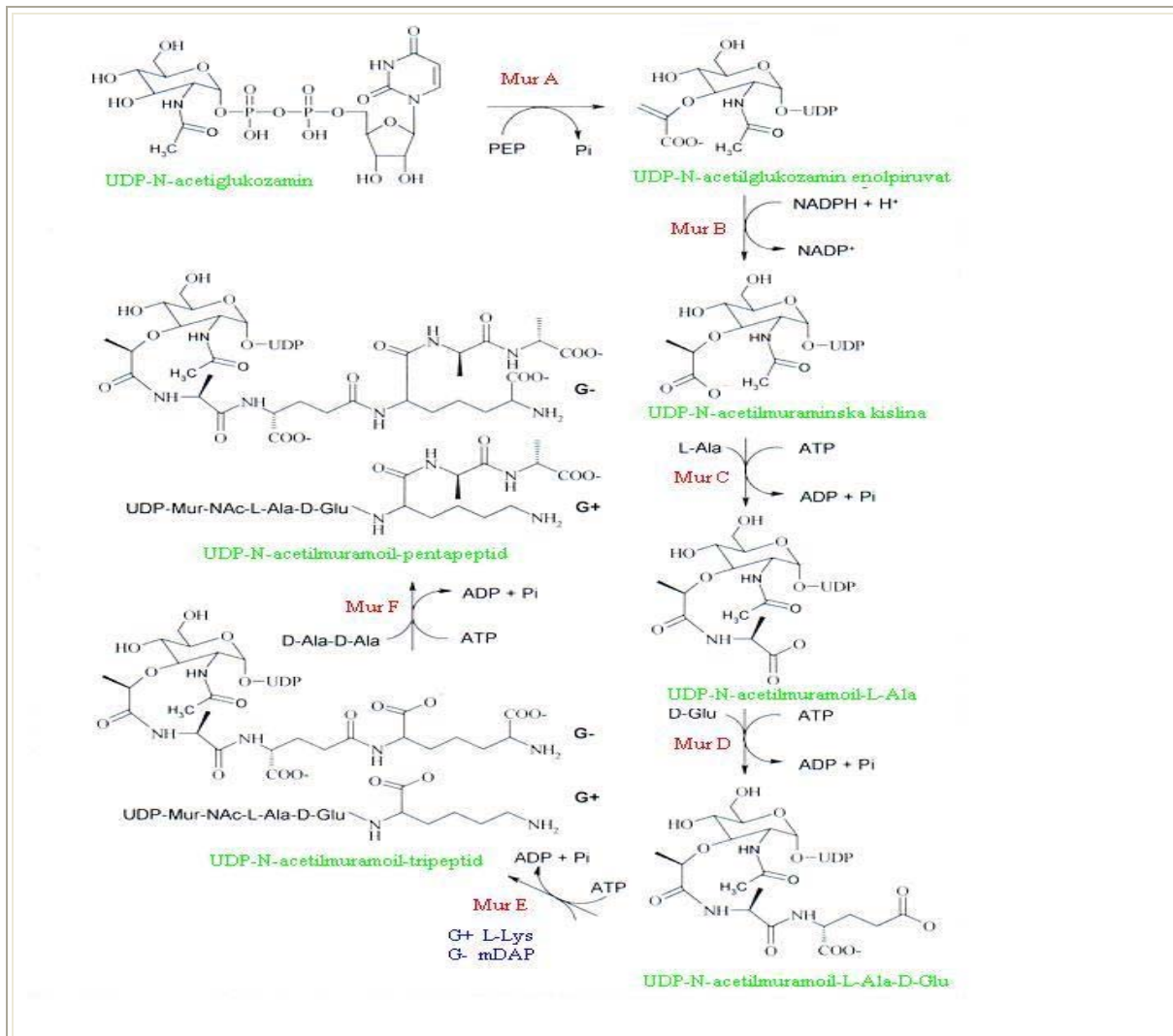
Podrobne raziskave peptidoglikana pri različnih bakterijah so pokazale, da obstajajo razlike v kemijski zgradbi, in sicer na mestu aminokislin, ki so povezane z muraminsko kislino. Večina razlik je na mestu 3 v peptidni verigi, ki je pripeta na C-3 ogljikov atom N-acetilmuraminske kisline. Poleg mezo-diaminopimelinske kisline, ki je daleč najbolj zastopana aminokislina na tem mestu, so zasledili tudi L-lizin, L-ornitin ter L-diaminobutanojsko kislino ali L-homoserin. Peptidoglikani se razlikujejo tudi v strukturi muraminske kisline, ki je lahko na mestu 6 acetilirana (9).

1.4.2. Biosinteza peptidoglikana

Biosinteza peptidoglikana poteka v več kot desetih korakih in vsak korak zahteva zanj specifičen encim. Med te encime prištevamo Mur A, Mur B, Mur C, Mur D, Mur E, Mur F, Mur Y, Mur G ter transglikozilaze in transpeptidaze (13).

Celoten proces biosinteze poteka v treh stopnjah. V prvi stopnji se v citoplazmi sintetizirajo prekursorji, ki se nato v drugi stopnji prenesejo s pomočjo lipidnega nosilca čez plazemsko membrano v celično steno, kjer se v tretji stopnji pritrdijo na že obstoječi peptidoglikan (Slika 4) (9).

Končna produkta znotrajcelične sinteze nukleotidnih prekursorjev peptidoglikana sta UDP-derivata aminosladkorjev: UDP-N-acetilglukozamin in UDP-N-acetilmuramil pentapeptid. Proces se začne s prenosom enolpiruvata iz fosfoenolpiruvata na mesto 3 UDP-N-acetilglukozamina (to reakcijo katalizira encim transferaza Mur A). V naslednji stopnji pride do redukcije enolpiruvatnega dela v D-laktat (to reakcijo katalizira reduktaza Mur B), pri čemer nastane UDP-N-acetilmuraminska kislina. Nato se na prosto karboksilno skupino laktidnega etra UDP-MurNAc z amidno vezjo veže skupina petih aminokislin. Te reakcije so katalizirane z od ATP odvisnimi aminokislinskimi ligazami Mur C, Mur D, Mur E in Mur F. Najprej se ena za drugo po vrsti vežejo L-alanin, D-glutaminska kislina, L-lizin (pri po Gramu pozitivnih bakterijah) ali mezo-2,6-diaminopimelinska kislina (pri po Gramu negativnih bakterijah). Med samim pripenjanjem aminokislin se v citoplazmi ločeno tvori dipeptid D-Ala-D-Ala. Le ta nastane iz L-Ala, ki ga v D-Ala pretvori alanin-racemaza, encim D-alanin-sintetaza pa poveže dva D-Ala v dipeptid. S pomočjo Mur F se dipeptid doda tripeptidni stranski verigi UDP-MurNAc (9,14,15).

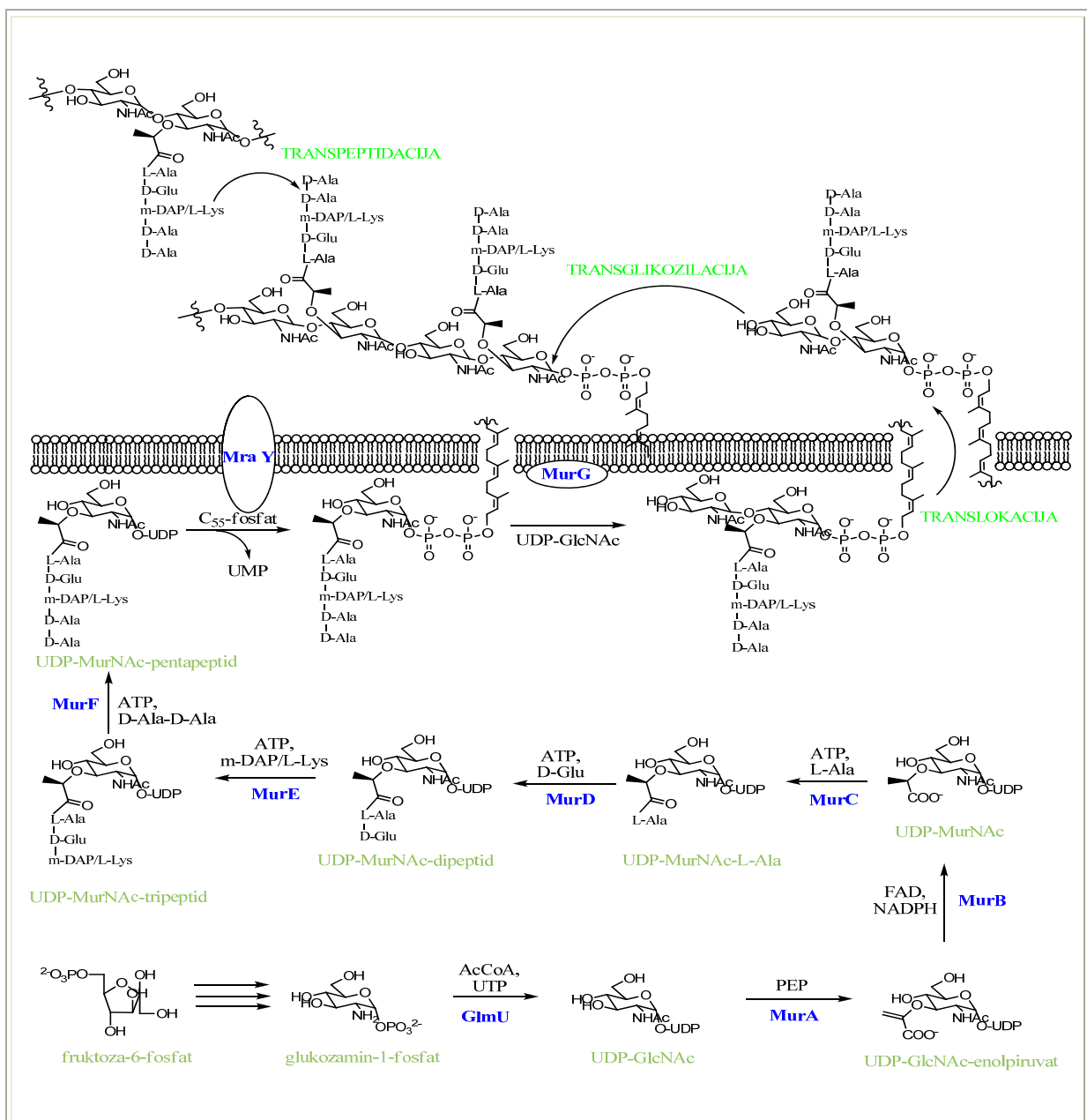


Slika 3: Sinteza UDP-N-acetilmuramoilpentapeptida

V naslednji stopnji, ki poteka na citoplazemski membrani, se celična prekurzorja UDP-N-acetilglukozamin in UDP-N-acetilmuramilpentapeptid povežeta z glikozidno vezjo, nastali disaharid pentapeptid pa se s pomočjo lipidnega nosilca prenese čez celično membrano. Najprej translokaza *MraY* prenese molekulo UDP-N-acetilmuramoilpentapeptida na membransko vezani lipidni prenašalec undekaprenil-fosfat (imenovan tudi C₅₅-izoprenoid fosfat), nastane undekaprenil difosfoMurNAc-pentapeptid, imenovan Lipid 1. Nato se na undekaprenil difosfoMurNAc-pentapeptid pripne še N-acetilglukozaminska enota. Vez, ki nastane med njima je 1-4 β, njen nastanek pa katalizira glikoziltransferaza Mur G. Nastane Lipid 2, ki je končna monomerna enota za izgradnjo peptidoglikana.

Sinteza peptidoglikana se nadaljuje s prenosom Lipida 2 preko citoplazemske membrane v procesu translokacije in tvorbo glikozidnih povezav z disaharidnimi enotami že izgrajenega peptidoglikana. Reakcijo transglikozilacije katalizira GlcNAc-pentapeptid

transglikozilaza. Sledi odcepitv ene molekule lipidnega prenašalca od izgrajenega peptidoglikana, ki se reciklira v obliki pirofosfata ter premreženje peptidnih verig. Pri procesu premreževnja sodelujejo encimi transpeptidaze. Transpeptidaza se najprej veže na D-alanil-D-alaninsko enoto pentapeptidne verige, ki je vezana na muraminsko kislino na nastajajočem glikanskem vlaknu. Peptidna vez med D-alaninskima ostankoma se razcepi in odcepi se terminalni D-alanin. Energija, ki se pri tem sprosti, se porabi za tvorbo prečne vezi. Nastane nova peptidna vez med karboksilno skupino preostalega alanina in končno ϵ -amino skupino na ostanku diaminopimelinske kisline sosednje regije peptidoglikana (9,14,16).

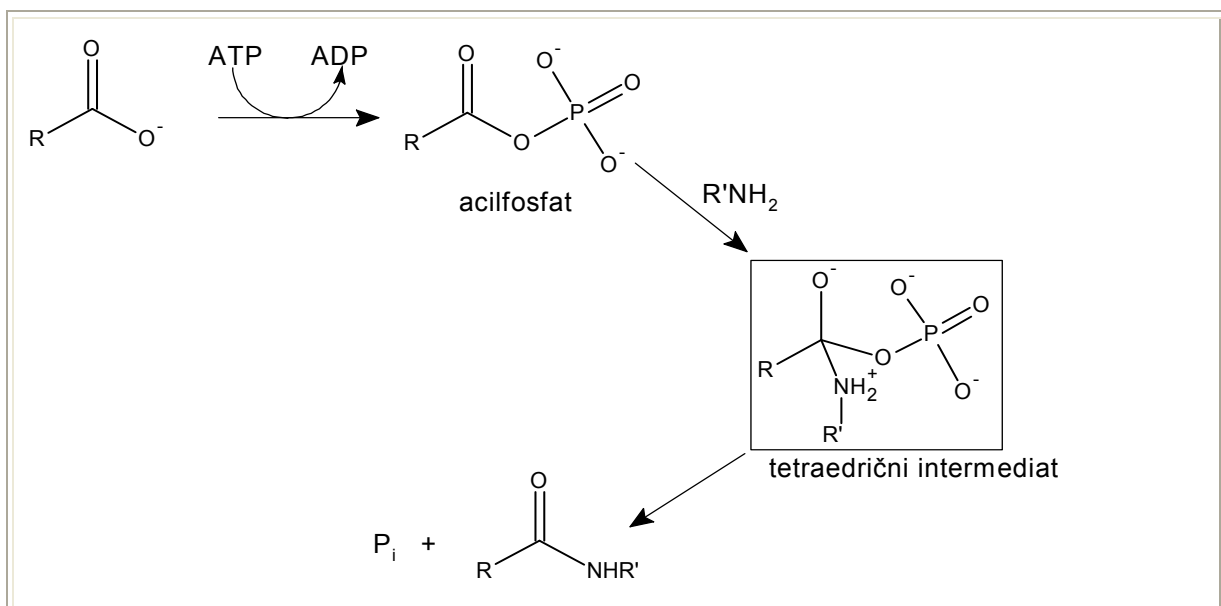


Slika 4: Shematski prikaz biosinteze peptidoglikana

1.5. Mur ligaze

Encimi iz družine Mur ligaz igrajo pomembno vlogo pri znotrajcelični sintezi prekursorjev bakterijskega peptidoglikana. Ravno zato so ti encimi primerne tarče za delovanje novih protimikrobnih učinkovin. Kristalna struktura Mur ligaz v različnih bakterijskih vrstah razkriva, da imajo Mur ligaze skupne tri domene. N-terminalno domeno in centralno domeno, ki sta odgovorni za vezavo UDP-prekursorja in ATP, medtem ko je C-terminalni del odgovoren za vezavo aminokislinskega ostanka (17).

Pri proučevanju katalitičnih mehanizmov Mur ligaz je bilo ugotovljeno, da encimi iz te družine zelo verjetno katalizirajo reakcije po enakem mehanizmu. Najprej s pomočjo ATP aktivirajo karboksilno skupino C-terminalne aminokislinske nukleotidnega substrata, sočasno pa potече hidroliza ATP. Nastane acil-fosfatni intermediat. Tega nukleofilno napade amino skupina pripenjajoče se aminokislinske ali dipeptida. Nastane fosforiliran tetraedrični intermediat, ki se razcepi na amid in anorganski fosfat (9, 17).

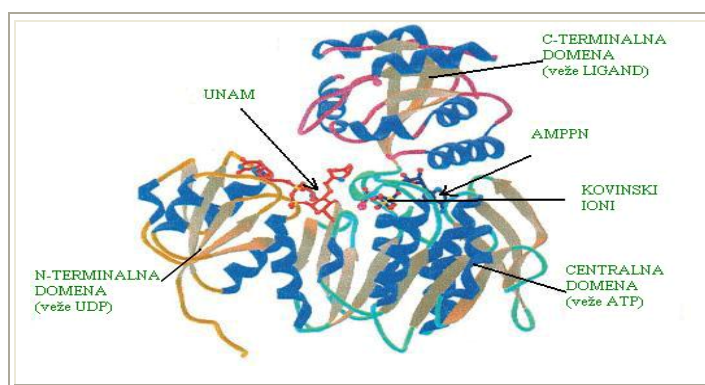


Slika 6: Nastanek amidne vezi preko tetraedričnega intermediana (9).

1.5.1. Mur C

Kristalna struktura encima Mur C je bila določena pri *Haemophilus influenzae*. Encim je sestavljen iz 3 strukturnih domen in je velik približno $60 \times 60 \times 45$ Å. Aktivno mesto encima leži na stiku vseh treh domen in sestoji iz specifičnih vezavnih mest za tri substrate (UDPMurNAc, MgATP in L-Ala), ki so razporejeni okrog katalitičnega centra. Strukturo encima Mur C prikazuje slika 7.

N-terminalna domena je odgovorna za vezavo UDP nukleotidnega dela substrata UDPMurNAc. Zanj je značilno, da sega od N terminalnega dela do 118. aminokislinskega ostanka in da sestoji iz petih nagubanih paralelnih β -ravnin, ki so obdane z štirimi izmenjujočimi se α vijačnicami. Centralna domena je odgovorna za vezavo ATP in sega od aminokislinskega ostanka 119 pa vse do 324 in je največja domena. Sestavljena je iz sedmih paralelnih β -nagubanih ravnin, ki jih obdaja pet segmentov α -vijačnic ter tri manjše antiparalelne β -nagubane ravnine. C-terminalna domena je udeležena pri vezavi aminokisliline L-alanina in sega od 315 pa vse do 473 aminokislinskega ostanka. Leži nad centralno domeno. Sestavljena je iz petih paralelnih β -nagubanih ravnin in ene antiparalelne, ki jih obdaja pet α -vijačnic (16,19).



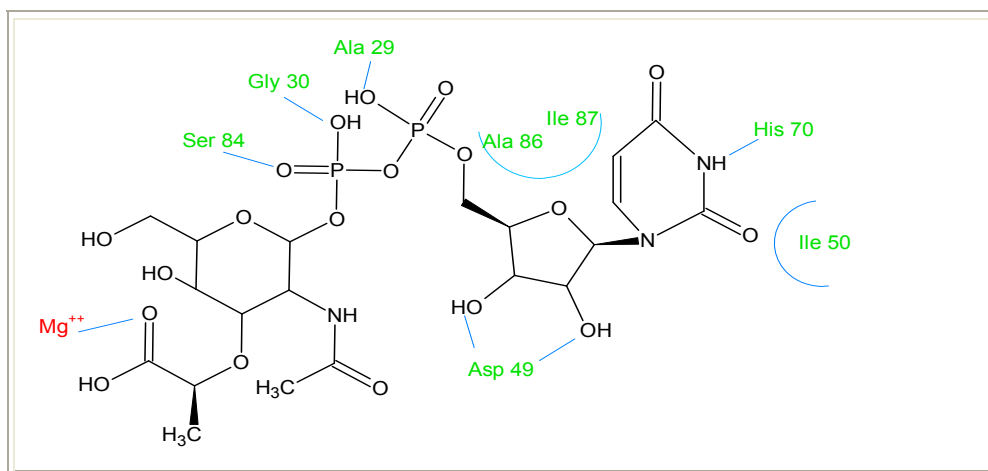
Slika 7: Struktura encima Mur C

MurC veže UNAM tako, da se uracilni obroč se veže med Ile 50 na eni strani in Ala 86 ter Ile 87 na drugi strani. Tvori se vodikova vez med N¹ atomom uracila in stransko verigo His 70. Tudi ribeza tvori dve vodikovi vezi z Asp 49. α -fosfatna skupina UDP tvori vodikovo vez med fosfatnim kisikom in dušikovim atomom verige Ala 29, medtem ko β -fosfatna skupina preko kisika tvori dve vodikovi vezi z N-atomom Gly 30 in O γ atomom Ser 84. N-acetilmuraminski del substrata UNAM se umesti v odprtino med vsem tremi domenami MurC

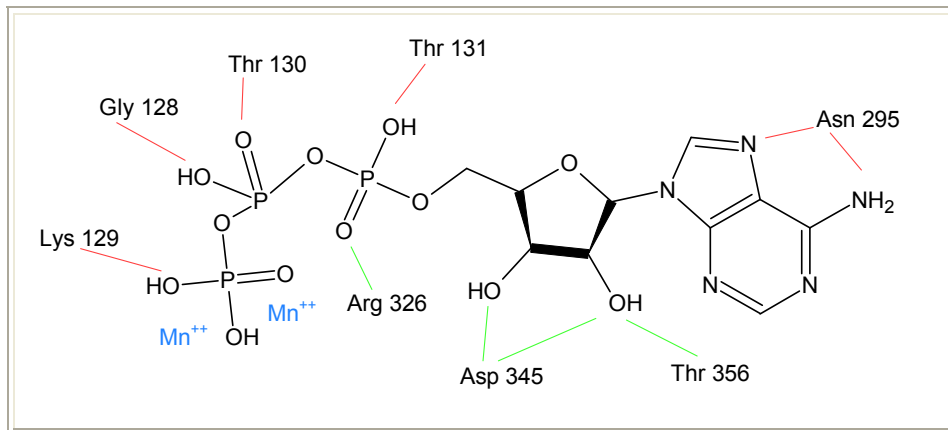
in ne tvori direktnih, specifičnih interakcij z aminokislinskimi ostanki encima. Eden izmed karboksilatnih kisikovih atomov NAM tvori povezavo s kationom v aktivnem mestu strukture MurC:UNAM. Interakcije UNAM z Mur C prikazuje slika 8 (19).

Ob vezavi ATP pride do pretvorbe encima v aktivno konformacijo. ATP-vezavno mesto encima Mur C leži na mejni površini med centralno in C-terminalno domeno. Najpomembnejše so interakcije med obročem adenina ter α - in β -fosfatnimi skupinami z aminokislinskimi ostanki encima. γ -fosfatna skupina leži med dvema dvovalentnima kovinskima ionoma in tvori vmesni acil-fosfatni intermediat, zato je njena natančna orientacija v encimu zelo pomembna. Interakcije vezanega analoga ATP (AMPPNP) z MurC prikazuje slika 9.

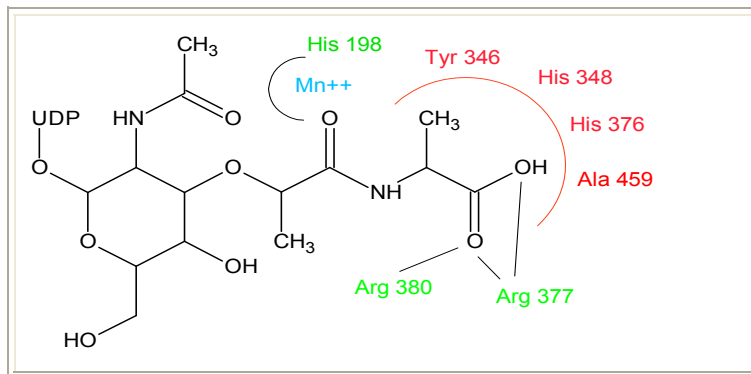
Za pravilno orientacijo L-Ala v UMA sta odgovorni dve stranski verigi argininov (Arg 377, Arg 380), ki tvorita vodikove vezi med gvanidinsko skupino v stranski verigi in karboksilatnim ionom alanina. Specifičnost za alanin izhaja iz plitvega žepa, ki je sestavljen iz stranskih verig His 348, His 376, Tyr 346 in Ala 459. Plitvost tega žepa preprečuje, da bi se vanj vezale večje aminokisliline, hidrofobne lastnosti pa izključujejo vezavo manjših polarnih aminokislin. Orientacijo L-Ala po vezavi na UNAM prikazuje slika 10 (19).



Slika 8: Interakcije UNAM z Mur C



Slika 9: Interakcije AMPPNP z Mur C (zelene vezi- domena, ki veže ligand, rdeče vezi- domena, ki veže ATP)



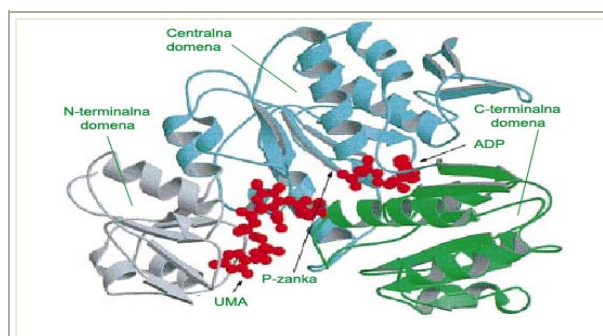
Slika 10: Orientacija L-alanina po vezavi na UNAM

1.5.2. Mur D

Najbolje proučena struktura encima Mur D je iz *E. coli*. Encim je podobno kot drugi encimi iz družine Mur ligaz sestavljen iz treh domen, aktivno mesto encima se nahaja v kotanji, ki je obdana z vsemi domenami. Strukturo encima Mur D prikazuje slika 11.

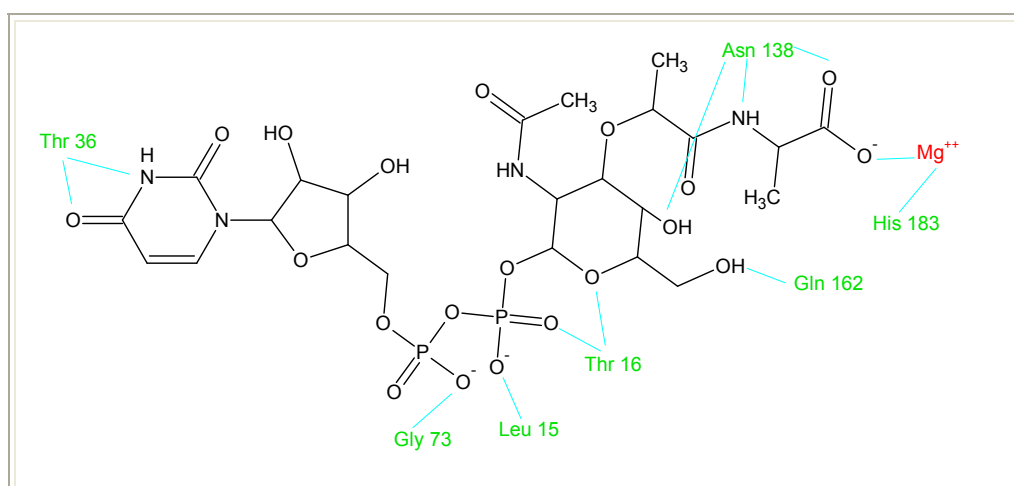
N-terminalna domena obsega aminokislinske ostanke 1-93 in je sestavljena iz petih paralelnih β -nagubanih ravnin, obdanih s štirimi α -vijačnicami. Ta domena je odgovorna za vezavo UDP dela substrata UDP-MurNAc-L-Ala. Centralno domeno sestavljajo aminokislinski ostanke 94-298 in sestoji iz šestih paralelnih β -nagubanih ravnin, ki jih obdaja sedem α -vijačnic, na strani pa ležijo še tri antiparalelne β -nagubane ravnine. Ta domena je odgovorna za vezavo ATP in preostalega dela substrata. C-terminalna domena obsega aminokislinske ostanke 299-437 in obsega šest β -nagubanih ravnin, ena antiparalelna in pet paralelnih, ki jih obkroža pet α -vijačnic. Ta domena katalizira nukleofilni napad amino

skupine D-glutamata za tvorbo UMAG (UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat) (14,20,21).

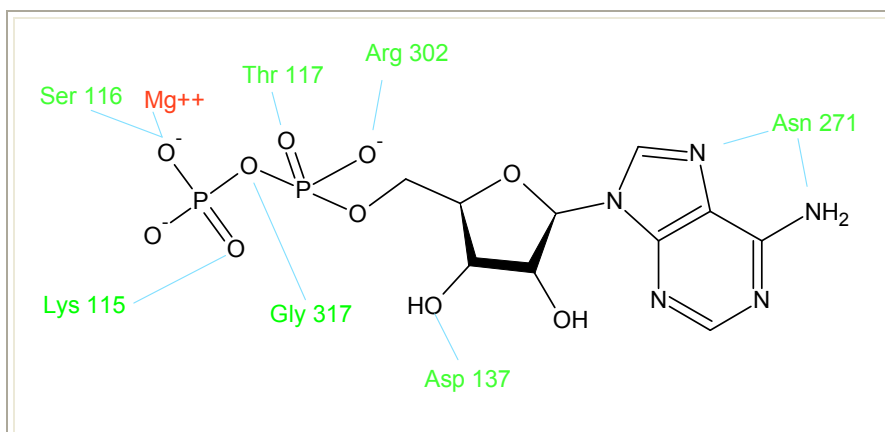


Slika 11: Struktura encima Mur D

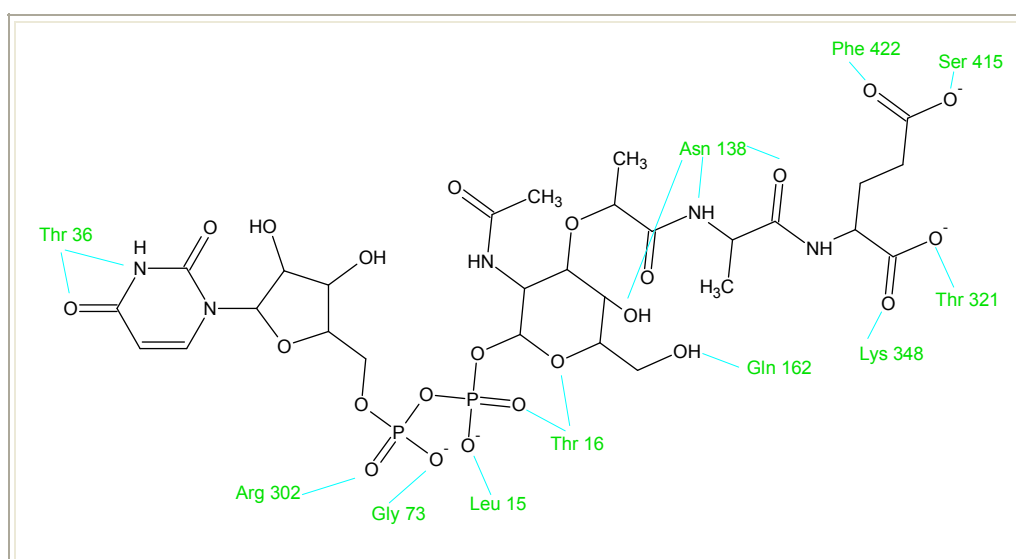
Kristalne strukture kompleksov z različnimi substrati in produkti podpirajo tezo o encimskem mehanizmu, ki poteka preko acilfosfatnega intermedijata. Tako se na Mur D najprej veže ATP, sledi UMA in nazadnje D-Glu. Pri vezavi substrata UMA v aktivno mesto pride do tvorbe vodikovih vezi med UDP delom substrata in aminokislinskimi preostanki Leu 15, Thr 16, Thr 36 in Gly 73. Aminokisliline Leu 15, Thr 16, Thr 36 in Gly 73 so pomembne pri interakcijah z N-acetilmuraminsko kislino. L-alaninski del substrata pa tvori vodikove vezi z Asn 138 in His 183; s tem delom substrata tvori interakcije tudi magnezijev ion (14,20,21). Na slikah 12, 13 in 14 so prikazana vezavna mesta za UMA, ADP in UMAG (20).



Slika 12: Vezavno mesto Mur D za UMA



Slika 13: Vezavno mesto Mur D za ADP



Slika 14: Vezavno mesto Mur D za UMAG

1.5.3. Inhibitorji Mur ligaz

Problem večine do sedaj sintetiziranih inhibitorjev encimov MurC in MurD je, da izkazujejo inhibitorni učinek zgolj na izoliranih encimih, ne delujejo pa na celotno bakterijo. Vzrok za to je predvidoma slabo prehajanje celične membrane, saj prva faza v biosintezi peptidoglikana poteka v citoplazmi. Tako predstavlja celična membrana bariero za hidrofilne spojine. Pri lipofilnih spojinah, ki pa lahko vsopajo v celico s pomočjo difuzije, pa se pojavi drug problem, to je odstranjevanje inhibitorjev iz bakterijske celice. Ravno zaradi tega je potrebno sintetizirati inhibitorje, ki bodo prehajali celično membrano in v citoplazmi ostali v zadostni koncentraciji za inhibitorno delovanje (10).

Znano je tudi, da vsi encimi Mur vežejo kot substrat molekulo z enakim strukturnim elementom, UDP-N-acetilmuramoilno skupino, iz česar lahko sklepamo, da bo potencialni inhibitor zaviral delovanje večih Mur ligaz. Ta podatek pa ovrže dejstvo, da se vse štiri Mur ligaze razlikujejo v vezavi substratov do te mere, da na podoben način vežejo le ATP, zato le inhibitorji, ki se vežejo v vezavno mesto ATP, inhibirajo vse Mur encime (16).

1.5.3.1. Inhibitorji Mur C

Fosfinatni inhibitorji, derivati fosfinske kisline, so najbolj učinkoviti in razširjeni inhibitorji aminokislinskih ligaz in spadajo med analoge prehodnega stanja. Fosfinska kislina, ki mora biti ustrezno substituirana, deluje kot inhibitor encimov, ki katalizirajo tvorbo amidne vezi s sočasno hidrolizo ATP. Encim pospeši prenos γ -fosfatne skupine iz ATP na fosfinatni anion, pri čemer nastaneta ADP in fosforiliran inhibitor. Fosfinska skupina inhibitorja posnema tetraedrični intermediat, ki nastaja pri reakcijah, kataliziranih z Mur ligazami (14,23).

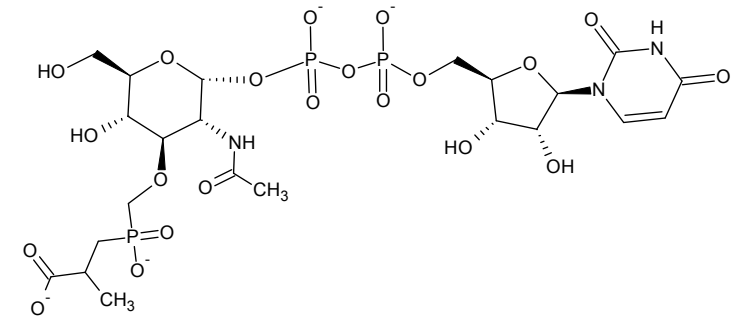
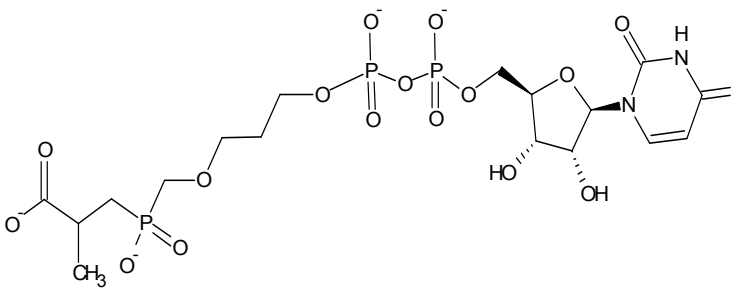
Najmočnejši fosfinatni inhibitor encima Mur C je spojina **1** ($IC_{50}=49 \mu M$). Zamenjava *des*-metilmuraminske kisline s fleksibilnim 1,3-propandiolom, spojina **2**, znatno zmanjša inhibitorno aktivnost fosfinata. Spojini nista imeli protimikrobne aktivnosti, vzrok za to pa se verjetno skriva v neuspešnem prehajanju spojin čez membrano bakterij (10,14,23).

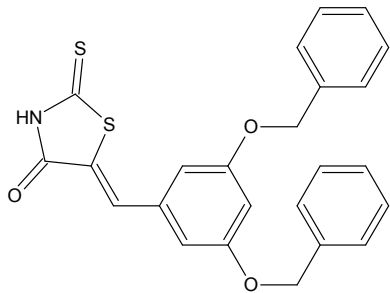
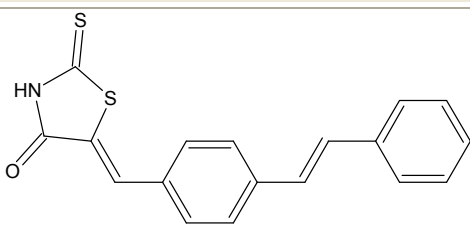
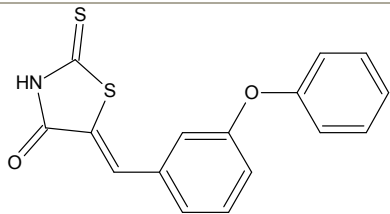
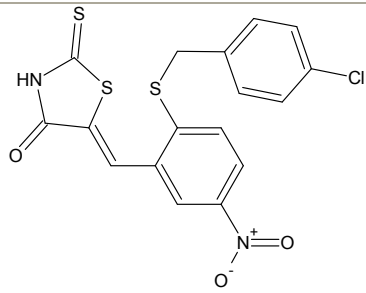
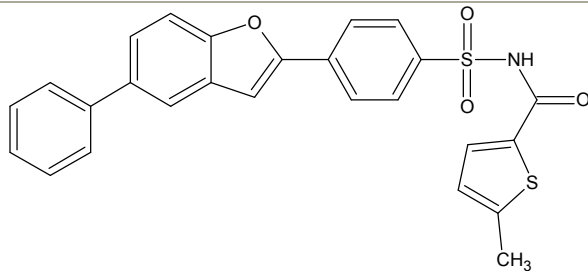
Benziliden rodanini so najbolj aktivni inhibitorji med nizkomolekularnimi nepeptidnimi spojinami. Za sintezo le teh je bila kot spojina vodnica uporabljena spojina **6** ($IC_{50}=27 \mu M$). Sintetiziranih je bilo okoli 40 njenih analogov, vendar so bile aktivne le tiste spojine, ki niso imele substituirane kisle NH skupine na rodaninu, med njimi spojine **3**, **4** in **5**.

Prosta NH skupina je verjetno pomembna za tvorbo vodikovih vezi v aktivnem mestu Mur C. Aktivnost benziliden rodaninov so preizkušali tudi na bakterijskih celicah. Noben ni bil učinkovit proti po Gramu negativni bakteriji E. Coli. Spojini **3** in **4** sta delovali inhibitorno na po Gramu pozitivne meticilin rezistentne seve S. aureusa (MRSA), vendar sta bili toksični za CHO (Chinese hamster ovary) celice (22).

Tudi derivati benzofuran acilsulfonamidov delujejo inhibitorno na Mur C. Mednje uvrščamo spojino **7** ($IC_{50} = 2,3\mu M$), ki encim inhibira časovno odvisno, delno reverzibilno (18).

Tabela I: Pregled nekaterih znanih inhibitorjev Mur C

| SPOJINA | STRUKTURA | IC_{50} za Mur C |
|---|--|------------------------------|
| <i>Fosfinatni analogi prehodnega stanja</i> | | |
| <u>1</u> |  | 49 nM |
| <u>2</u> |  | 60 μM |

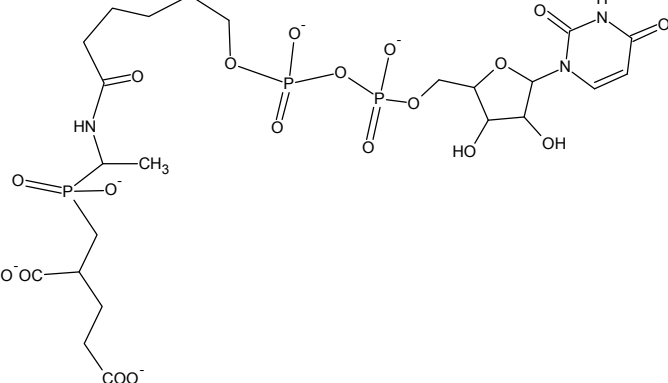
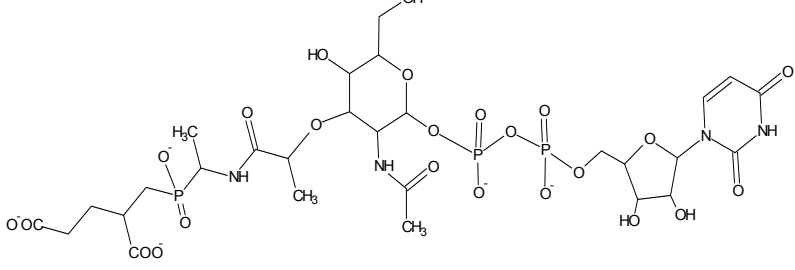
| <i>Benziliden rodanini</i> | | |
|------------------------------------|--|-------------------------------------|
| <u>3</u> |  | 12 μM |
| <u>4</u> |  | 18 μM |
| <u>5</u> |  | 22 μM |
| <u>6</u> |  | 27 μM |
| <i>Benzofuran acil-sulfonamidi</i> | | |
| <u>7</u> |  | 2,3 μM |

1.5.3.2. Inhibitorji Mur D

Prvi učinkovit inhibitor encima Mur D je nekoliko poenostavljen fosfinatni analog prehodnega stanja, spojina **9** ($IC_{50} = <1\text{nM}$). Spojino so razvili na podlagi Tannerjevega inhibitorja, spojina **8**, in ima ohranjen UDP segment, ki je preko lipofilnega mostu povezan z peptidnim delom. Vključitev muraminske skupine v strukturo namesto hidrofobnega distančnika, je odgovorna za povečanje učinkovitosti inhibitorja (24).

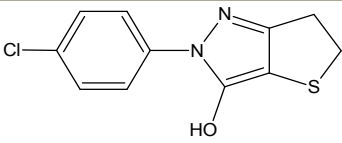
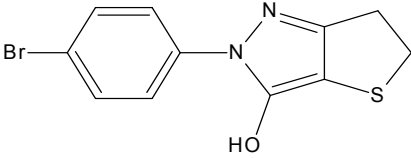
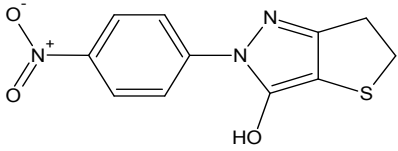
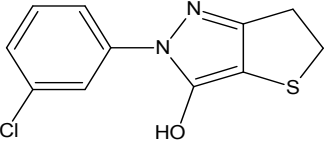
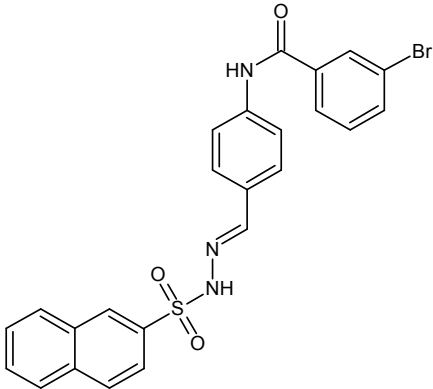
S pomočjo molekulskega modeliranja s pristopom *de novo*, je bila razvita serija makrocikličnih inhibitorjev encima Mur D. Spojine **10** in **11** se vežejo na hidrofobni predel znotraj aktivnega mesta encima, ki ga naravni substrat UMA ob vezavi ne zavzame. Na osnovi tega podatka je moč povečati inhibicijo z vgraditvijo alkilnih skupin, ki se prilegajo hidrofobnemu žepu (25).

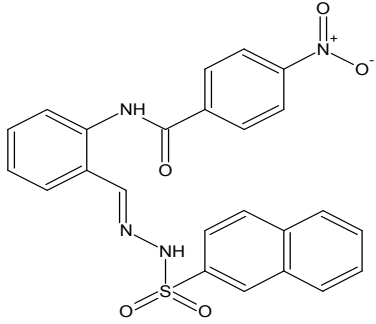
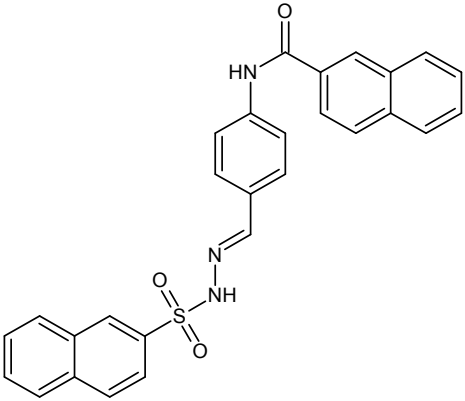
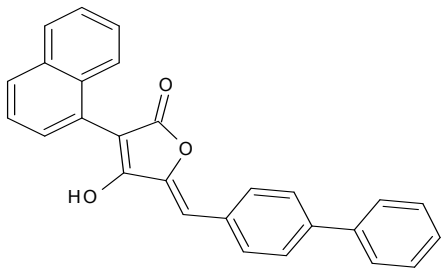
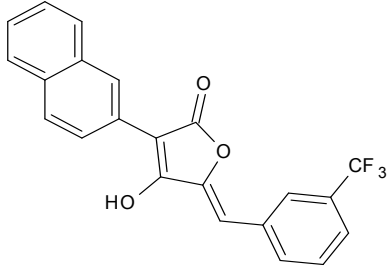
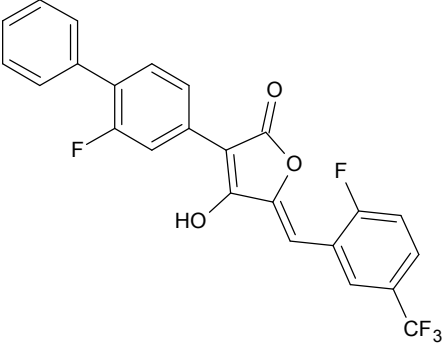
Tabela II: Pregled nekaterih znanih inhibitorjev Mur D

| SPOJINA | STRUKTURA | IC_{50} za Mur D |
|---|--|--------------------|
| <i>Fosfinatni analogi prehodnega stanja</i> | | |
| 8 |  | 680 nM |
| 9 |  | <1 nM |

Tudi dekarboksilirani analogi pulvinske kisline, pulvinoni, imajo inhibitorne lastnosti in sicer delujejo na encime Mur A, Mur B, Mur C in Mur D, vendar je le delovanje na Mur C vedno konstantno. Med najbolj aktivnimi so spojine **19**, **20** in **21**. Te spojine delujejo tudi na MRSA, VRE in PRSP (29).

Tabela III: Pregled nekaterih znanih dualnih inhibitorjev

| SPOJINA | STRUKTURA | IC ₅₀ za Mur C | IC ₅₀ za Mur D |
|---|---|---------------------------|---------------------------|
| <i>2-fenil-5,6-dihidro-2H-tieno[3,2-c]pirazol-3-oli</i> | | | |
| <u>12</u> |  | 10,1 μM | 11,5 μM |
| <u>13</u> |  | 11,4 μM | 9,0 μM |
| <u>14</u> |  | 19,1 μM | 9,5 μM |
| <u>15</u> |  | 15,8 μM | 8,3 μM |
| <i>Sulfonohidrazidni inhibitorji</i> | | | |
| <u>16</u> |  | 30 μM | 30 μM |

| | | | |
|------------------|---|------------------------------------|---|
| <u>17</u> |  | 27 μM | 43 μM |
| <u>18</u> |  | 31 μM | RA(50 μM)= 19% |
| <i>Pulvinoni</i> | | | |
| <u>19</u> |  | 6 μM | >25 μM |
| <u>20</u> |  | 9 μM | >25 μM |
| <u>21</u> |  | 2 μM | 6 μM |

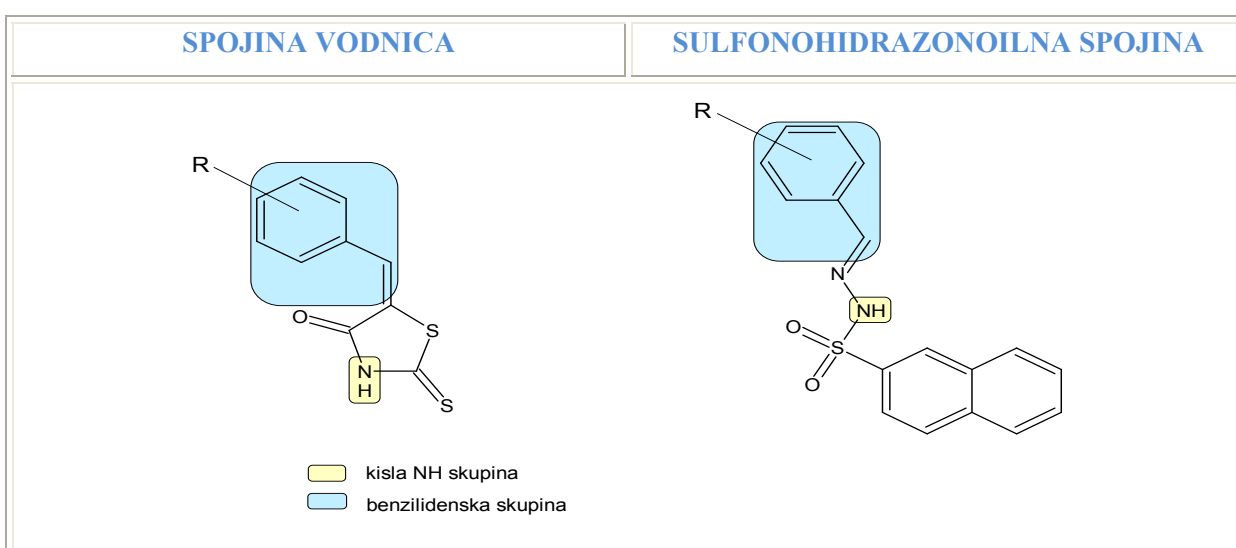
2. NAČRT ZA DELO

V okviru diplomske naloge bomo sintetizirali nove nizkomolekularne potencialne inhibitorje encimov Mur C in Mur D. Kot spojino vodnico bomo pri načrtovanju novih spojin uporabili benziliden rodanine, ki spadajo med najbolj aktivne inhibitorje Mur C med nizkomolekularnimi nepeptidnimi spojinami.

Za inhibitorno aktivnost benziliden rodaninov sta nujno potrebni dve strukturni značilnosti. Prva je prosta kislina NH skupina, kajti v primeru, če je na N vezana metilna, etilna, arilna, alilna ali metilenska skupina, spojine izgubijo inhibitorno aktivnost. Prosta NH skupina omogoča tvorbo vodikovih vezi v aktivnem mestu encima Mur C. Druga strukturna značilnost se nanaša na arilno skupino, ki je vezana na C-5 rodaninov. Analogi rodaninov, ki imajo na C-5 vezano fenoksi-, benziloksi-, fenilsulfanil- ali benzilsulfanil-benzilidensko skupino, imajo izraženo inhibitorno delovanje, medtem ko analogi z alkil- in nitro-benzilidensko, furanilmetilensko skupino, halo-, alkil- ali aril-furanilmetilensko, alkoksinaftalenmetilensko, indanilmetilensko in bifenilmetilensko skupino niso aktivni (22).

Pri našem delu bomo sintetizirali spojine z naslednjimi strukturnimi značilnostmi:

- Prosta kislina NH skupina, ki bo del sulfonohidrazidne skupine, in bo na S atomu imela vezano 2-naftilno skupino
- Benzilidenska skupina, ki bo preko amidne vezi na mestu 4 povezana še z enim aromatskim obročem



Slika 15: Pogled na strukturne značilnosti benziliden rodaninov in sulfonohidrazonoilnih spojin

Eksperimentalnega dela se bomo lotili na takšen način, da bomo posebej sintetizirali posamezne sintone in jih na koncu povezali med seboj. Iz naftalen-2-sulfonilklorida in hidrazin monohidrata bomo pripravili naftalen-2-sulfonohidrazid.

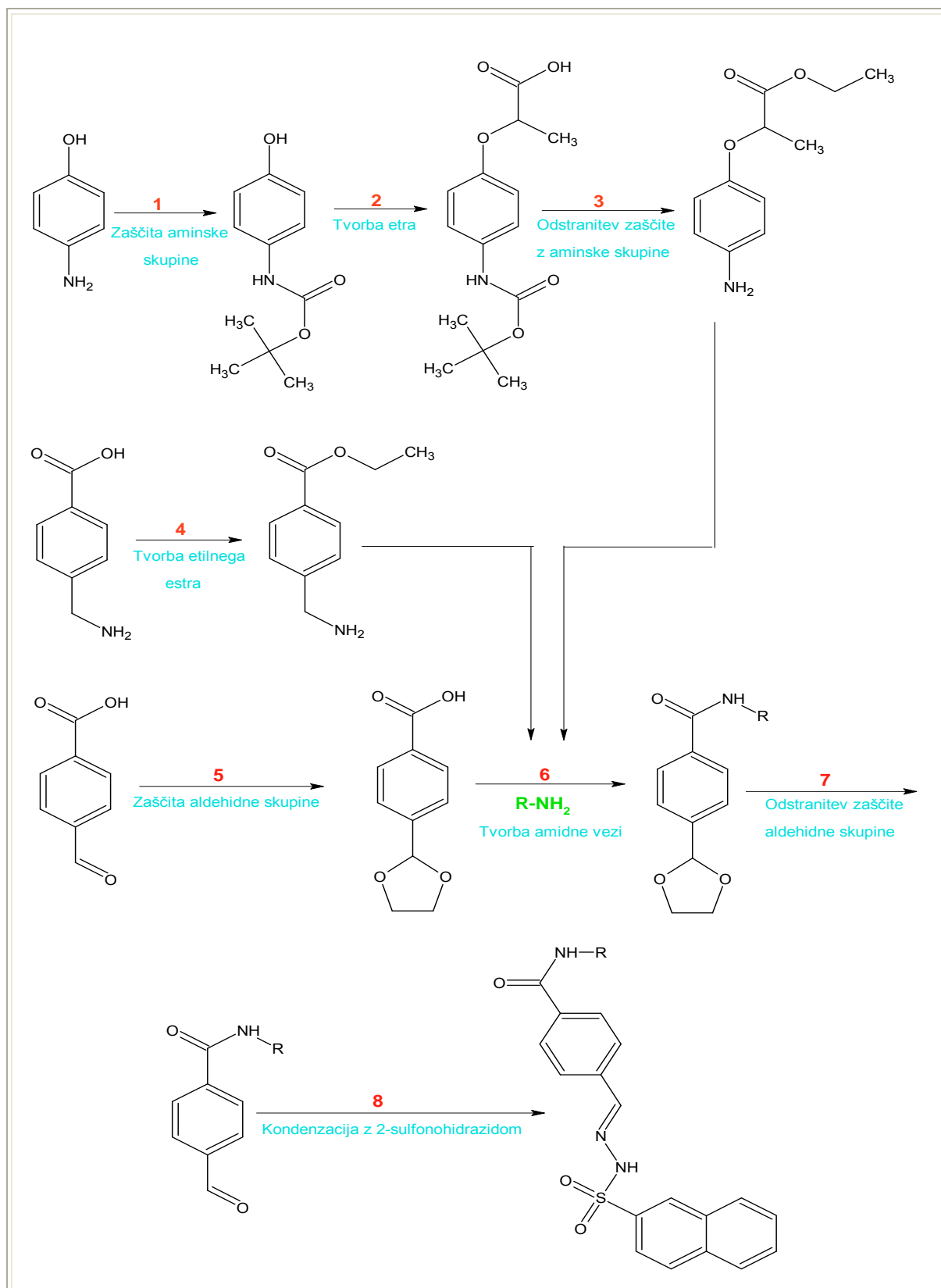
Pri sintezi derivatov 4-{{2-(2-naftilsulfonyl)hydrazono}methyl}benzamide bomo kot izhodne spojine uporabili 4-formylbenzoic acid, *p*-aminophenol in 4-(aminomethyl)benzoic acid.

4-formyl benzoic acid bomo najprej zaščitili aldehydic group s pomočjo ethylene glycol. Na free carboxylic acid group bomo nato v prisotnosti EDC in HOBT connected different primary amines. Sledila bo odščita aldehydic group z methanoic acid and other protected groups and condensation of naphthalen-2-sulfonohydrazide.

Some primary amines bomo pripravili tudi sami in sicer ethyl 2-(4-aminophenoxy)propanoate, kjer bomo *p*-aminophenol najprej zaščitili NH₂ group with di-*tert*-butyldicarbonate. Sledila bo tvorba appropriate ether with chloropropionic acid. In next step bomo hkrati zaščitili free COOH group in form of ethyl ester and deprotected NH₂ group, s katero bomo nato tvorili amidno vez z COOH group 4-(1,3-dioxolan-2-yl)benzoic acid.

Prepared bomo tudi ethyl 4-(aminomethyl)benzoate, kjer bomo 4-(aminomethyl)benzoic acid najprej converted to ethyl ester and then formed amid with NH₂ group of starting compound and COOH group 4-(1,3-dioxolan-2-yl)benzoic acid.

Synthesized compounds bomo *in vitro* tested on enzymes Mur C and Mur D, involved in biosynthesis of peptidoglycan. Results, which we will obtain, will show us, whether our understanding of structural requirements for binding to active site of enzyme is correct and whether we can provide a lead for further research on low molecular weight neuropeptide inhibitors of Mur C and Mur D enzymes.



Slika 16: Reakcijska shema sinteze derivatov 4-aminobenzaldehida

1: $(\text{BOC})_2\text{O}$, dioksan, H_2O ; **2:** $\text{EtO}^-\text{Na}^+/\text{EtOH}$, $\text{ClCH}_2(\text{CH}_3)\text{COOH}$, $\text{EtOH}_{\text{abs.}}$; **3:** SOCl_2 $\text{EtOH}_{\text{abs.}}$; **4:** SOCl_2 , $\text{EtOH}_{\text{abs.}}$; **5:** etilenglikol, H^+ ; **6:** EDC, HOBT, Et_3N , CH_2Cl_2 ; **7:** HCOOH , kaplj. H_2O ; **8:** naftalen -2-sulfonhidrazida, EtOH ali $\text{Et}_3\text{N}/\text{THF}$

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

Uporabljali smo reagente in topila proizvajalcev Acros, Aldrich, Fluka, Janssen, Kemika in Merck. Vsebnost vseh uporabljenih reagentov je bila od 90 do 99,9%, razen kjer je navedeno drugače.

3.2. Metode

3.2.1. Tankoplastna kromatografija (TLC)

Uporabljali smo plošče Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) z 0,22 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu. Za detekcijo spojin na ploščah smo uporabljali UV svetilko z valovno dolžino 254 nm.

3.2.2. Kolonska kromatografija

Za kolonsko kromatografijo smo uporabljali steklene kolone podjetja Merck. Kot stacionarno fazo smo uporabljali Kieselgel 60 z velikostjo delcev 0,063-0,200 mm in ustrezne mobilne faze.

3.2.3. Jedrska magnetna resonanca (NMR)

¹H NMR spektri so bili posneti z instrumentom Bruker Avance DPX₃₀₀ (proizvajalec: Bruker, Nemčija) na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, v okviru Nacionalnega centra za NMR spektroskopijo visoke ločljivosti. Kot topilo smo uporabljali DMSO-d₆. Spektri so bili posneti pri 300,12 MHz s TMS kot internim standardom pri temperaturi 302 K.

3.2.4. Masna spektrometrija (MS)

Masne spektre so posneli na masnem spektrometru Varian-MAT 311 z FAB, ESI ali EI tehniko na inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

3.2.5. IR spektroskopija (IR)

IR spektri so bili posneti s spektrometrom FTIR, model 1600 (proizvajalec: Perkin Elmer, ZDA) na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

3.2.6. Tališča

Tališča spojin smo določali s Koflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica in niso korigirana.

3.2.7. Biokemijska testiranja

Vse razen ene spojine, ki smo jih sintetizirali, so bile testirane na inhibitorno aktivnost proti Mur C in Mur D, ena je bila testirana le na Mur D, s testom z malahitnim zelenim.

Oba encima potrebujeta za potek reakcije ATP, ki razpade na ADP in fosfat. Nastanek fosfata določimo spektrofotometrično pri 650 nm posredno preko tvorbe zeleno obarvanega kompleksa z malahitnim zelenim (reagent Biomol). Katalitično aktivnost encimov MurC in MurD ovrednotimo na podlagi množine fosfata, ki nastane pri reakciji. Ob dodatku inhibitorja se katalitična aktivnost encima zniža, zato je množina nastalega fosfata manjša v primerjavi s kontrolo brez inhibitorja. Testi so bili izvedeni na Fakulteti za Farmacijo v Ljubljani.

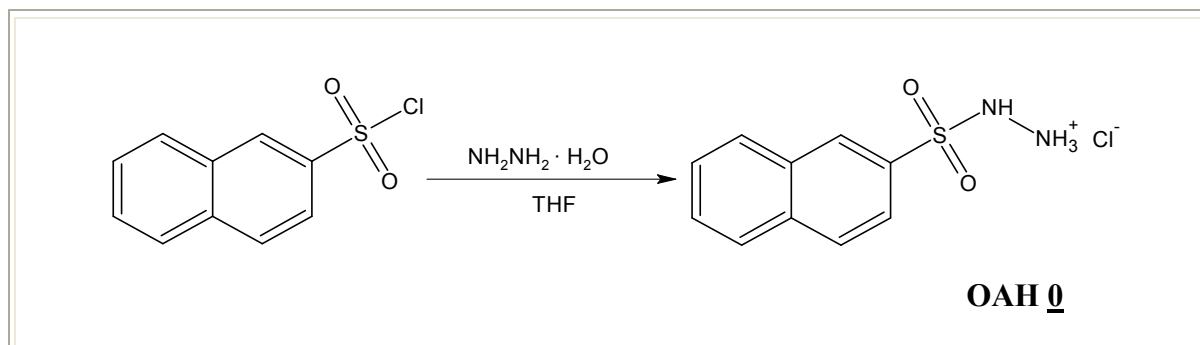
3.2.8. Risanje spojin in nomenklatura

Za poimenovanje spojin in risanje strukturnih formul smo uporabljali računalniška programa ACD/ChemSketch in IUPAC Name Pro, verzija 3.50 podjetja Advance Chemistry development, Inc.

4.

EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. Sinteza naftalen-2-sulfonohidrazidijevega klorida (OAH 0)



V bučko smo natehtali 10,3 g (45,2 mmol) hidrazin monohidrata in nato po kapljicah dodajali raztopino 15 g (66,2 mmol) naftalen-2-sulfonil klorida v 100 mL THF pri -25°C ter reakcijsko zmes 30 minut mešali pri enaki temperaturi. Nato smo dodali 200 mL etilacetata (23°C) in reakcijsko zmes takoj začeli spirati z ledeno 10% vodno raztopino NaCl (3x50 mL). Organsko fazo smo eno uro sušili z Na_2SO_4 in jo nato počasi ob mešanju dodajali v heksan (1000 mL, 23°C). Pri tem se je oboril bel produkt, ki smo ga odfiltrirali s presesavanjem in posušili na zraku. Dobili smo 10,6 g (40,9 mmol) trdnega produkta bele barve.

Izkoristek: 91 %

Elementna sestava: $\text{C}_{10}\text{H}_{11}\text{ClN}_2\text{O}_2\text{S}$

M: 258,725 g mol^{-1} (brez HCl: 222,265 g mol^{-1})

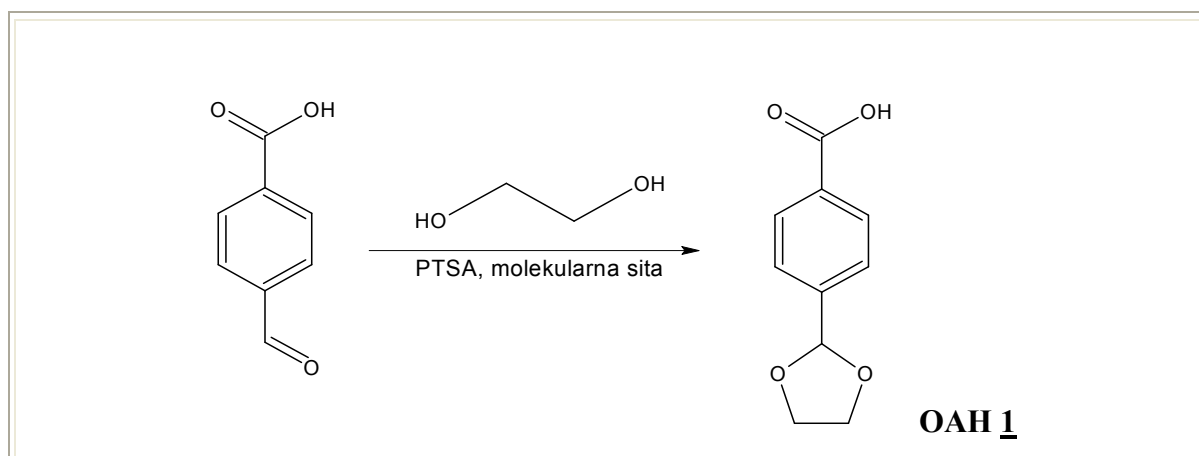
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 6,80 (s, 3H, NH-NH_3^+), 7,71 (q, 2H, $J=8,8$ Hz, Ar-H), 7,90 (dd, 1H, $J_1=7,8$ Hz, $J_2=1,8$ Hz, Ar-H), 8,06 (d, 1H, $J=7,6$ Hz, Ar-H), 8,16 (d, 2H, $J=8,5$ Hz, Ar-H), 8,65 (s, 1H, Ar-H), 10,1 (s, 1H, $\text{SO}_2\text{-NH-NH}_3^+$) ppm.

MS (FAB): m/z(%): 222 (M^+ , 50), 127 (100)

IR (KBr): ν 3328, 3172, 2835, 1725, 1530, 1432, 1280, 1162, 821, 756, 666 cm^{-1} .

Tališče: 140-142 $^{\circ}\text{C}$

4.2. Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)benzojske kisline (OAH 1)



Molekularna sita (0,4 nm) smo aktivirali s segrevanjem v sušilniku pri 120°C 20 minut. 5 g (33,3 mmol) 4-formilbenzojske kisline smo raztopili v 40 mL toluena in dodali 13,2 g (213 mmol) etilenglikola, 240 mg (1,39 mmol) 4-toluensulfonske kisline kot katalizatorja in 1,00 g molekularnih sit ter segrevali pri temperaturi vrenja (111°C) 6 ur. Nato smo molekularna sita odfiltrirali s presesavanjem in matičnici dodali 50 mL 10% vodne raztopine citronske kisline. Ločili smo organsko in vodno fazo, nato vodno fazo ekstrahirali z dvakrat po 20 mL toluena in 30 mL etilacetata. Združili smo vse organske faze in jih sprali s 40 mL nasičene vodne raztopine NaCl, sušili z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 4,82 g (24,8 mmol) svetlo rumenega trdnega produkta.

Izkoristek: 75 %

Elementna sestava: C₁₀H₁₀O₄

M: 194,184 g mol⁻¹

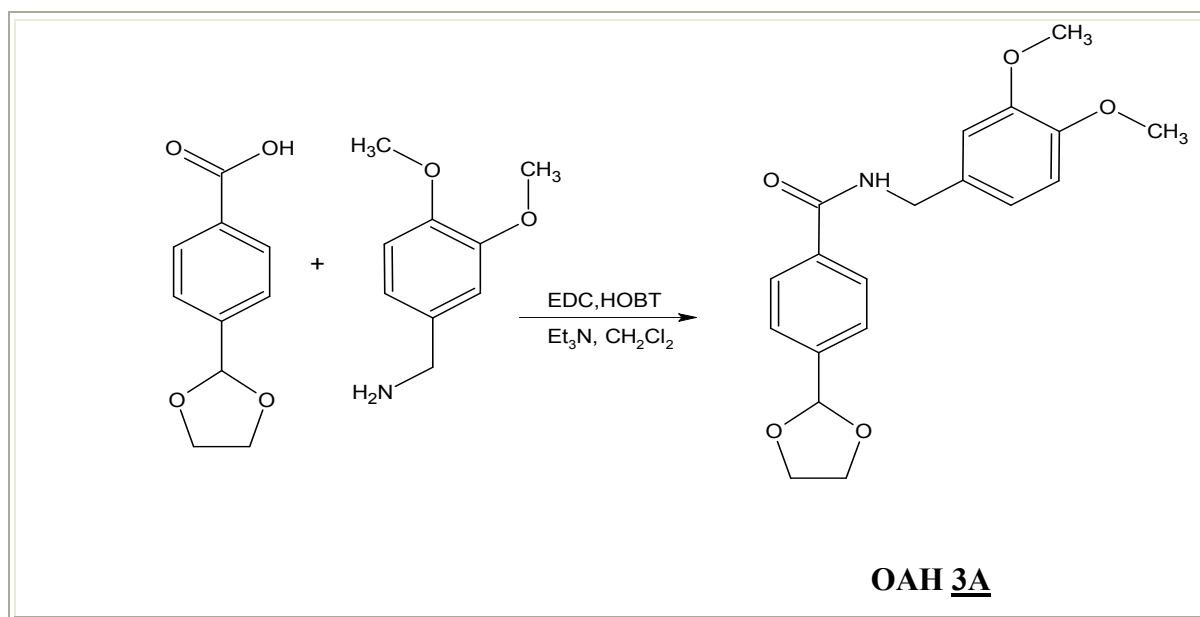
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 3,95-4,01 (m, 2H, O-CH₂-CH₂), 4,02-4,09 (m, 2H, O-CH₂-CH₂), 5,81 (s, 1H, Ar-CH), 7,55-7,98 (AA'BB' 4H, J=8,22 Hz, Δv = 56,2 Hz, Ar-H), 13,1 (s, 1H, COOH) ppm.

MS (FAB): m/z(%): 195 (MH⁺, 31), 93 (100)

IR (KBr): 3422, 2891, 2555, 1687, 1577, 1431, 1292, 1126, 1073, 1018, 942, 760, 547 cm⁻¹.

Tališče: 63-68 °C

4.3. Sinteza *N*-(3,4-dimetoksibenzil)-4-(1,3-dioksolan-2-il)benzamida (OAH 3A)



V suho bučko, ki jo postavimo na ledeno kopel (0-5 °C) smo natehtali 1 g (5,15 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)benzojske kisline in jo nato raztopili v 25 mL diklorometana, dodali 990 mg (5,15 mmol) EDC, 700 mg (5,15 mmol) HOBT in 2 mL brezvodnega trietilamina. Zmes smo nato na ledeni kopeli mešali še 1 uro. Nastala je svetlo rumena raztopina, ki smo ji dodali 1,09 g (6,50 mmol) 3,4-dimetoksibenzilamina. Reakcijsko zmes smo nato 24 ur mešali pri sobni temperaturi in jo nato ekstrahirali z dvakrat po 15 mL 10% vodne raztopine citronske kisline, z dvakrat 15 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, z 15 mL prečiščene vode, in s 15 mL nasičene vodne raztopine NaCl v navedenem vrstnem redu. Nato smo organsko fazo sušili pol ure z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 1,30 g (3,79 mmol) svetlo oranžnega trdnega produkta.

Izkoristek: 74 %

Elementna sestava: C₁₉H₂₁NO₅

M= 343,374 g mol⁻¹

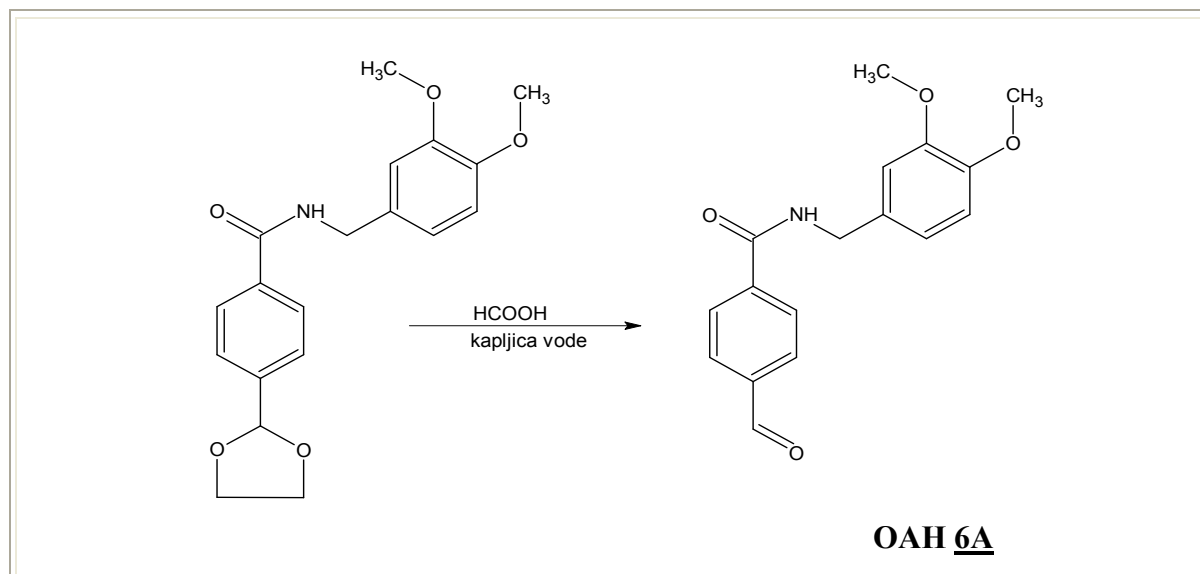
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 3,73 (2s, 6H, CH₃), 4,01 (m, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 4,42 (t, 2H, J=12,3 Hz, NH-CH₂), 5,79 (s, 1H, CH), 6,91 (m, 3H, Ar-H), 7,51-7,92 (AA'BB', 4H, J= 8,3 Hz, Δv = 114 Hz, Ar-H), 8,96 (s, 1H, CO-NH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 344 (MH⁺, 100)

IR (KBr): ν 3423, 2991, 2961, 2832, 1639, 1546, 1519, 1438, 1316, 1271, 1142, 1084, 1023, 846, 749, 689 cm^{-1} .

Tališče: 105-110 $^{\circ}\text{C}$

4.4. Sinteza *N*-(3,4-dimetoksibenzil)-4-formilbenzamida (OAH 6A)



V bučko smo natehtali 1,30 g (3,79 mmol) *N*-(3,4-dimetoksibenzil)-4-(1,3-dioksolan-2-il)benzamida, ki smo mu dodali 15 mL metanojske kisline in kapljico vode. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi čez noč. Potem smo metanojsko kislino odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo naalkalili z NaHCO_3 do $\text{pH}=8$. Vodno fazo smo nato ekstrahirali z štirikrat po 20 mL diklorometana. Združene organske faze smo nato pol ure sušili z Na_2SO_4 ter topilo pod znižanim tlakom uparili do suhega. Dobili smo 440 mg (1,46 mmol) belega trdnega praška.

Izkoristek: 39 %

Elementna sestava: $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_4$

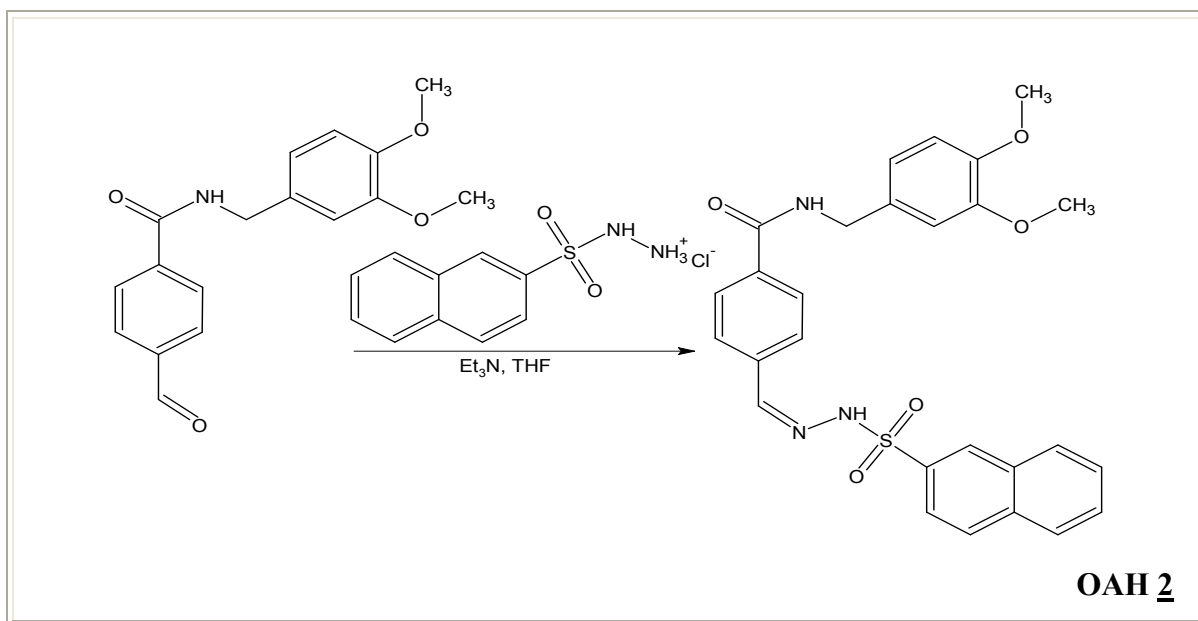
M= 299,321 g mol^{-1}

^1H NMR (300 MHz, DMSO-d_6): δ 3,73 (2s, 6H, CH_3), 4,43 (d, 2H, $J=5,92$ Hz, NH-CH_2), 6,89 (m, 3H, Ar-H), 7,96-8,01 (AA'BB', 4H, $J=8,1$ Hz, $\Delta\nu=8,5$ Hz, Ar-H), 9,16 (s, 1H, CO-NH), 10,1 (s, 1H, CHO) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 300 (MH^+ , 100)

IR (KBr): ν 3380, 2994, 2876, 2346, 1697, 1654, 1534, 1498, 1459, 1264, 1233, 1142, 1026, 814, 757, 638 cm^{-1} .

4.5. Sinteza *N*-(3,4-dimetoksibenzil)-4-((-2-(2-naftilsulfonyl)hidrazono)metil)benzamida (OAH 2)



V suho bučko smo natehtali 440 mg (1,64 mmol) *N*-(3,4-dimetoksibenzil)-4-formil benzamida in dodali 470 mg (1,80 mmol) soli naftalen-2-sulfonohidrazida ter oba reagenta raztopili v 15 mL tetrahidrofurana. Zatem smo zmesi dodali še 0,5 mL brezvodnega trietilamina, bučko opremili z vodnim povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter reakcijsko zmes pri temperaturi segrevali čez noč. Pod znižanim tlakom smo odparili topilo in dobili oljnat svetlorumen produkt, ki smo ga čistili s kolonsko kromatografijo (silikagel; MF= etilacetat: heksan=1:1) in dobili 100 mg (0,20 mmol) belega trdnega produkta.

Izkoristek: 12 %

Elementna sestava: $\text{C}_{27}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$

M= 503,571 g mol^{-1}

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,72 (2s, 6H, CH_3), 4,39 (d, 2H, $J=6,33$ Hz, NH-CH_2), 6,88 (m, 3H, Ar-H), 7,65-7,82 (m, 3H, Ar-H), 7,41-7,87 (AA'BB', 4H, $J=8,3$ Hz, $\Delta\nu = 130$ Hz, Ar-H), 8,05-8,42 (m, 4H, Ar-H), 8,62 (s, 1H, CH=N), 8,92 (s, 1H, CO-NH), 10,0 (s, 1H, =N-NH-SO $_2$) ppm.

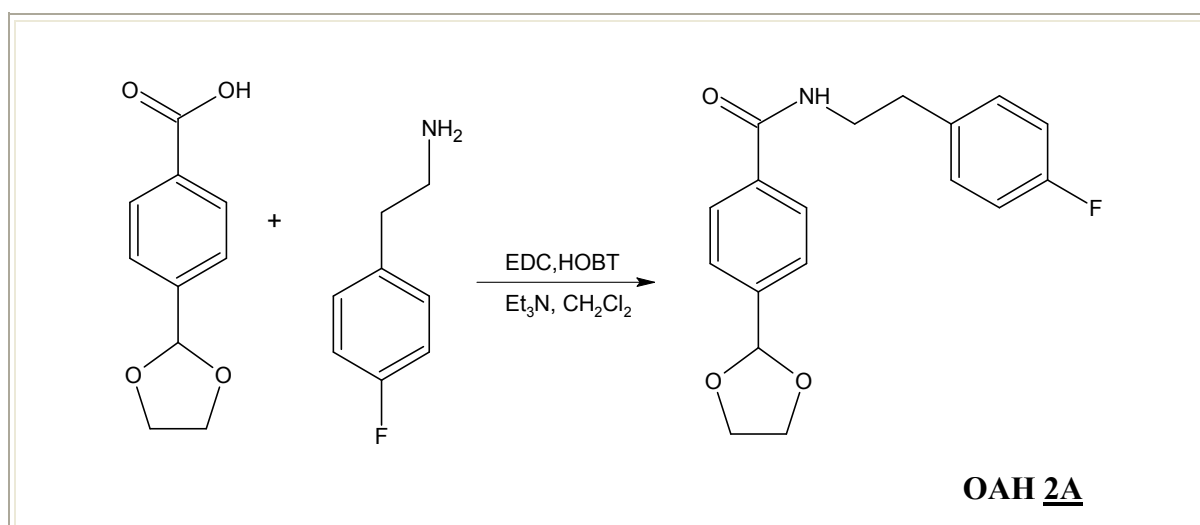
MS (ESI): m/z (%): 526 (MNa⁺, 100)

IR (KBr): ν 3308, 2938, 2832, 2362, 1696, 1635, 1542, 1518, 1388, 1320, 1260, 1234, 1159, 1141, 1027, 940, 810, 758, 662, 625 cm⁻¹.

Tališče: 120-125 °C

Elementna analiza: Izračunano za C₂₇H₂₅N₃O₅S (503,571 g/mol): 64,40% C, 5,00% H, 8,34% N; **Izmerjeno:** 64,28% C, 4,85% H, 8,40% N.

4.6. Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)-N-(4-fluorofenil)benzamida (OAH 2A)



V suho bučko, ki jo postavimo na ledeno kopel (0-5 °C), smo natehtali 1 g (5,15 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)benzojske kisline in jo nato raztopili v 25 mL diklorometana, dodali 990 mg (5,15 mmol) EDC, 700 mg (5,15 mmol) HOBT in 2 mL brezvodnega trietilamina. Zmes smo nato na ledeni kopeli mešali še 1 uro. Nastala je svetlo rumena raztopina, ki smo ji dodali 910 mg (6,50 mmol) 2-(4-fluorofenil)-1-etanamina. Reakcijsko zmes smo nato 24 ur mešali pri sobni temperaturi. Potem smo organsko fazo spirali z dvakrat po 15 mL 10% vodne raztopine citronske kisline, z dvakrat 15 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, s 15 mL prečiščene vode, in s 15 mL nasičene vodne raztopine NaCl v navedenem vrstnem redu. Nato smo organsko fazo sušili pol ure z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 900 mg (2,86 mmol) svetlo rjavega trdnega produkta.

Izkoristek: 56 %

Elementna sestava: C₁₈H₁₈FNO₃

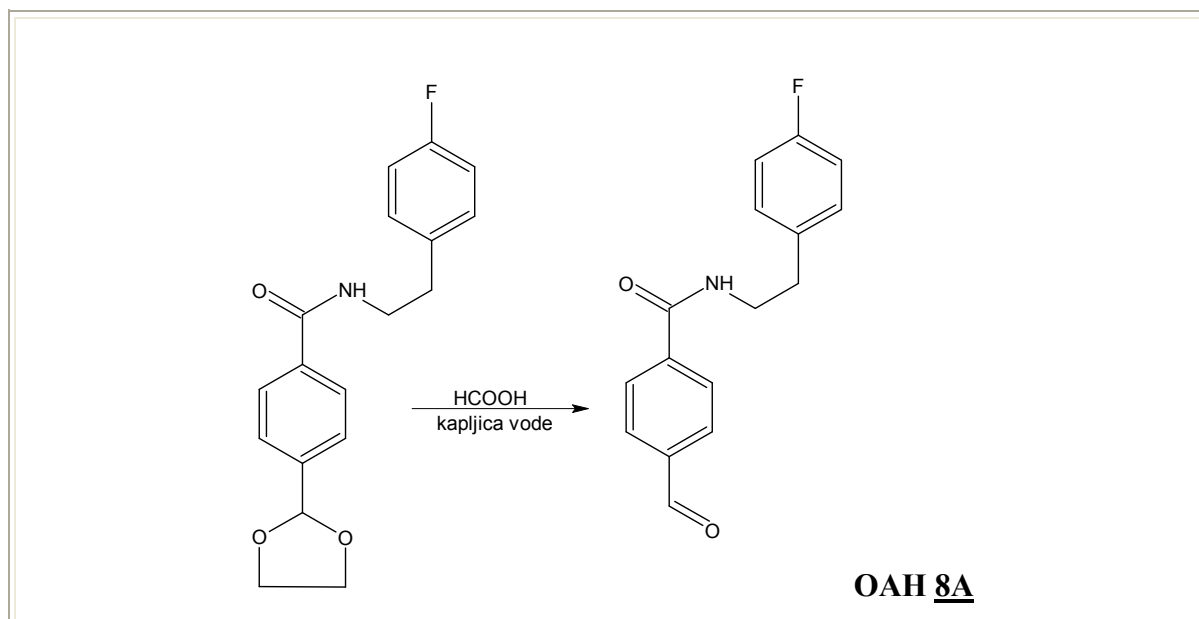
M= 315,339 gmol⁻¹

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2,84 (t, 2H, $J=14,5$ Hz, Ar- CH_2), 3,47 (m, 2H, CH_2), 3,98 (m, 4H, O- CH_2 - CH_2 -O), 5,79 (s, 1H, CH), 7,08-7,29 (AA'BB', 4H, $J= 14,3\text{Hz}$, $\Delta\nu = 51,4$ Hz , Ar-H), 7,49-7,83 (AA'BB', 4H, $J= 8,2$ Hz, $\Delta\nu = 95,0$ Hz , Ar-H), 8,56 (s, 1H, CO-NH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 316 (MH^+ , 58), 291 (100)

IR (KBr): ν 3336, 2871, 1640, 1542, 1509, 1219, 1087, 1015, 845, 770, 658, 505 cm^{-1} .

4.7. Sinteza *N*-(fluorofenetil)-4-formilbenzamida (OAH 8A)



V bučki smo natehtali 900 mg (2,86 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)-*N*-(4-fluorofenetil)benzamida, ki smo mu dodali 15 mL metanojske kisline in kapljico vode. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi čez noč. Potem smo metanojsko kislino odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo naalkalili z NaHCO_3 do $\text{pH}=8$. Vodno fazo smo nato ekstrahirali s štirikrat po 25 mL diklorometana. Združene organske faze smo nato pol ure sušili z Na_2SO_4 ter topilo pod znižanim tlakom uparili do suhega. Dobili smo 270 mg (1,00 mmol) belega trdnega produkta.

Izkoristek: 35 %

Elementna sestava: $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{FNO}_2$

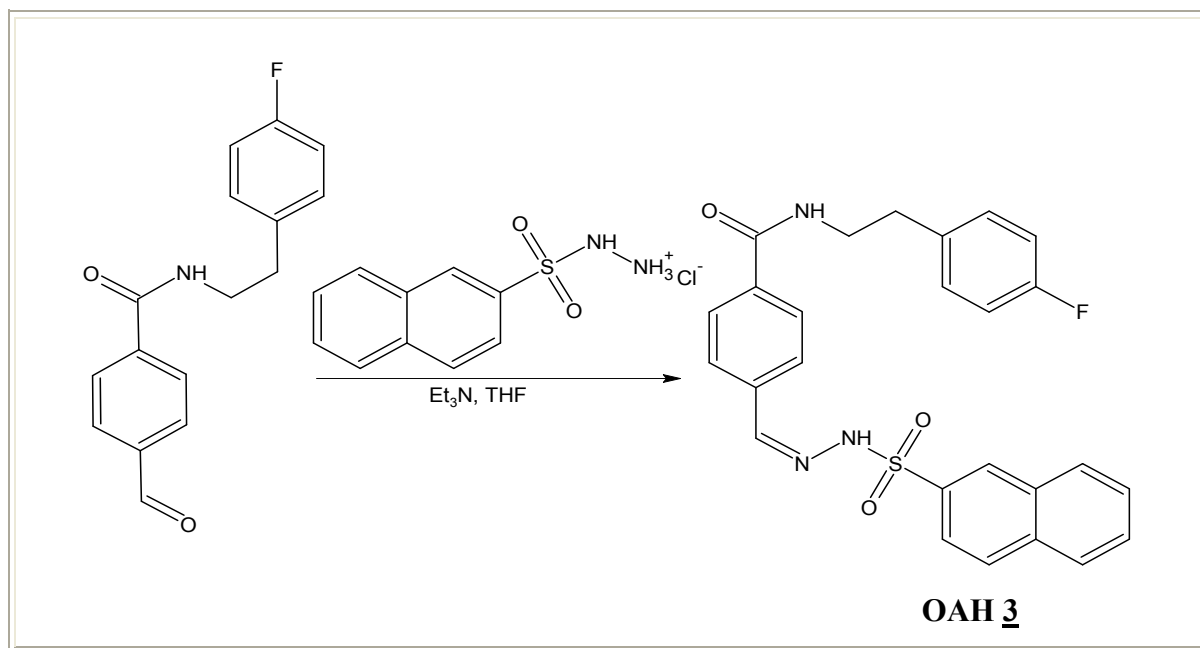
M= 271,286 gmol^{-1}

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2,85 (t, 2H, $J=14,5$ Hz, Ar- CH_2), 3,50 (m, 2H, CH_2), 5,79 (s, 1H, CH), 7,07-7,30 (AA'BB', 4H, $J=23,7$ Hz, $\Delta\nu = 56,0$ Hz, Ar- H), 7,95-7,98 (AA'BB', 4H, $J=8,8$ Hz, $\Delta\nu = 28,6$ Hz, Ar- H), 8,75 (s, 1H, CO-NH), 10,1 (s, 1H, CHO) ppm.

MS (EI): m/z (%): 271 (M^+ , 50), 133 (100)

IR (KBr): ν 3420, 3293, 2935, 2346, 1702, 1636, 1542, 1509, 1322, 1217, 1155, 1099, 1017, 818, 762, 562 cm^{-1} .

4.8. Sinteza *N*-(fluorofenetil)-4-((2-(2-naftilsulfonyl)hidrazono)metil)benzamida (OAH 3)



V suho bučko smo natehtali 270 mg (1,00 mmol) *N*-(fluorofenetil)-4-formilbenzamida in dodali 290 mg (1,10 mmol) soli naftalen-2-sulfonohidrazida ter oba reagenta raztopili v 15 mL tetrahidrofurana. Zatem smo zmesi dodali še 0,5 mL brezvodnega trietilamina. Nato smo bučko opremili z vodnim povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter reakcijsko zmes pri temperaturi vrenja segrevali čez noč. Pod znižanim tlakom odparili topilo smo dobili oljnat svetlo rjav produkt, ki smo ga čistili s kolonsko kromatografijo (silikagel; MF=etilacetat) in dobili smo 90 mg (0,19 mmol) belega trdnega produkta.

Izkoristek: 19 %

Elementna sestava: $\text{C}_{26}\text{H}_{22}\text{FN}_3\text{O}_3\text{S}$

M= 475,536 g mol^{-1}

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2,81 (t, 2H, J=14,2 Hz, Ar-CH₂), 3,48 (m, 2H, CH₂), 7,06-7,27 (AA'BB', 4H, J= 17,6 Hz, Δv = 46,1 Hz, Ar-H), 7,68 (m, 2H, Ar-H), 7,61-7,77 (AA'BB', 4H, J= 8,2 Hz, Δv = 39,1 Hz Ar-H), 7,80-8,24 (m, 5H, Ar-H), 8,49 (s, 1H, CH=N), 8,57 (s, 1H, CO-NH), 11,7 (s, 1H, =N-NH-SO₂) ppm.

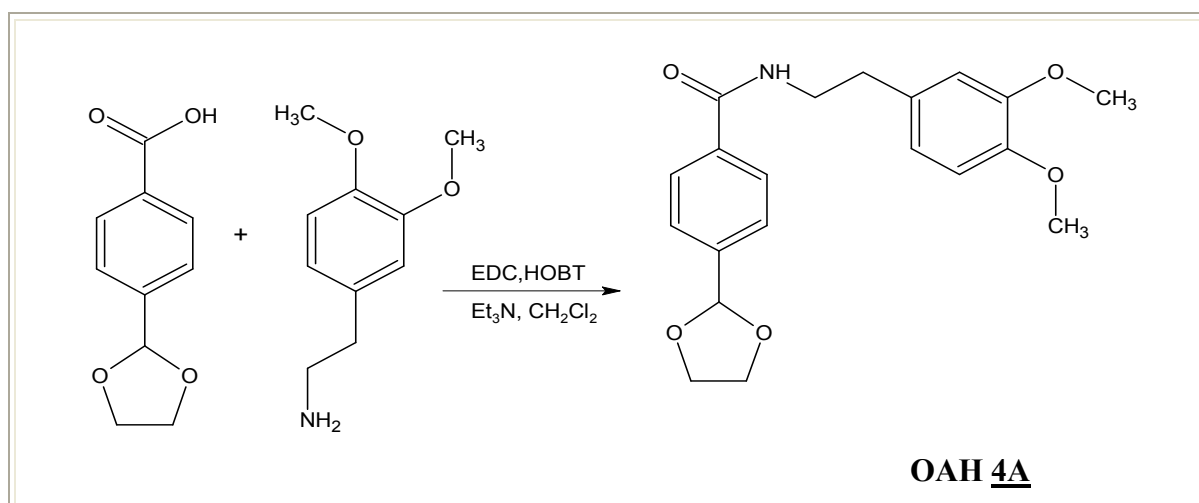
MS (ESI): m/z (%): 476 (MH⁺, 100)

IR (KBr): ν 3418, 3212, 3056, 2940, 1634, 1539, 1508, 1456, 1365, 1328, 1162, 1071, 968, 937, 862, 821, 753, 641, 553 cm⁻¹.

Tališče: 185-188 °C

HR-MS: Izmerjeno za: C₂₆H₂₃N₃O₃SF : 476,1457; **Izračunano:** 476,1444.

4.9. Sinteza *N*-(3,4-dimetoksifenil)-4-(1,3-dioksolan-2-il)benzamida (**OAH 4A**)



V suho bučko, ki jo postavimo na ledeno kopel (0-5 °C), smo natehtali 1 g (5,15 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)benzojske kisline in jo nato raztopili v 25 mL diklorometana, dodali 990 mg (5,15 mmol) EDC, 700 mg (5,15 mmol) HOBT in 2 mL brezvodnega trietilamina. Zmes smo nato na ledeni kopeli mešali še 1 uro. Nastala je svetlo rumena raztopina, ki smo ji dodali 1,18 g (6,50 mmol) 2-(3,4-dimetoksifenil)-1-etanamina. Reakcijsko zmes smo nato 24 ur mešali pri sobni temperaturi in jo nato ekstrahirali z dvakrat po 15 mL 10% vodne raztopine citronske kisline, z dvakrat 15 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, s 15 mL prečiščene vode, in s 15 mL nasičene vodne raztopine NaCl v navedenem vrstnem redu. Nato smo organsko fazo sušili pol ure z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 1,79 g (5,00 mmol) svetlo rjavega trdnega produkta.

Izkoristek: 97 %

Elementna sestava: C₂₀H₂₃NO₅

M= 357,400 g mol⁻¹

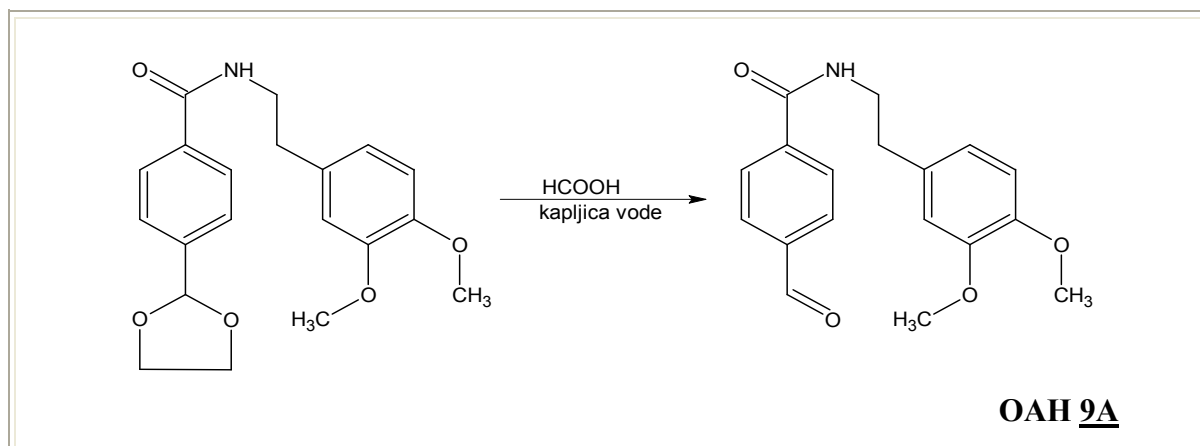
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2,78 (t, 2H, J=14,6 Hz, Ar-CH₂), 3,46 (m, 2H, CH₂), 3,71 (2s, 6H, CH₃), 4,01 (m, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 5,77 (s, 1H, CH), 6,79 (m, 3H, Ar-H), 7,50-7,86 (AA'BB', J= 4H, 8,2 Hz, Δv = 100 Hz, Ar-H), 8,55 (s, 1H, CO-NH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 358 (MH⁺, 100)

IR (KBr): ν 3321, 2932, 2367, 1636, 1516, 1237, 1142, 1078, 1024, 847, 806, 765, 468 cm⁻¹.

Tališče: 138-141 °C

4.10. Sinteza *N*-(3,4-dimetoksifenetil)-4-formilbenzamida (OAH 9A)



V bučko smo natehtali 1,79 g (5,00 mmol) *N*-(3,4-dimetoksifenetil)-4-(1,3-dioksolan-2-il)benzamida, ki smo mu dodali 15 mL metanojske kisline in kapljico vode. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi čez noč. Potem smo metanojsko kislino odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo naalkalili z NaHCO₃ do pH=8. Vodno fazo smo ekstrahirali z štirikrat po 25 mL diklorometana. Združene organske faze smo nato pol ure sušili z Na₂SO₄ ter topilo pod znižanim tlakom uparili do suhega. Dobili smo trden oranžnorjav produkt, ki smo ga čistili s kolonsko kromatografijo (silikagel; MF=etilacetat:heksan=1:1). Dobili smo 1,01 g (3,22 mmol) trdnega belega produkta.

Izkoristek: 64 %

Elementna sestava: C₁₈H₁₉NO₄

M= 313,348 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2,78 (q, 2H, J=7,6 Hz, Ar-CH₂), 3,49 (m, 2H, CH₂-CH₂), 3,72 (m, 6H, 2xCH₃), 6,80 (m, 3H, Ar-H), 7,97-8,03 (AA'BB', 4H, J= 3,2 Hz, Δv = 14,5 Hz, Ar-H), 8,73 (s, 1H, CO-NH), 10,1 (s, 1H, CHO) ppm.

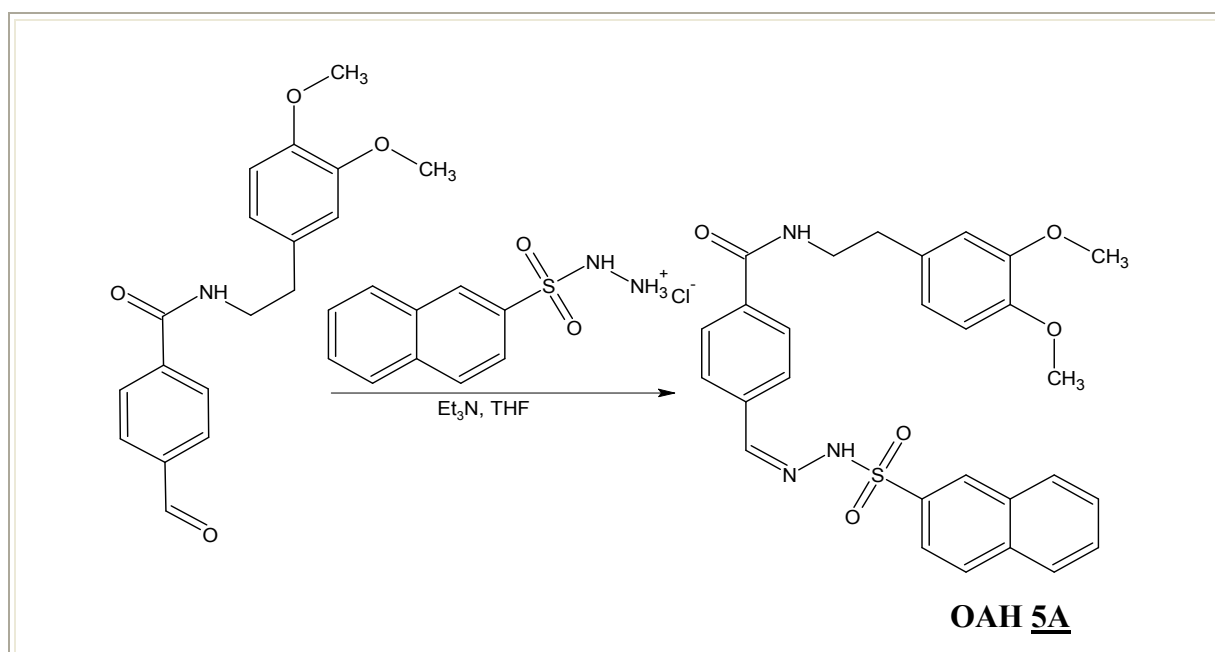
MS (EI): m/z (%): 313 (M⁺, 100)

IR (KBr): ν 3374, 2932, 2835, 1701, 1655, 1516, 1459, 1386, 1264, 1234, 1140, 1026, 760, 628 cm⁻¹.

Tališče: 160-163 °C

Elementna analiza: Izračunano za C₁₈H₁₉NO₄ x 1/3 H₂O (313,348 g/mol): 67,70% C, 6,21% H, 4,39% N. **Izmerjeno:** 67,91% C, 6,24% H, 4,30% N.

4.11. Sinteza *N*-(3,4-dimetoksifenetil)-4-((2-(2-naftilsulfonil)hidrazono)metil)benzamida (OAH 5A)



V suho bučko smo natehtali 510 mg (1,83 mmol) *N*-(3,4-dimetoksifenetil)-4-formilbenzamida in dodali 520 mg (2,01 mmol) soli naftalen-2-sulfonohidrazida ter oba reagenta raztopili v 15 mL tetrahidrofurana. Zatem smo zmesi dodali še 0,5 mL brezvodnega trietilamina, bučko opremili z vodnim povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter reakcijsko zmes pri temperaturi vrenja segrevali čez noč. Ko smo pod znižanim tlako odparili

topilo smo dobili oljnat svetlo rjav produkt, ki smo ga čistili s kolonsko kromatografijo (silikagel; MF=etilacetat:heksan=1:1) in dobili 400 mg (0,78 mmol) belega trdnega produkta.

Izkoristek: 43 %

Elementna sestava: C₂₈H₂₇N₃O₅S

M= 517,597 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2,75 (m, 2H, Ar-CH₂), 3,44 (m, 2H, CH₂), 3,71 (2s, 6H, CH₃), 6,78 (m, 3H, Ar-H), 7,40-8,04 (AA'BB', 4H, J= 6,5 Hz, Δv = 86,3 Hz, Ar-H), 7,72 (m, 5H, Ar-H), 8,06 (s, 1H, CH=N), 8,29 (m, 2H, Ar-H), 8,42 (s, 1H, CO-NH), 8,49 (s, 1H, =N-NH-SO₂) ppm.

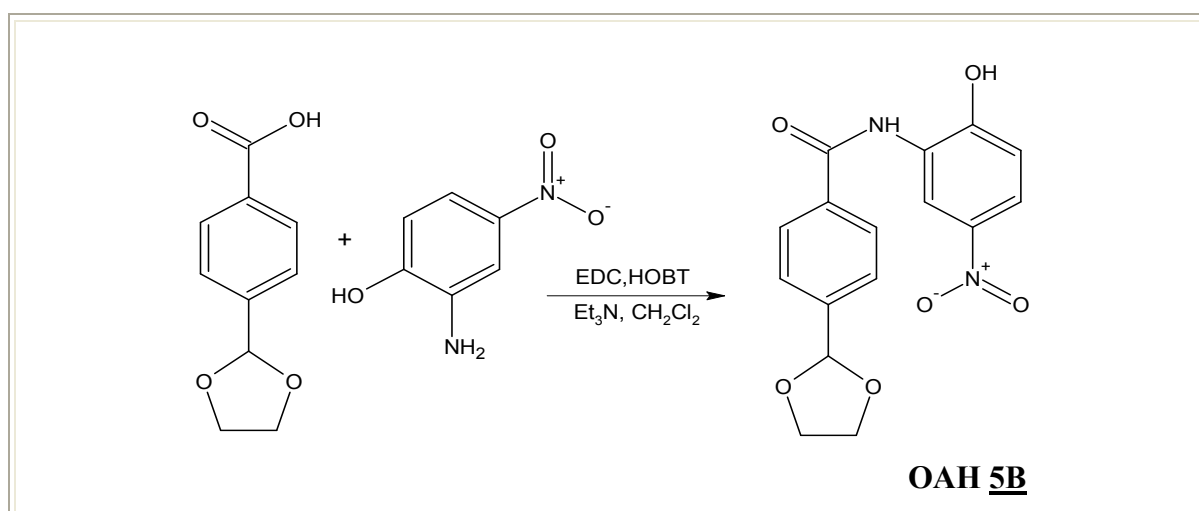
MS (EI): m/z (%): 517 (M⁺ 100)

IR (KBr): ν 3306, 2934, 1635, 1590, 1516, 1544, 11453, 1419, 1317, 1261, 1235, 1141, 1027, 965, 814, 747, 533, 476 cm⁻¹.

Tališče: 102-107 °C

Elementna analiza: Izračunano za C₂₈H₂₇N₃O₅S (517,597 g/mol): 64,97% C, 5,26% H, 8,12% N; **Izmerjeno:** 65,15% C, 5,09% H, 8,22% N.

4.12. Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)-N-(2-hidroksi-5-nitrofenil)benzamida (OAH 5B)



V suho bučko, ki jo postavimo na ledeno kopel (0-5 °C), smo natehtali 1 g (5,15 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)benzojske kisline in jo nato raztopili v 25 mL diklorometana, dodali 990 mg (5,15 mmol) EDC, 700 mg (5,15 mmol) HOBT in 2 mL brezvodnega

trietilamina. Zmes smo nato na ledeni kopeli mešali še 1 uro. Nastala je svetlo rumena raztopina, ki smo ji dodali 1,00 g (6,50 mmol) 2-amino-4-nitrofenola. Reakcijsko zmes smo nato 24 ur mešali pri sobni temperaturi in jo nato ekstrahirali z dvakrat po 15 mL 10% vodne raztopine citronske kisline, z dvakrat 15 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, s 15 mL prečiščene vode, in s 15 mL nasičene vodne raztopine NaCl v navedenem vrstnem redu. Nato smo organsko fazo sušili pol ure z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 1,66 g (5,02 mmol) rumeno rjave trdne snovi.

Izkoristek: 50 %

Elementna sestava: C₁₆H₁₄N₂O₆

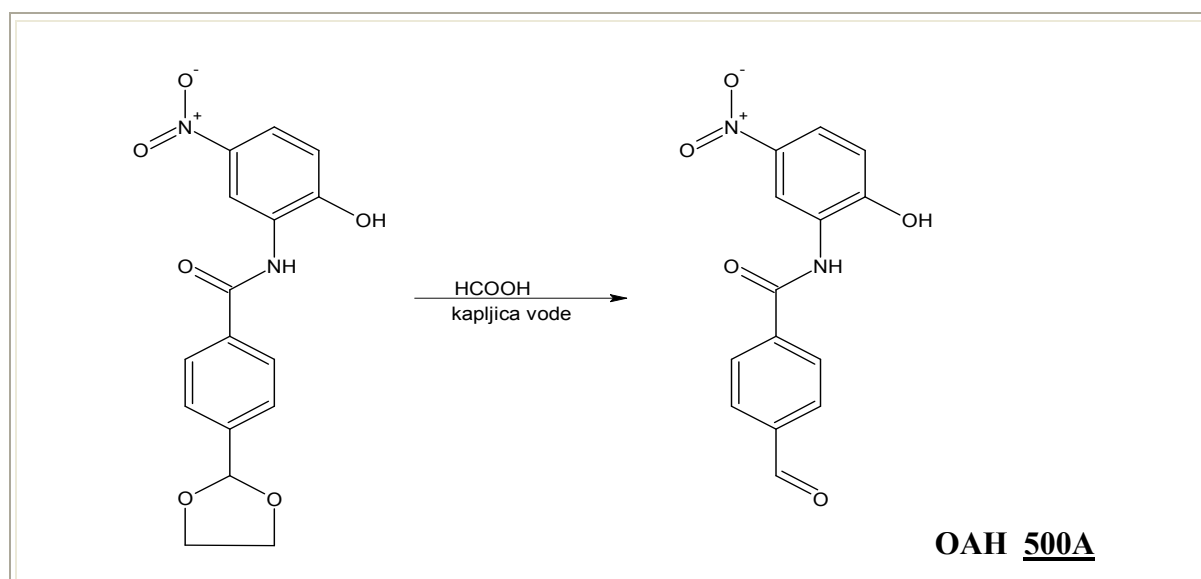
M= 330,292 gmol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 4,04 (m, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 5,36 (s, 1H, Ar-OH), 5,84 (s, 1H, CH), 7,02 (m, 1H, Ar-H), 7,59-8,01 (AA'BB', 4H, J= 8,3 Hz, Δν = 96,5 Hz, Ar-H), 7,97 (m, 1H, Ar-H), 8,79 (m, 1H, Ar-H), 9,66 (s, 1H, CO-NH) ppm.

MS (EI): m/z (%): 331 (MH⁺, 81), 353 (MNa⁺, 62), 369 (MK⁺, 45), 129 (100)

IR (KBr): ν 3431, 2664, 1718, 1617, 1540, 1499, 1396, 1334, 1295, 1222, 1180, 1074, 950, 906, 741, 644 cm⁻¹.

4.13. Sinteza 4-formil-N-(2-hidroksi-5-nitrofenil)benzamida (OAH 500A)



V bučko smo natehtali 1,66 g (5,02 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)-*N*-(2-hidroksi-5-nitrofenil)benzamida, ki smo mu dodali 30 mL metanojske kisline in kapljico vode. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi čez noč. Potem smo metanojsko kislino odparili pod znižanim tlakom, produkt smo produkt naalkalili z NaHCO₃ do pH=8. Izpadla je svetlo rjava oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem ter jo posušili na zraku. Dobili smo 550 mg (1,92 mmol) svetlo rjavega trdnega produkta.

Izkoristek: 38 %

Elementna sestava: C₁₄H₁₀N₂O₅

M= 286,240 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 5,38 (s, 1H, Ar-OH), 7,04 (m, 1H, J=Ar-H), 8,01 (m, 1H, Ar-H), 8,05-8,17 (AA'BB', 4H, J= 2,9 Hz, Δv = 10,0 Hz, Ar-H), 8,76 (m, 1H, Ar-H), 9,87 (s, 1H, CO-NH), 10,1 (s, 1H, CHO) ppm.

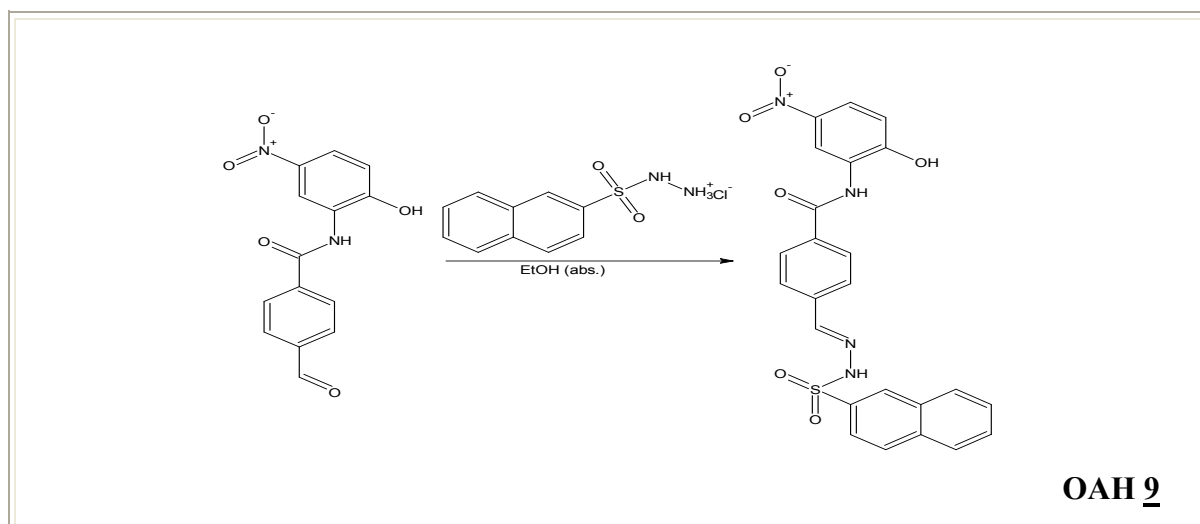
MS (EI): m/z (%): 286 (M⁺, 83), 133 (100)

IR (KBr): ν 3303, 3026, 2875, 1701, 1646, 1495, 1432, 1338, 1288, 1217, 1126, 1074, 1013, 953, 890, 744, 642, 519 cm⁻¹.

Tališče: 230-234 °C

Elementna analiza: Izračunano za C₁₄H₁₀N₂O₅ (286,240 g/mol): 58,74% C, 3,52% H, 9,79% N. **Izmerjeno:** 58,92% C, 3,66% H, 9,54% N.

4.14. Sinteza *N*-(2-hidroksi-5-nitrofenil)-4-((2-(2-naftilsulfonyl)hidrazono)metil)benzamida (OAH 9)



V suho bučko smo natehtali 240 mg (0,85 mmol) 4-formil-*N*-(2-hidroksi-5-nitrofenil)benzamida in dodali 240 mg (0,93 mmol) soli naftalen-2-sulfonhidrazida ter oba reagenta suspendirali v 12,5 mL absolutnega etanola. Nato smo bučko opremili z vodnim povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter reakcijsko zmes pri temperaturi vrenja segrevali čez noč. Nastalo belo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in jo posušili na zraku. Dobili smo 270 mg (0,55 mmol) belega trdnega produkta.

Izkoristek: 65 %

Elementna sestava: C₂₄H₁₈N₄O₆S

M= 490,489 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 5,35 (s, 1H, Ar-OH), 7,08 (m, 1H, Ar-H), 7,71 (m, 1H, Ar-H), 7,68-8,01 (AA'BB', 4H, J= 8,2 Hz, Δv = 58,6 Hz, Ar-H), 7,89-8,25 (m, 6H, Ar-H), 8,49 (m, 1H, Ar-H), 8,60 (m, 1H, Ar-H), 8,73 (s, 1H, CH=N), 9,66 (s, 1H, CO-NH), 11,7 (s, 1H, =N-NH-SO₂) ppm.

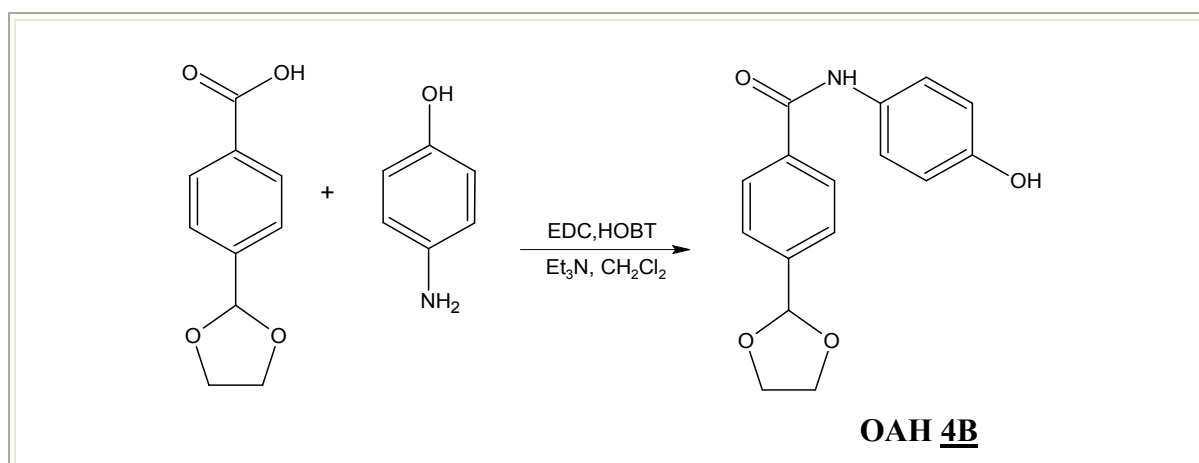
MS (ESI): m/z (%): 491 (MH⁺, 50), 141 (100)

IR (KBr): ν 3512, 3426, 3060, 1597, 1533, 1344, 1271, 1235, 1189, 1106, 1051, 972, 899, 824, 739, 686 cm⁻¹.

Tališče: 238-240 °C

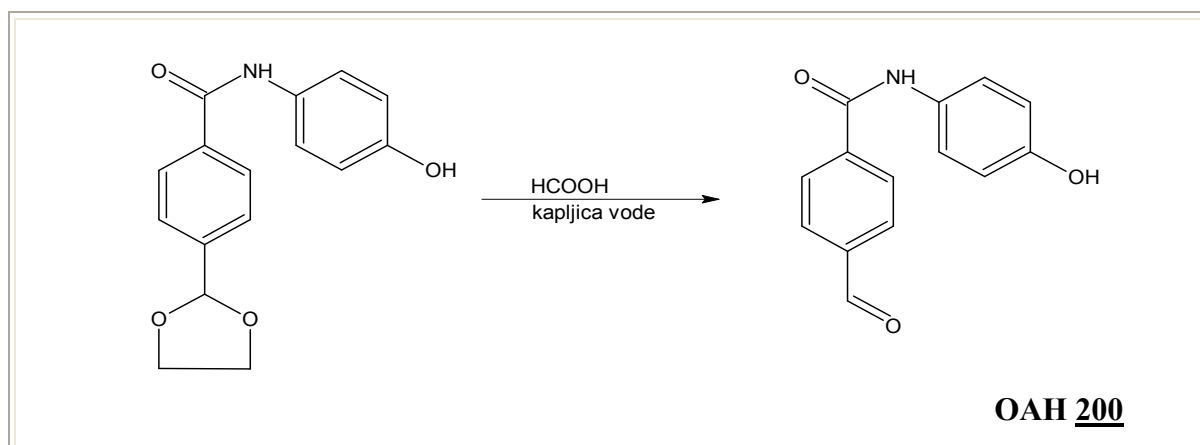
Elementna analiza: Izračunano za C₂₄H₁₈N₄O₆S (490,489 g/mol): 58,77% C, 3,70% H, 11,42% N. **Izmerjeno:** 58,78% C, 3,82% H, 11,50% N.

4.15. Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)-*N*-(4-hidroksifenil)benzamida (OAH 4B)



V suho bučko, ki jo postavimo na ledeno kopel (0-5 °C), smo natehtali 1 g (5,15 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)benzojske kisline in jo nato raztopili v 25 mL diklorometana, dodali 990 mg (5,15mmol) EDC, 700 mg (5,15 mmol) HOBT in 2 mL brezvodnega trietilamina. Zmes smo nato na ledeni kopeli mešali še 1 uro. Nastala je svetlo rumena raztopina, ki smo ji dodali 1,71 g (6,50 mmol) 4-aminofenola. Reakcijsko zmes smo nato 24 ur mešali pri sobni temperaturi in jo nato ekstrahirali z dvakrat po 15 mL 10% vodne raztopine citronske kisline, z dvakrat 15 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, s 15 mL prečiščene vode, in s 15 mL nasičene vodne raztopine NaCl v navedenem vrstnem redu. Nato smo organsko fazo sušili pol ure z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 1,44 g (5,05mmol) rjavga trdnega produkta. Surovi produkt smo takoj uporabili v naslednji stopnji.

4.16. Sinteza 4-formil-*N*-(4-hidroksifenil)benzamida (OAH 200)



V bučko smo natehtali 1,44 g (5,05 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)-*N*-(4-hidroksifenil)benzamida, ki smo mu dodali 30 mL metanojske kisline in kapljico vode. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi čez noč. Potem smo metanojsko kislino odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo naalkalili z NaHCO₃ do pH=8. Izpadla je svetlo rjava oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem ter jo posušili na zraku. Dobili smo 1,16 g (4,81 mmol) svetlo rjavega trdnega produkta.

Izkoristek: 95 %

Elementna sestava: C₁₄H₁₁NO₃

$M = 241,242 \text{ g mol}^{-1}$

$^1\text{H NMR (300 MHz, DMSO-}d_6\text{): } \delta \text{ 8,02-8,13 (AA'BB', J = 8,2 Hz, } \Delta\nu = 25.8 \text{ Hz, 4H, Ar-H), 6,74-7,56 (AA'BB', 4H, J = 8.8 Hz, } \Delta\nu = 236 \text{ Hz, Ar-H), 8,33 (s, 1H, Ar-OH), 10,1 (s, 1H, CO-NH), 10,3 (s, 1H, CHO) \text{ ppm.}$

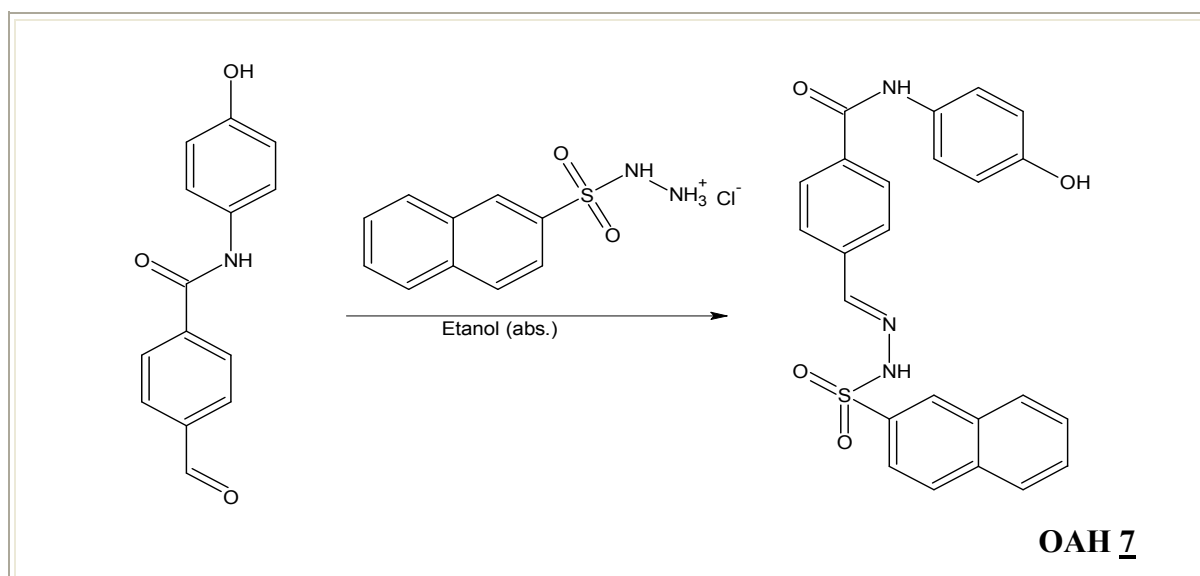
MS (ESI): m/z (%): 242 (MH^+ , 40), 228 (100)

IR (KBr): ν 3379, 3267, 2828, 1688, 1645, 1600, 1538, 1442, 1366, 1266, 830, 752, 516 cm^{-1} .

Tališče: 219-222 °C

HR-MS: Izračunano za $\text{C}_{14}\text{H}_{12}\text{NO}_3$: 242,0807. Izmerjeno: 242,0817.

4.17. Sinteza *N*-(4-hidroksifenil)-4-((2-(2-naftilsulfonyl)hidrazono)metil)benzamida (OAH 7)



V suho bučko smo natehtali 260 mg (1,09 mmol) 4-formil-*N*-(4-hidroksifenil)benzamida in dodali 310 mg (1,20 mmol) soli naftalen-2-sulfonylhidrazida ter oba reagenta suspendirali v 15 mL absolutnega etanola. Nato smo bučko opremili z vodnim povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter reakcijsko zmes pri temperaturi vrenja segrevali čez noč. Nastalo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in jo posušili na zraku. Dobili smo 440 mg (0,99 mmol) svetlo rjavega trdnega produkta.

Izkoristek: 91 %

Elementna sestava: C₂₄H₁₉N₃O₄S

M= 445,491 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7,52 (m, 4H, Ar-H), 7,69 (m, 4H, Ar-H), 7,92 (m, 5H, Ar-H), 8,18 (s, 1H, Ar-H), 8,23 (s, 1H, Ar-OH), 8,59 (s, 1H, CH=N), 9,24 (s, 1H, Ar-H), 10,01 (s, 1H, CO-NH), 11,79 (s, 1H, =N-NH-SO₂) ppm.

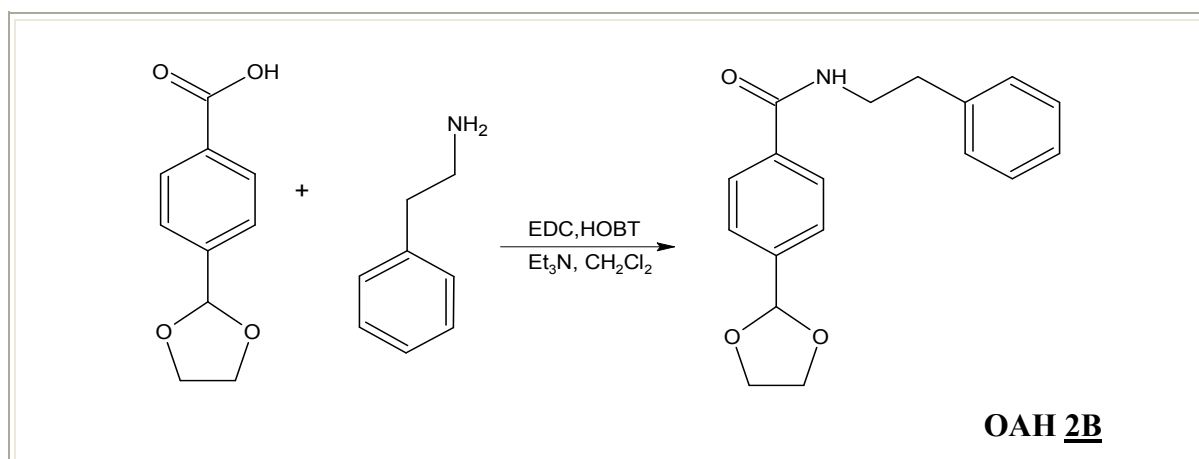
MS (ESI): m/z (%): 446 (MH⁺,64), 118 (100)

IR (KBr): ν 3327, 3202, 1639, 1511, 1437, 1236, 1234, 1162, 1067, 827, 676, 549 cm⁻¹.

Tališče: 226-229 °C

Elementna analiza: Izračunano za C₂₄H₁₉N₃O₄S (445,495 g/mol): 64,71% C, 4,30% H, 9,43% N, **Izmerjeno:** 64,76% C, 4,21% H, 9,38% N.

4.18. Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)-*N*-fenetilbenzamida (OAH 2B)



V suho bučko, ki jo postavimo na ledeno kopel (0-5 °C) smo natehtali 1 g (5,15 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)benzojske kisline in jo nato raztopili v 25 mL diklorometana, dodali 990 mg (5,15 mmol) EDC, 700 mg (5,15 mmol) HOBT in 2 mL brezvodnega trietilamina. Zmes smo nato na ledeni kopeli mešali še 1 uro. Nastala je svetlo rumena raztopina, ki smo ji dodali 790 mg (6,50 mmol) 2-fenil-1-etanamina. Reakcijsko zmes smo nato 24 ur mešali pri sobni temperaturi in jo nato ekstrahirali z dvakrat po 15 mL 10% vodne raztopine citronske kisline, z dvakrat 15 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, s 15 mL prečiščene vode, in s 15 mL nasičene vodne raztopine NaCl v navedenem vrstnem redu. Nato smo organsko fazo sušili pol ure z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 930 mg (3,12 mmol) svetlo rjavega trdnega produkta.

Izkoristek: 61 %

Elementna sestava: C₁₈H₁₉NO₃

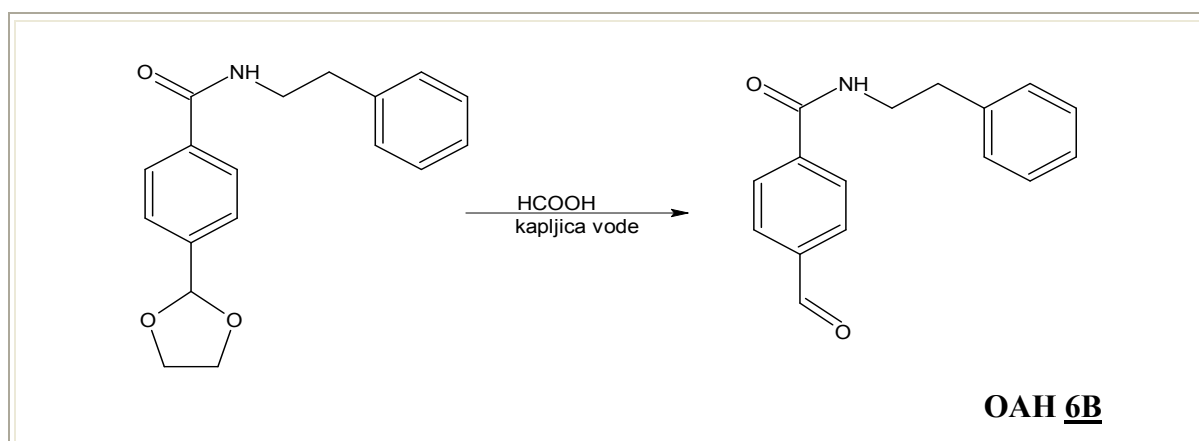
M= 297,348 gmol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): 2,85 (t, 2H, J=14,8 Hz, CH₂-Ar), 3,48 (m, 2H, NH-CH₂), 4,01 (m, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 5,78 (s, 1H, CH), 7,18-7,33 (m, 5H, Ar-H), 7,49–7,85 (AA'BB', 4H, J= 8,2 Hz, Δv = 98,9 Hz, Ar-H), 8,59 (s, 1H, CO-NH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 298 (MH⁺,100)

IR (KBr): ν 3271, 2905, 1637, 1544, 1452, 1220, 1154, 1087, 846, 697, 508 cm⁻¹.

4.19. Sinteza 4-formil-N-fenetilbenzamida (OAH 6B)



V bučko smo natehtali 930 mg (3,12 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)-N-fenetilbenzamida, ki smo mu dodali 30 mL metanojske kisline in kapljico vode. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi čez noč. Potem smo metanojsko kislino odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo naalkalili z NaHCO₃ do pH=8. Izpadla je svetlo rjava oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem ter jo posušili na zraku. Dobili smo 630 mg (2,50 mmol) svetlo rjavega trdnega produkta.

Izkoristek: 80 %

Elementna sestava: C₁₆H₁₅NO₂

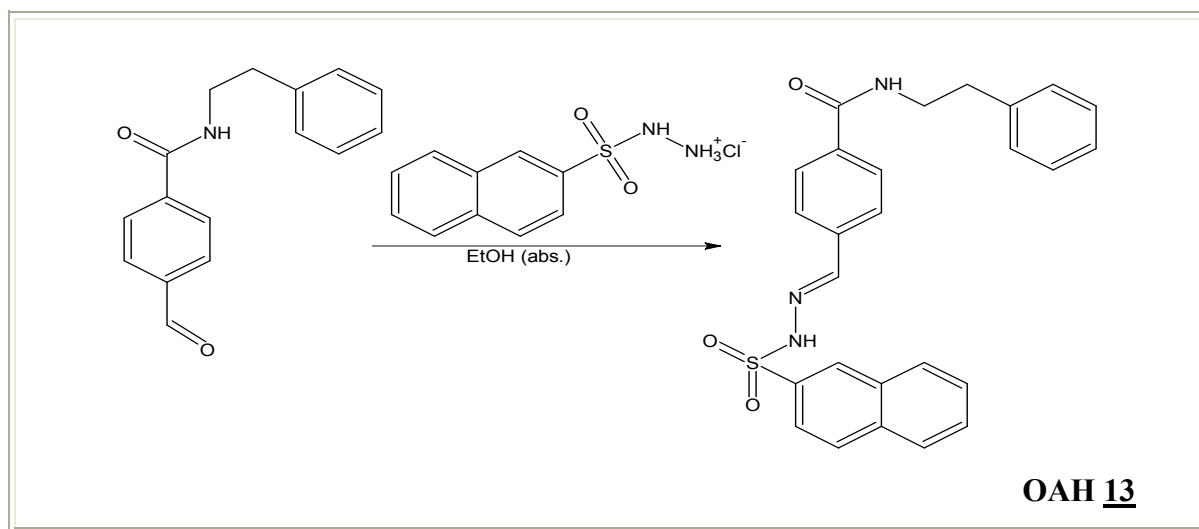
M= 253,296 gmol⁻¹

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2,86 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 3,50 (m, 2H, NH-CH_2), 7,20-7,33 (m, 5H, Ar-H), 7,99 (s, 4H, Ar-H), 8,77 (s, 1H, CO-NH), 10,1 (s, 1H, CHO) ppm.

MS (EI): m/z (%): 253 (M^+ , 60), 104 (100)

IR (KBr): ν 3323, 3027, 1703, 1637, 1541, 1454, 1207, 847, 748, 700, 494 cm^{-1} .

4.20. Sinteza 4-((2-(2-naftilsulfonyl)hidrazono)metil)-*N*-fenetilbenzamida (OAH 13)



V suho bučko smo natehtali 360 mg (1,43 mmol) 4-formil-*N*-fenetilbenzamida in dodali 410 mg (1,58 mmol) soli naftalen-2-sulfonylhidrazida ter oba reagenta suspendirali v 20 mL absolutnega etanola. Nato smo bučko opremili z vodnim povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter reakcijsko zmes pri temperaturi vrenja segrevali čez noč. Nastalo belo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in jo posušili na zraku. Dobili smo 560 mg (1,22 mmol) belega trdnega produkta.

Izkoristek: 85 %

Elementna sestava: $\text{C}_{26}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$

M = 457,545 g mol^{-1}

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 2,83 (t, 2H, $J = 14,8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-Ar}$), 3,45 (m, 2H, NH-CH_2), 7,16-7,31 (m, 5H, Ar-H), 7,70 (m, 2H, Ar-H), 7,61 – 7,81 (AA'BB', 4H, $J = 8,4$ Hz, $\Delta\nu = 51,7$ Hz, Ar-H), 7,90 (s, 1H, Ar-H), 7,97 (s, 1H, Ar-H), 8,04 (s, 1H, Ar-H), 7,52 (m, 4H, Ar-H), 7,69 (m, 4H, Ar-H), 7,92 (m, 5H, Ar-H), 8,18 (s, 1H, Ar-H), 8,23 (s, 1H, Ar-OH),

8,14 (s, 1H, $\text{CH}=\text{N}$), 8,22 (s, 1H, CO-NH), 8,57 (m, 2H, Ar-H), 11,7 (s, 1H, $=\text{N-NH-SO}_2$) ppm.

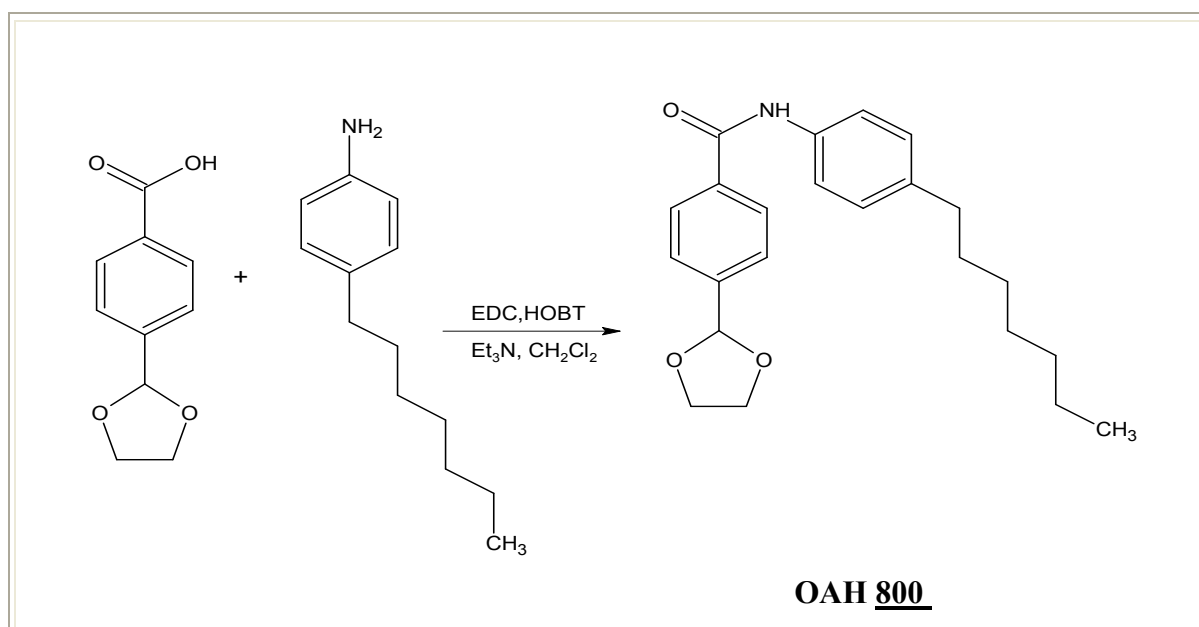
MS (ESI): m/z (%): 458 (MH^+ , 100)

IR (KBr): ν 3485, 3310, 2931, 2344, 1714, 1635, 1541, 1499, 1269, 1190, 1103, 855, 828, 695 cm^{-1} .

Tališče: 197-201 °C

HR-MS: Izračunano za $\text{C}_{26}\text{H}_{24}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}$: 458,1530; **Izmerjeno:** 458,1538.

4.21. Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)-N-(4-heptilfenil)benzamida (OAH 800)



V suho bučko, ki jo postavimo na ledeno kopel (0-5 °C) smo natehtali 1 g (5,15 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)benzojske kisline in jo nato raztopili v 25 mL diklorometana, dodali 990 mg (5,15 mmol) EDC, 700 mg (5,15 mmol) HOBT in 2 mL brezvodnega trietilamina. Zmes smo nato na ledeni kopeli mešali še 1 uro. Nastala je svetlo rumena raztopina, ki smo ji dodali 1,24 g (6,50 mmol) 4-heptilanilina. Reakcijsko zmes smo nato 24 ur mešali pri sobni temperaturi in jo nato ekstrahirali z dvakrat po 15 mL 10% vodne raztopine citronske kisline, z dvakrat 15 mL nasičene vodne raztopine NaHCO_3 , s 15 mL prečiščene vode, in s 15 mL nasičene vodne raztopine NaCl v navedenem vrstnem redu. Nato smo organsko fazo sušili pol ure z Na_2SO_4 in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 980 mg (2,68 mmol) belega trdnega produkta.

Izkoristek: 52 %

Elementna sestava: C₂₃H₂₉NO₃

M= 367,481 g mol⁻¹

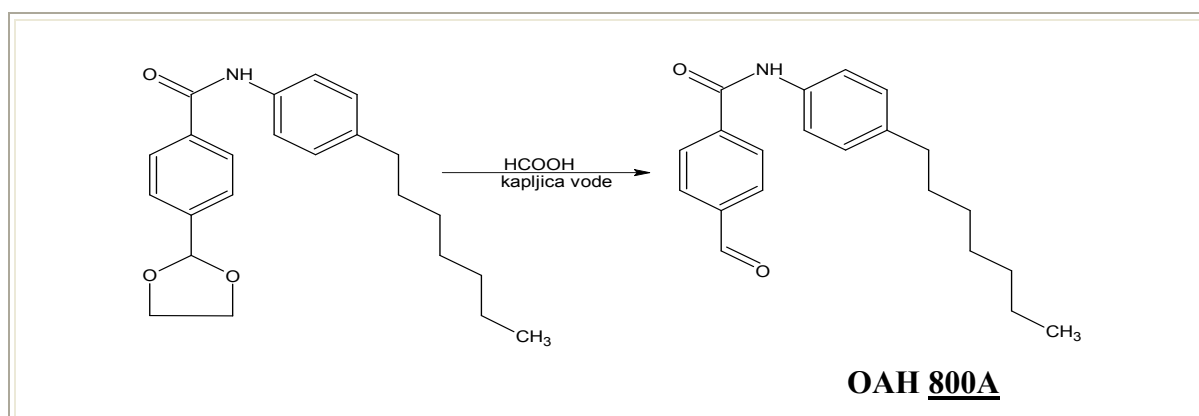
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 0,85 (q, 3H, J=2,18 Hz, CH₂-CH₃), 1,26 (s, 8H, CH₂), 1,57 (d, 2H, J=6,36 Ar-CH₂-CH₂), 2,63 (s, 2H, Ar-CH₂), 4,03 (m, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 5,82 (s, 1H, CH), 7,16 (d, 2H, Ar-H), 7,56 – 7,99 (AA'BB', 4H, J= 3,2 Hz, Δv = 123,6 Hz, Ar-H), 7,67 (m, 2H, Ar-H) 10,2 (s, 1H, CO-NH) ppm.

MS (EI): m/z (%): 367 (M⁺,67), 177 (100)

IR (KBr): ν 3318, 2924, 1724, 1648, 1528, 1412, 1268, 1082, 1017, 944, 822, 762, 657, 582, 523 cm⁻¹.

Tališče: 120-125 °C

4.22. Sinteza 4-formil-N-(4-heptilfenil)benzamida (OAH 800A)



V bučko smo natehtali 980 mg (2,68 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)-N-(4-heptilfenil)benzamida, ki smo mu dodali 30 mL metanojske kisline in kapljico vode. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi čez noč. Potem smo metanojsko kislino odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo produkt naalkalili z NaHCO₃ do pH=8. Izpadla je svetlo rjava oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem ter jo posušili na zraku. Dobili smo 760 mg (2,35 mmol) svetlo rjavega trdnega produkta.

Izkoristek: 88 %

Elementna sestava: C₂₁H₂₅NO₂

$M = 323,429 \text{ g mol}^{-1}$

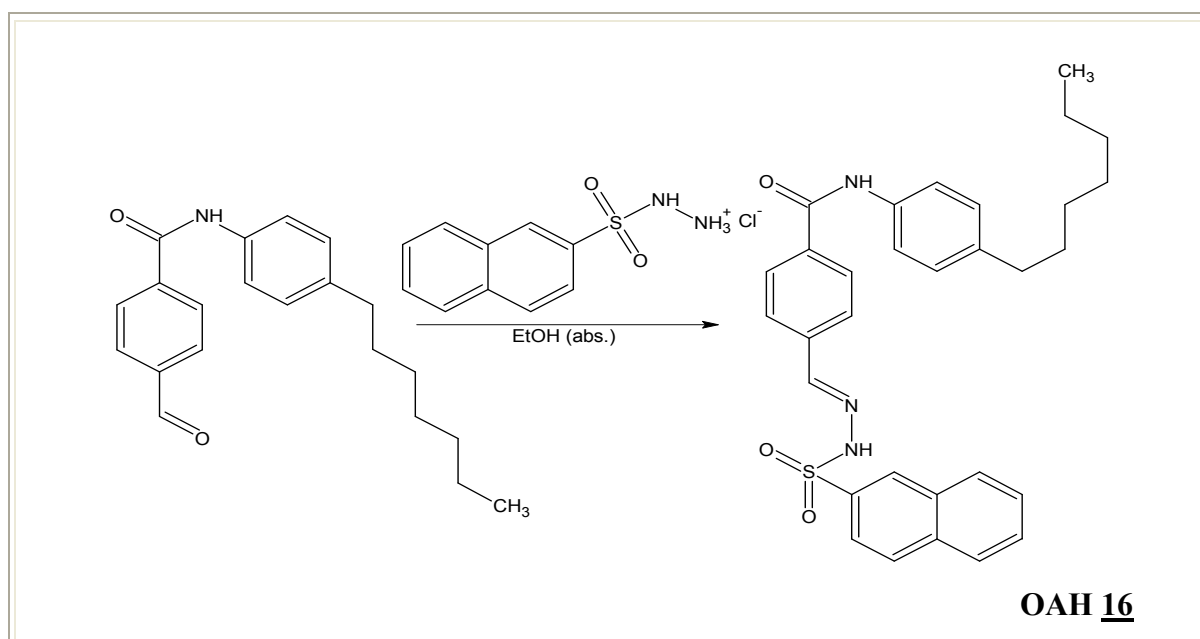
$^1\text{H NMR (300 MHz, DMSO-}d_6\text{)}$: δ 0,86 (q, 3H, $J=4,52 \text{ Hz}$, CH_3), 1,25 (s, 8H, CH_2), 1,54 (d, 2H, $J=5,36 \text{ Hz}$, Ar- $\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 2,60 (s, 2H, Ar- CH_2), 7,16 – 7,68 (AA'BB', 4H, $J= 8,4 \text{ Hz}$, $\Delta\nu = 24,4$, Ar-H), 8,03 – 8,14 (AA'BB', 4H, $J= 8,1 \text{ Hz}$, $\Delta\nu = 25,9 \text{ Hz}$, Ar-H), 10,11 (s, 1H, CO-NH), 10,45 (s, 1H, CHO) ppm.

MS (EI): m/z (%): 323 (M^+ 100)

IR (KBr): ν 3341, 2920, 1648, 1525, 1410, 1356, 1207, 1116, 1015, 836, 766, 649 cm^{-1} .

Tališče: 132-136 $^\circ\text{C}$

4.23. Sinteza N-(4-heptilfenil)-4-((2-(2-naftilsulfonyl)hidrazono)metil)benzamida (OAH 16)



V suho bučko smo natehtali 390 mg (1,19 mmol) 4-formil-*N*-(4-heptilfenil)benzamida in dodali 340 mg (1,31 mmol) soli naftalen-2-sulfonohidrazida ter oba reagenti suspendirali v 20 mL absolutnega etanola. Nato smo bučko opremili z vodnim povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter reakcijsko zmes pri temperaturi vrenja segrevali čez noč. Nastalo belo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in jo posušili na zraku. Dobili smo 70 mg (0,13 mmol) belega trdnega produkta.

Izkoristek: 11 %

Elementna sestava: C₃₁H₃₃N₃O₃S

M= 527,678 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): Vzorca nismo mogli raztopiti ne v DMSO ne v CDCl₃.

MS (EI): m/z (%): 528 (MH⁺,100)

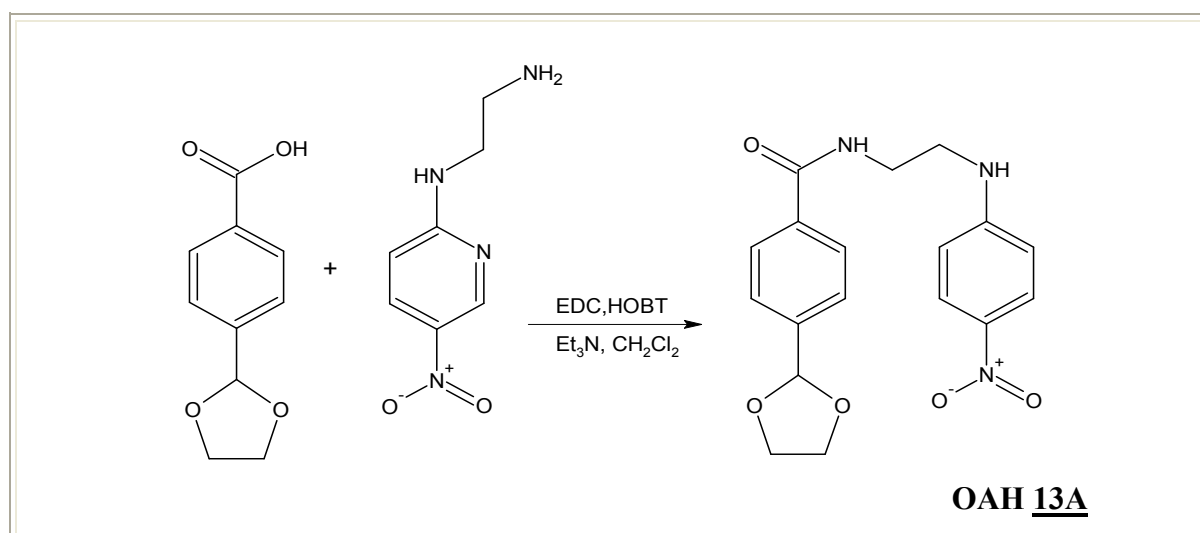
IR (KBr): ν 3340, 2922, 2345, 1648, 1532, 1410, 1324, 1268, 1126, 947, 810, 649 cm⁻¹.

Tališče: 299-301 °C

Elementna analiza: Izračunano za C₃₁H₃₃N₃O₃S (527,678 g/mol): 70,56% C, 6,30% H, 7,96% N, **Izmerjeno:** 70,44% C, 6,22% H, 8,06% N.

4.24. Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)-N-(2-((5-nitro-2-piridinil)amino)etil)benzamida

(OAH 13A)



V suho bučko, ki jo postavimo na ledeno kopel (0-5 °C), smo natehtali 1 g (5,15 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)benzojske kisline in jo nato raztopili v 25 mL diklorometana, dodali 990 mg (5,15 mmol) EDC, 700 mg (5,15 mmol) HOBT in 2 mL brezvodnega trietilamina. Zmes smo nato na ledeni kopeli mešali še 1 uro. Nastala je svetlo rumena raztopina, ki smo ji dodali 1,18 g (6,50 mmol) *N*-(2-aminoetil)-*N*-(5-nitro-2-piridinil)amina. Reakcijsko zmes smo nato 24 ur mešali pri sobni temperaturi in jo nato ekstrahirali z dvakrat po 15 mL 10% vodne raztopine citronske kisline, z dvakrat 15 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, s 15 mL prečiščene vode, in s 15 mL nasičene vodne raztopine NaCl v navedenem vrstnem redu. Nato smo organsko fazo sušili pol ure z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 1,45 g (4,05 mmol) rumeno rjavega trdnega produkta.

Izkoristek: 79%

Elementna sestava: C₁₇H₁₈N₄O₅

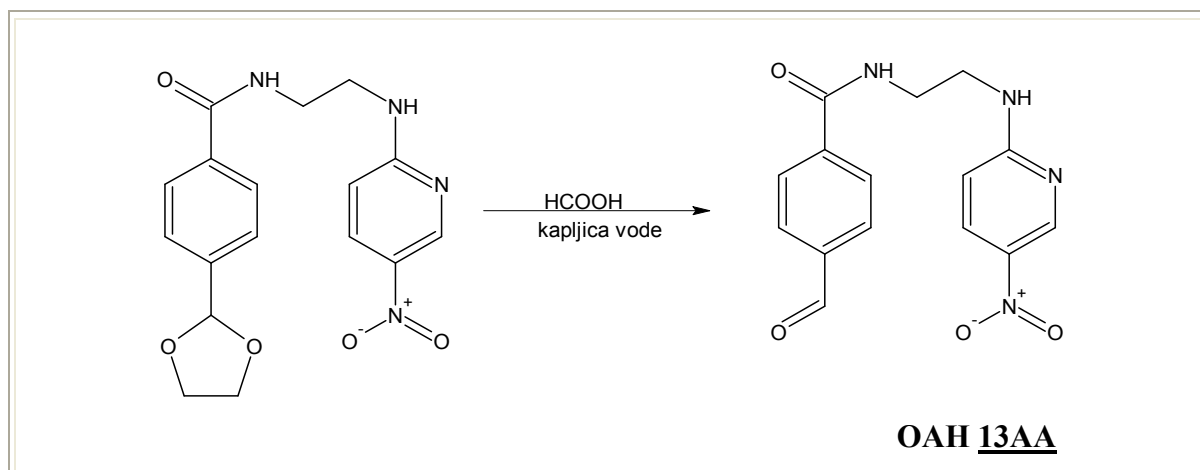
M= 358,349 gmol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1,56 (t, 2H, J=13,8 Hz, CH₂), 2,56 (t, 2H, J=7,54 Hz, CH₂), 4,03 (m, 5H, O-CH₂-CH₂-O, CH₂-NH-Ar), 5,82 (s, 1H, CH), 6,47 (m, 1H, Ar-H), 6,82 (m, 1H, Ar-H), 7,56 – 7,98 (AA'BB', 4H, J= 8,2 Hz, Δv = 109,9 Hz, Ar-H), 7,67 (m, 1H, Ar-H), 10,2 (s, 1H, CO-NH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 359 (MH⁺,39), 105 (100)

IR (KBr): ν3458, 1636, 1340, 1295, 1117, 536 cm⁻¹.

4.25. Sinteza 4-formil-N-(2-((5-nitro-2-piridinil)amino)etil)benzamida (OAH 13AA)



V bučko smo natehtali 1,45 g (4,05 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)-N-(2-((5-nitro-2-piridinil)amino)etil)benzamida, ki smo mu dodali 30 mL metanojske kisline in kapljico vode. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi čez noč. Potem smo metanojsko kislino odparili pod znižanim tlakom in produkt naalkalili z NaHCO₃ do pH=8. Izpada je oranžna oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem ter jo posušili na zraku. Dobili smo 230 mg (0,73 mmol) oranžnega trdnega produkta.

Izkoristek: 18 %

Elementna sestava: C₁₅H₁₄N₄O₄

M= 314,296 gmol⁻¹

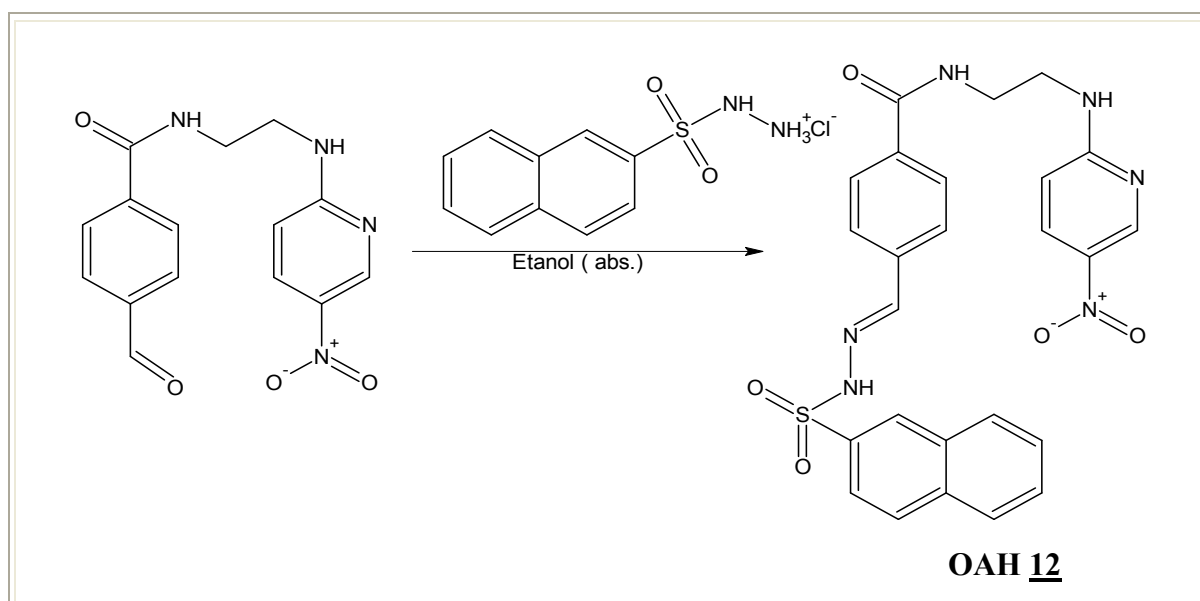
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 3,47 (t, 2H, $J=6,75$ Hz, CH_2), 3,50 (t, 2H, $J=4,81$ Hz, CH_2), 3,60 (s, 1H, $\text{CH}_2\text{-NH-Ar}$), 6,60 (m, 1H, Ar-H), 7,97 – 8,05 (AA'BB', 4H, $J=8,5$ Hz, $\Delta\nu = 14,6$ Hz, Ar-H), 8,09 (m, 1H, Ar-H), 8,12 (m, 1H, Ar-H), 8,32 (s, 1H, CO-NH), 10,08 (s, 1H, CHO) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 315 (MH^+ , 62), 126 (100)

IR (KBr): ν 3461, 2888, 1612, 1534, 1385, 1323, 1297, 1095, 1015, 948, 825, 164, 724, 627, 542 cm^{-1} .

Tališče: 116-120 $^\circ\text{C}$

4.26. Sinteza 4-((2-(2-naftilsulfonil)hidrazono)metal)-*N*-(2-((5-nitro-2-piridinil)amino)etil)benzamida (OAH 12)



V suho bučko smo natehtali 230 mg (0,72 mmol) 4-formil-*N*-(2-((5-nitro-2-piridinil)amino)etil)benzamida in dodali 210 mg (0,80 mmol) soli naftalen-2-sulfonohidrazida ter oba reagenta suspendirali v 10 mL absolutnega etanola. Nato smo bučko opremili z vodnim povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter reakcijsko zmes pri temperaturi vrenja segrevali čez noč. Nastalo rumeno rjavo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem in jo posušili na zraku. Dobili smo 240 mg (0,46 mmol) rumeno rjavega trdnega produkta.

Izkoristek: 64 %

Elementna sestava: $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$

$M = 518,546 \text{ g mol}^{-1}$

$^1\text{H NMR (300 MHz, DMSO-}d_6\text{)}$: δ 3,27 (t, 2H, $J=8,54 \text{ Hz}$, CH_2), 3,65 (t, 2H, $J=9,39 \text{ Hz}$, CH_2), 3,79 (s, 1H, $\text{CH}_2\text{-NH-Ar}$), 6,60 (d, 1H, Ar-H), 7,65-7,89 (AA'BB', 4H, $J=7,2 \text{ Hz}$, $\Delta\nu = 28,5 \text{ Hz}$, Ar-H), 7,97 (m, 5H, Ar-H), 8,09 (m, 1H, Ar-H), 8,12 (m, 1H, Ar-H), 8,27 (s, 1H, CH=N), 8,55 (m, 2H, Ar-H), 8,90 (s, 1H, CO-NH), 11,75 (s, 1H, $=\text{N-NH-SO}_2$) ppm.

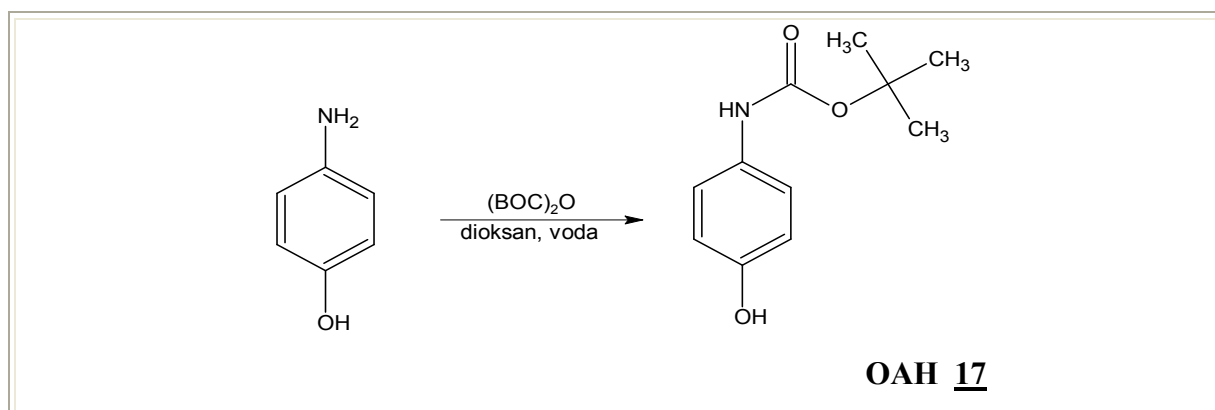
MS (ESI): m/z (%): 519 (MH^+ , 50), 141 (100)

IR (KBr): ν 3440, 3233, 1640, 1603, 1493, 1330, 1287, 1165, 1131, 1061, 964, 860, 816, 749, 642, 550 cm^{-1} .

Tališče: 245-248 °C

Elementna analiza: Izračunano za $\text{C}_{25}\text{H}_{22}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$ (518,546 g/mol) : 57,91% C, 4,28% H, 16,21% N. Izmerjeno: 57,86% C, 4,26% H, 15,97% N.

4.27. Sinteza *tert*-butil-4-hidroksifenilkarbamata (OAH 17)



V bučko smo natehtali 17 g (156 mmol) 4-aminofenola in ga suspendirali v 50 ml vode. V nastalo suspenzijo smo med mešanjem na ledeni kopeli (0-5 °C) po obrokih kapljali raztopino 38,4 g (176 mmol) di-*tert*-butilkarbonata v 50 ml dioksana. Reakcijsko zmes smo 1 uro in pol mešali pri sobni temperaturi. Dioksan smo odparili pod znižanim tlakom. Preostanku v bučki smo dodali približno 100 ml vode in izpadlo oborino odfiltrirali s presesavanjem in posušili na zraku. Dobili smo 32,4 g (146 mmol) trdnega produkta bele barve.

Izkoristek: 94 %

Elementna sestava: $\text{C}_{11}\text{H}_{15}\text{NO}_3$

$M = 209,24 \text{ g mol}^{-1}$

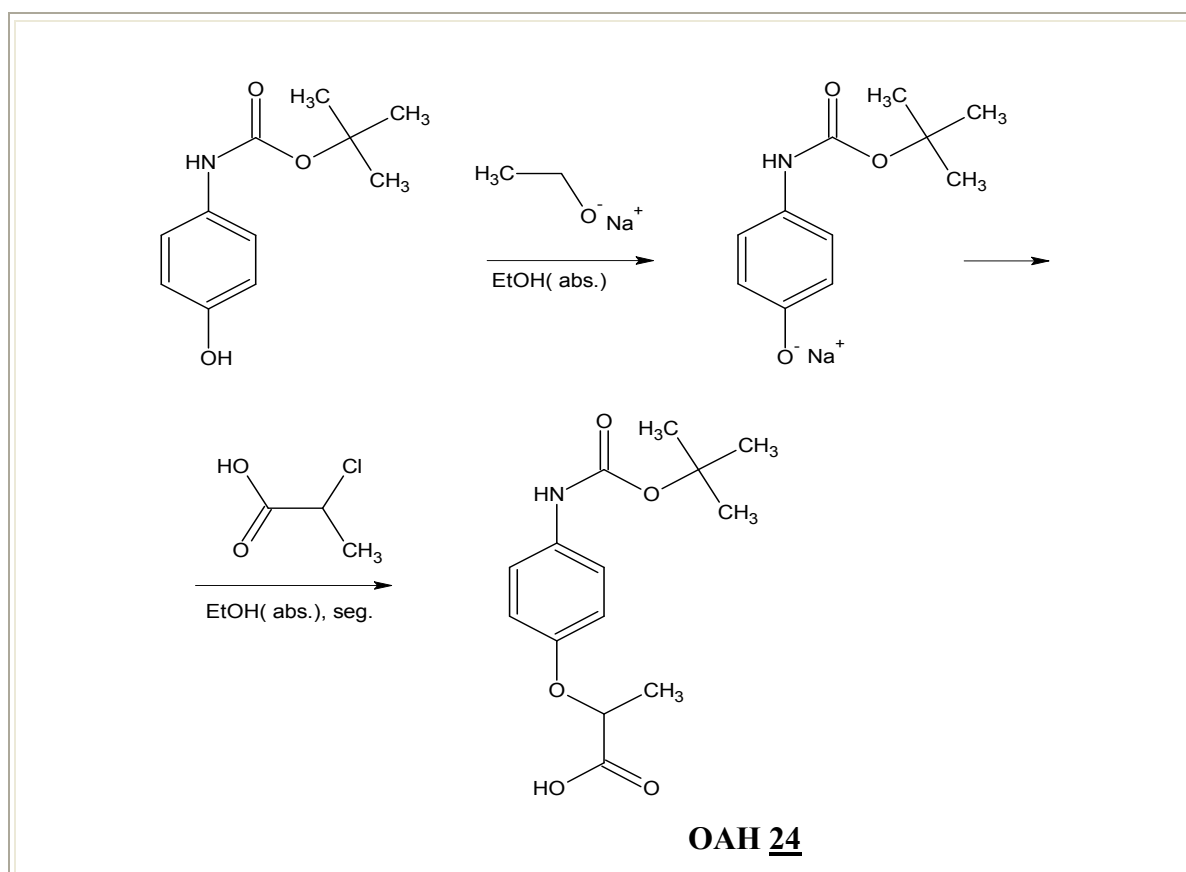
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1,49 (s, 9H, C-(CH_3) $_3$), 6,63-7,20 (AA'BB', 4H, $J = 8,85$ Hz, $\Delta\nu = 18,6$, Hz, Ar-H), 8,93 (s, 1H, NH-CO), 9,00 (s, 1H, -OH) ppm.

MS (EI): m/z (%): 209 (19)

IR (KBr): ν 3359, 2973, 2936, 1884, 1697, 1610, 1531, 1443, 1389, 1371, 1257, 1229, 1162, 1105, 1057, 1030, 1014, 929, 906, 822, 803, 735, 643, 554, 519 cm^{-1} .

Tališče: 143–144 $^\circ\text{C}$

4.28. Sinteza 2-(4-((terc-butoksikarbonil)amino)fenoksi)propanojske kisline (OAH 24)



V suhi bučki opremljeni z vodnim povratnim hladilnikom in zaščiteno pred zunanjo vlago s klorkalcijevo cevko smo pripravili natrijev etilat. V 50 mL brezvodnega etanola smo počasi dodajali na kose narezan natrij, vsega skupaj 1,1 g (47,9 mmol) in počakali, da ves zreagira. V raztopino ohlajenega natrijevega etilata smo dodali 5 g (23,9 mmol) terc-butyl 4-hidroksifenilkarbamata in dobro premešali. Po desetih minutah smo po obrokih dodali 2,86 g (26,3 mmol) klorpropionske kisline in pustili, da se segreva čez noč pri temperaturi vrenja. Po

24 urah smo reakcijsko zmes ohladili in jo prelili z dietiletrom. Izpadlo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, nato pa smo jo še prekrizalizirali iz MeOH. Naš produkt 2-(4-(terc-butoksikarbonilamino)fenoksi)propanojska kislina je bil topen v MeOH, oborjen NaCl pa smo odfiltrirali z odsesavanjem. Matičnico smo odparili pod znižanim tlakom in dobili produkt svetlo rjave barve, ki smo ga prekrizalizirali iz dietiletra in dobili 3,68 g (13,1 mmol, 55 %) trdnega produkta bele barve.

Izkoristek: 55 %

Elementna sestava: C₁₄H₁₉NO₅

M = 281,3 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1,34 (d, 3H, J=6,68 Hz, CH-CH₃), 1,45 (s, 9 H, C-(CH₃)₃), 4,22 (q, 1H, J=6,89 Hz, O-CH-CH₃), 6,69-7,23 (AA'BB', 4H, J= 9,01, Δv =27,1 Hz, Ar-H), 8,99 (s, 1H, NH-CO) ppm.

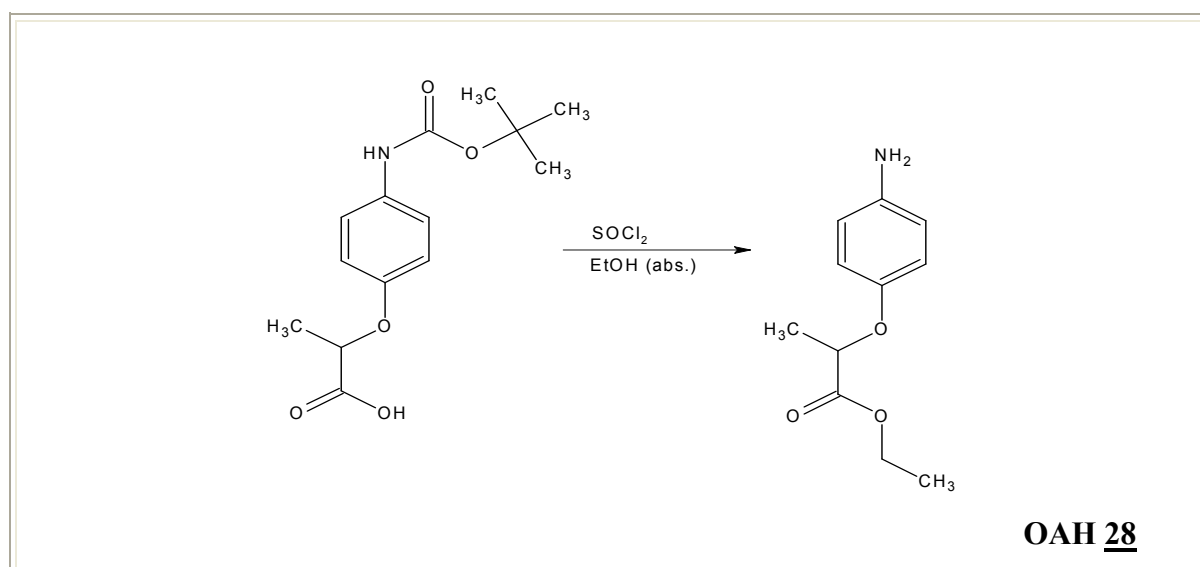
MS (ESI): m/z (%): 304 (M⁺Na⁺, 100)

IR (KBr): ν 3854, 3751, 3433, 2978, 1719, 1618, 1516, 1488, 1406, 1369, 1288, 1215, 1155, 1131, 1086, 934, 870, 834, 777, 634, 523, 462 cm⁻¹.

Elementna analiza: Izračunano za C₁₄H₁₉NO₅ (M = 281,3 g/mol): 59,78 % C, 6,81 % H, 4,98 % N. **Izmerjeno:** 59,83 % C, 6,99 % H, 4,71 % N.

Tališče: nad 300 °C

4.29. Sinteza etil 2-(4-aminofenoksi)propanoata (OAH 28)



V suho bučko smo natehtali 1g (3,56 mmol) 2-(4-((terc-butoksikarbonil)amino)fenoksi)propanojske kisline in dodali 25 mL absolutnega etanola ter jo postavili na ledeno kopel (0-5 °C). Nato smo s pomočjo kapalnika po kapljicah dodali 10 mL tionilklorida. Bučko smo nato opremili z vodnim povratnim hladilnikom in reakcijsko zmes čez noč segrevali na 60°C. Topilo smo nato uparili pod znižanim tlakom ter zmes naalkalili do pH=9. Vodno fazo smo nato ekstrahirali z dvakrat 30 mL etilacetata ter združene organske faze pol ure sušili z Na₂SO₄. Nato smo topilo odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (silikagel; MF=etiacetat:heksan=1:1) in dobili 630 mg (2,99 mmol) trdnega produkta bele barve.

Izkoristek: 84 %

Elementna sestava: C₁₁H₁₅NO₃

M = 209,105 g mol⁻¹

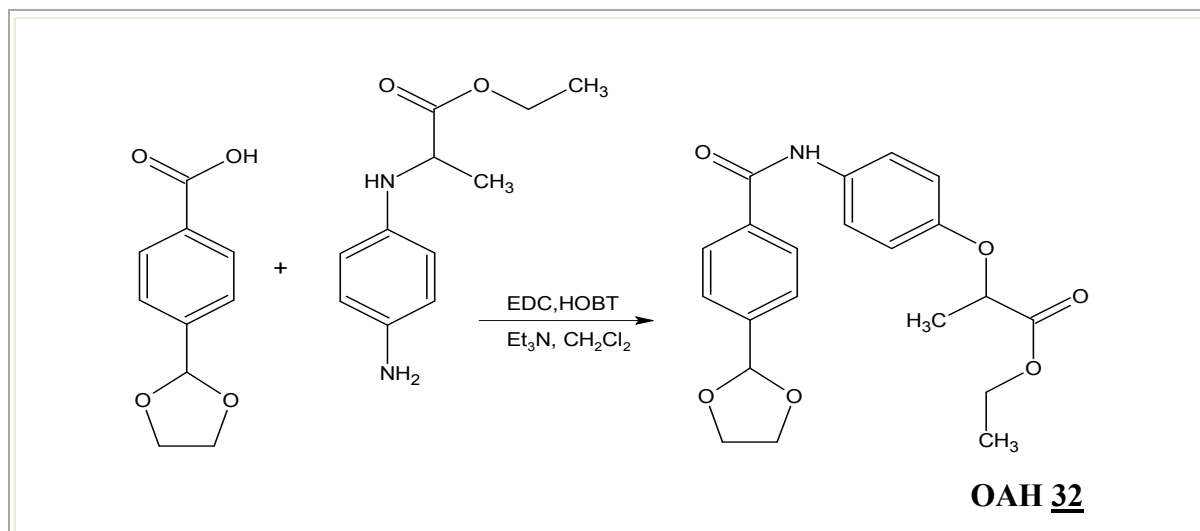
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1,17 (t, 3H, J=14,2 Hz, CH₂-CH₃), 1,43 (d, 3H, J=6,75 Hz, CH(CH₃)), 4,12 (q, 2H, J=7,10 Hz, CH₂-CH₃), 4,65 (q, 1H, J=6,71 Hz, CH(CH₃)), 6,25 (s, 2H, H₂N-Ar), 6,47-6,63 (AA'BB', 4H, J= 8,9 Hz, Δν =39,1 Hz, Ar-H) ppm.

MS (EI): m/z (%): 209 (M⁺, 77), 108 (100)

IR (KBr): ν 3440, 3362, 2984, 2931, 2360, 1744, 1629, 1516, 1446, 1375, 1269, 1215, 1138, 1052, 1018, 946, 824, 746, 557, 519 cm⁻¹.

Elementna analiza: Izračunano za C₁₁H₁₅NO₃ x 1/3 H₂O (209,105 g/mol): 61,38% C, 7,34% H, 6,51% N. **Izmerjeno:** 61,44% C, 7,44% H, 6,57% N.

4.30. Sinteza etil 2-(4-((4-(1,3-dioksolan-2-il)benzoil)amino)fenoksi)propanoata

(OAH 32)

V suho bučko, ki jo postavimo na ledeno kopel (0-5 °C), smo natehtali 2,01 g (10,4 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)benzojske kisline in jo nato raztopili v 50 mL diklorometana, dodali 1,99 g (10,35 mmol) EDC, 1,59 g (11,7 mmol) HOBT in 4 mL brezvodnega trietilamina. Zmes smo nato na ledeni kopeli mešali še 1 uro. Nastala je svetlo rumena raztopina, ki smo ji dodali 2,17 g (10,4 mmol) etil 2-(4-aminofenoksi)propanoata. Reakcijsko zmes smo nato 24 ur mešali pri sobni temperaturi in jo nato ekstrahirali z dvakrat po 20 mL 10% vodne raztopine citronske kisline, z dvakrat 20 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, s 20 mL prečiščene vode, in s 20 mL nasičene vodne raztopine NaCl v navedenem vrstnem redu. Nato smo organsko fazo sušili 2 uri z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 820 mg (2,13 mmol) viskoznega rjavega produkta.

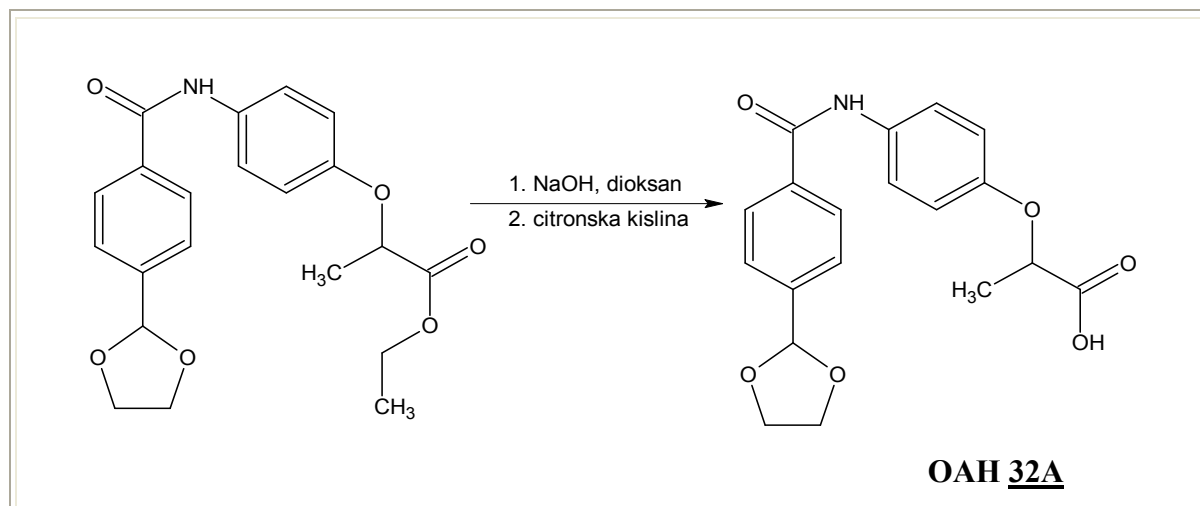
Izkoristek: 21 %**Elementna sestava:** C₂₁H₂₃NO₆**M** = 385,410 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1,18 (m, 3H, CH₂-CH₃), 1,43 (d, 3H, J=17,0 Hz, CH(CH₃)), 4,12 (d, 2H, J=3,50 Hz, CH₂-CH₃), 4,00 (m, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 4,92 (m, 1H, CH(CH₃)), 5,85 (s, 1H, Ar-H), 6,46-6,90 (AA'BB', 4H, J= 2,1 Hz, Δv =6,5, Ar-H), 7,56-7,67 (AA'BB', 4H, J= 8,3 Hz, Δv = 25,2 Hz, Ar-H), 10,17 (s, 1H, CO-NH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 386 (MH⁺, 100)

IR (KBr): ν 3352, 2982, 2885, 2366, 1752, 1719, 1649, 1616, 1577, 1514, 1449, 1412, 1382, 1261, 1241, 1207, 1179, 1118, 1077, 1017, 971, 943, 823, 764, 511 cm^{-1} .

4.31. Sinteza 2-(4-((4-(1,3-dioksolan-2-il)benzoli)amino)fenoksi)propanojske kisline (OAH 32A)



V bučko, smo natehtali 820 mg (2,13 mmol) etil2-(4-((4-(1,3-dioksolan-2-il)benzoli)amino)fenoksi)propanoata in dodali 20 mL 1M NaOH ter 20 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo nato 2 uri mešali pri sobni temperaturi, in jo zatem nakisali z 10% citrsko kislino do pH=3. Rastopino smo nato dvakrat ekstrahirali z 30 mL diklorometana in združene organske faze pol ure sušili z Na_2SO_4 ter topilo odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 490 mg (1,37 mmol) svetlo rjavega trdnega produkta.

Izkoristek: 64 %

Elementna sestava: $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_6$

M = 357,357 g mol^{-1}

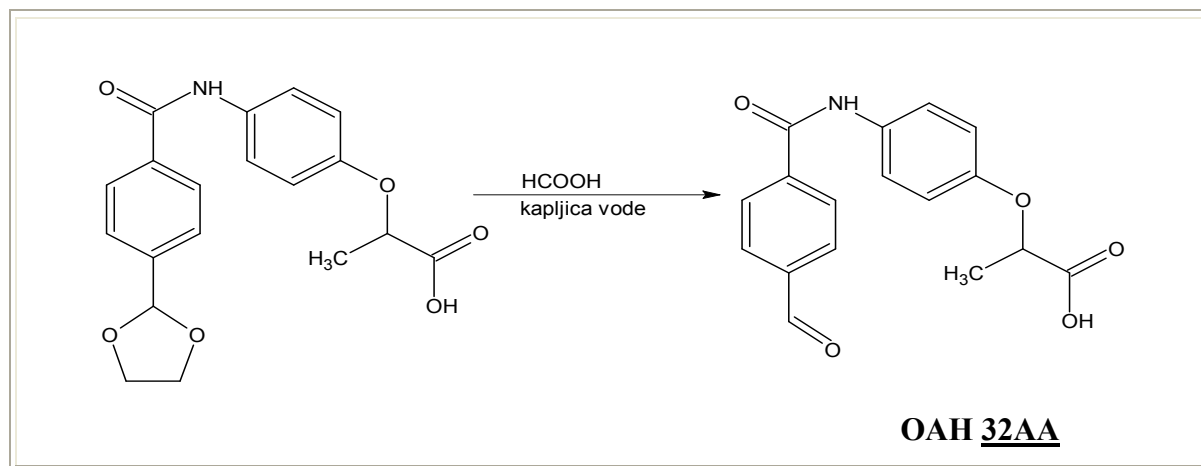
$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ 1,50 (d, 3H, $J=6,75$ Hz, $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)$), 4,03 (m, 4H, $\text{O}-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\underline{\text{C}}\text{H}_2-\text{O}$), 4,81 (q, 1H, $J=6,76$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)$), 5,82 (s, 1H, Ar- $\underline{\text{H}}$), 6,86-7,59 (AA'BB', 4H, $J=9,1$ Hz, $\Delta\nu = 209,3$ Hz, Ar-H), 7,63-7,97 (AA'BB', $J=9,1$ Hz, $\Delta\nu = 93,7$ Hz, 4H, Ar- $\underline{\text{H}}$), 10,16 (s, 1H, $\text{CO}-\underline{\text{N}}\underline{\text{H}}$), 12,96 (s, 1H, $\text{COO}\underline{\text{H}}$) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 358 (MH^+ , 100)

IR (KBr): ν 3346, 2889, 2366, 1734, 1653, 1534, 1513, 1412, 1330, 1298, 1227, 1082, 818, 762, 515 cm^{-1} .

Tališče: 143-148 $^{\circ}\text{C}$

4.32. Sinteza 2-(4-((4-formilbenzoil)amino)fenoksi)propanojske kisline (OAH 32AA)



V bučko smo natehtali 490 mg (1,37 mmol) 2-(4-((4-formilbenzoil)amino)fenoksi)propanojske kisline, ki smo ji dodali 15 mL metanojske kisline in kapljico vode. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi čez noč. Potem smo metanojsko kislino odparili pod znižanim tlakom. Nato smo produktu dodali 10 mL etra, pustili nekaj minut ter ga odparili pod znižanim tlakom. Dobimo 350 mg (1,12 mmol) svetlo rjavega trdnega produkta.

Izkoristek: 82 %

Elementna sestava: $\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{NO}_5$

M = 313,305 g mol^{-1}

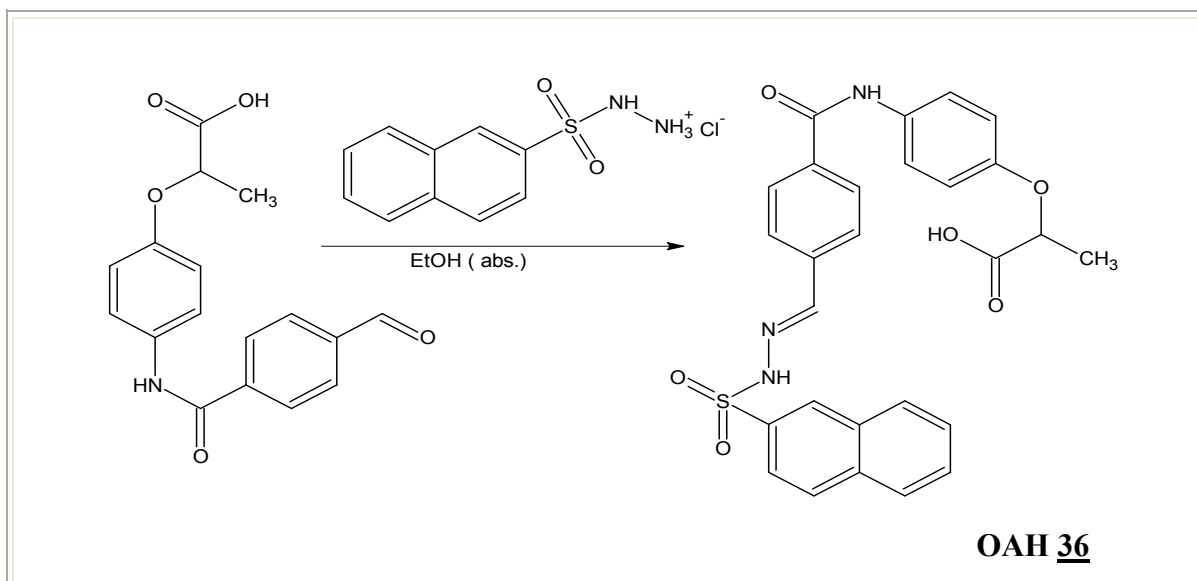
^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ : δ 1,50 (d, 3H, $J=6,34$ Hz, $\text{CH}(\underline{\text{C}}\text{H}_3)$), 4,81 (q, 1H, $J=8,65$ Hz, $\underline{\text{C}}\text{H}(\text{C}\text{H}_3)$), 6,88-7,68 (AA'BB', 4H, $J= 6,2$ Hz, $\Delta\nu = 28,4$, Ar-H), 8,03-8,14 (AA'BB', $J= 3,6$ Hz, $\Delta\nu = 17,5$ Hz, 4H, Ar- $\underline{\text{H}}$), 10,11 (s, 1H, CO-N $\underline{\text{H}}$), 10,34 (s, 1H, $\underline{\text{C}}\text{H}\text{O}$), 13,0 (s, 1H, COO $\underline{\text{H}}$) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 314 (MH^+ 100)

IR (KBr): ν 3675, 3274, 2344, 2364, 1700, 1645, 1534, 1509, 1414, 1244, 1049, 850, 822, 674, 530 cm^{-1} .

Tališče: 293-297 $^{\circ}\text{C}$

4.33. Sinteza 2-(4-((4-((2-(2-naftalensulfonil)hidrazono)metil)benzoi)amino)fenoksi)propanojske kisline (OAH 36)



V suho bučko smo natehtali 268 mg (0,86 mmol) 2-(4-((4-formilbenzoi)amino)fenoksi)propanojske kisline in 243 mg (0,94 mmol) soli naftalen-2-sulfonohidrazida ter dodali 15 mL brezvodnega etanola. Bučko smo opremili z vodnim povratnim hladilnikom in pri temperaturi vrenja zmes segrevali preko noči. Izpadla je svetlo rjava oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in posušili na zraku. Dobili smo 180 mg (0,35 mmol) svetlo rjavega trdnega produkta.

Izkoristek: 41 %

Elementna sestava: C₂₇H₂₃N₃O₆S

M = 517,554 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1,50 (d, 3H, J=6,73 Hz, CH(CH₃)), 4,91 (q, 1H, J=6,57 Hz, CH(CH₃)), 6,85-7,66 (AA'BB', 4H, J= 9,1 Hz, Δv = 227 Hz, Ar-H), 7,72 (m, 2H, Ar-H), 7,91 (m, 3H, Ar-H), 7,68-8,05 (AA'BB', 4H, J= 8,6 Hz, Δv = 97,6 Hz, Ar-H), 8,15 (m, 1H, Ar-H), 8,23 (m, 1H, Ar-H), 8,6 (s, 1H, CH=NH), 10,2 (s, 1H, CO-NH), 11,8 (s, 1H, COOH), 12,6 (s, 1H, =N-NH-SO₂) ppm.

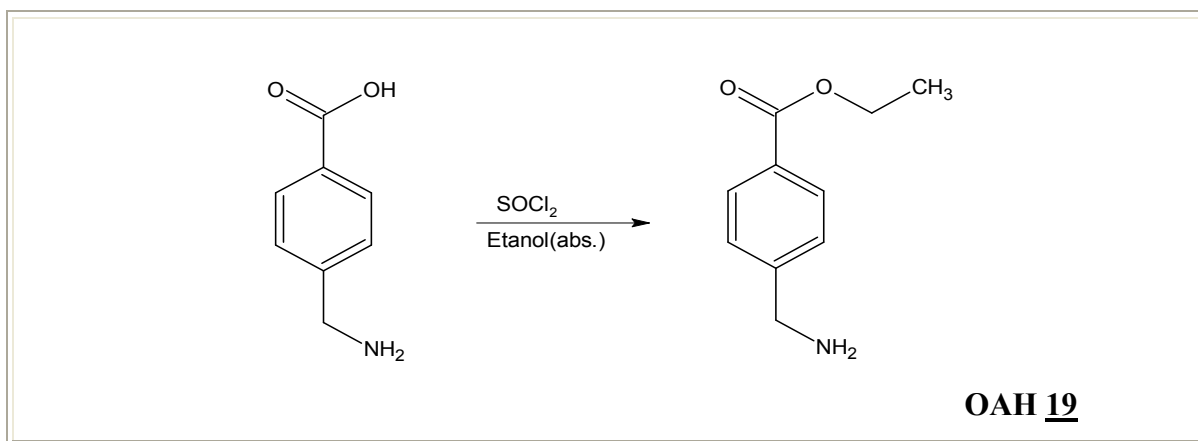
MS (ESI): m/z (%): 517 (M⁺ 57), 218 (100)

IR (KBr): ν 3312, 3190, 2981, 2364, 1743, 1640, 1601, 1510, 1447, 1213, 1360, 1322, 1229, 1160, 1064, 814, 642, 551 cm⁻¹.

Tališče: 197-200 °C

Elementna analiza: Izračunano za $C_{27}H_{23}N_3O_6S$ ($M = 517,554$ g/mol): 62,66 % C, 4,48 % H, 8,12 % N. **Izmerjeno:** 62,60 % C, 4,52 % H, 8,08 % N.

4.34. Sinteza etil 4-(aminometil)benzoata (OAH 19)



V suho bučko smo natehtali 5 g (33,1 mmol) 4-(aminometil)benzojske kisline, ter jo raztopili v 50 ml etanola. Nato smo s pomočjo kapalnika po kapljicah dodali 10 mL tionilklorida. Bučko smo opremili z vodnim povratnim hladilnikom in reakcijsko zmes segrevali ob vrenju preko noči. Nastalo zmes smo nato naalkalili do pH=9 in jo ekstrahirali z diklorometanom (1x100 mL) ter organsko fazo pol ure sušili z Na_2SO_4 in zatem topilo odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 4,75 g (26,5 mmol) svetlo rumenega tekočega produkta, ki je čez čas delno kristaliziral.

Izkoristek: 80 %

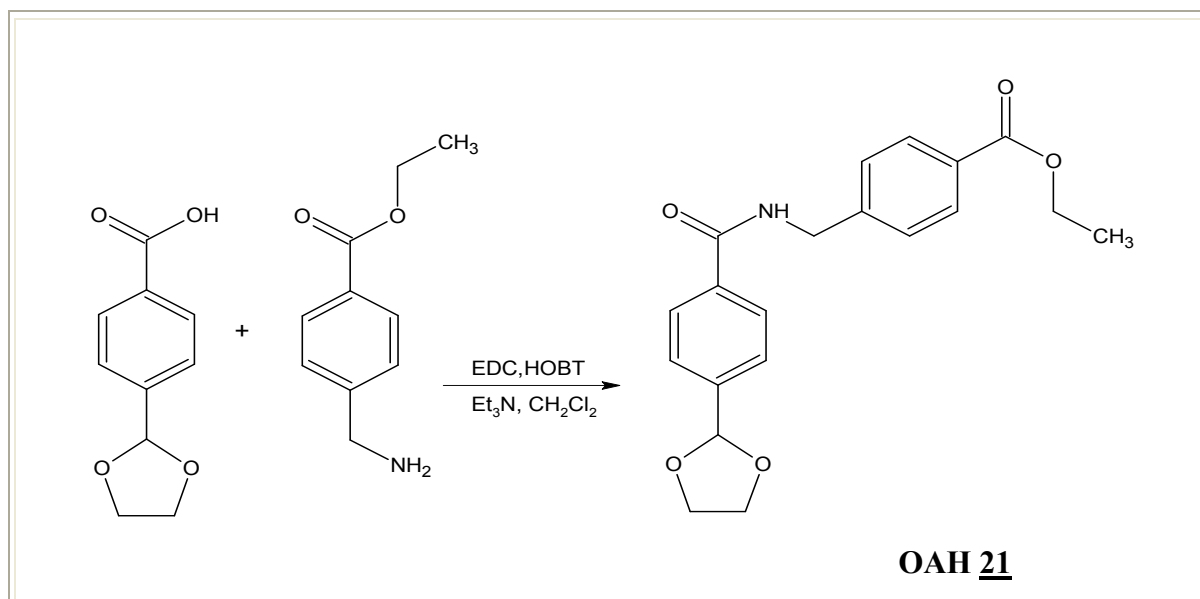
Elementna sestava: $C_{10}H_{13}NO_2$

M= 179,216 $g\ mol^{-1}$

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 1,31 (t, 3H, $J=14,2$ Hz, CH_2-CH_3), 2,16 (s, 2H, CH_2-NH_2), 3,80 (s, 2H, CH_2-CH_3), 4,29 (q, 2H, $J=7,11$ Hz, CH_2-NH_2), 7,45-7,91 (AA'BB', 4H, $J=8,3$ Hz, $\Delta\nu = 129$ Hz, Ar-H), 8,03 (s, 1H, CO-NH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 180 (MH^+ 100)

IR (KBr): ν 2984, 1715, 1574, 1450, 1397, 1329, 1275, 1222, 1108, 1023, 980, 854, 814, 756, 705, 638, 612, 530, 479 cm^{-1} .

4.35. Sinteza etil 4-(((4-(1,3-dioksolan-2-il)benzoi)amino)metil)benzoata (OAH 21)

V suho bučko, ki jo postavimo na ledeno kopel (0-5 °C) smo natehtali 1 g (5,15 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)benzojske kisline in jo nato raztopili v 25 mL diklorometana, dodali 990 mg (5,15 mmol) EDC, 700 mg (5,15 mmol) HOBT in 2 mL brezvodnega trietilamina. Zmes smo nato na ledeni kopeli mešali še 3 ure. Nastala je svetlo rumena raztopina, ki smo ji dodali 920 mg (5,15 mmol) etil 4-(aminometil)benzoata. Reakcijsko zmes smo nato 24 ur mešali pri sobni temperaturi in jo nato ekstrahirali z dvakrat po 20 mL 10% vodne raztopine citronske kisline, z dvakrat 20 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, s 20 mL prečiščene vode, in s 20 mL nasičene vodne raztopine NaCl v navedenem vrstnem redu. Nato smo organsko fazo sušili 2 uri z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo viskozno rumeno tekočino, ki smo jo prekristalizirali iz dietiletra in dobimo 980 mg (2,76 mmol) svetlo rumenega trdenega produkta.

Izkoristek: 54 %

Elementna sestava: C₂₀H₂₁NO₅

M= 355,384 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1,31 (t, 3H, J=14,19 Hz, CH₂-CH₃), 4,01 (m, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 4,30 (m, 2H, CH₂-NH), 4,57 (d, 2H, J=5,90 Hz, CH₂-CH₃), 5,80 (s, 1H, Ar-H), 7,45-7,95 (AA'BB', 4H, J= 8,0 Hz, Δv = 142 Hz, Ar-H), 7,53-7,95 (AA'BB', 4H, J= 8,3 Hz, Δv = 118 Hz, Ar-H), 9,16 (s, 1H, CO-NH) ppm.

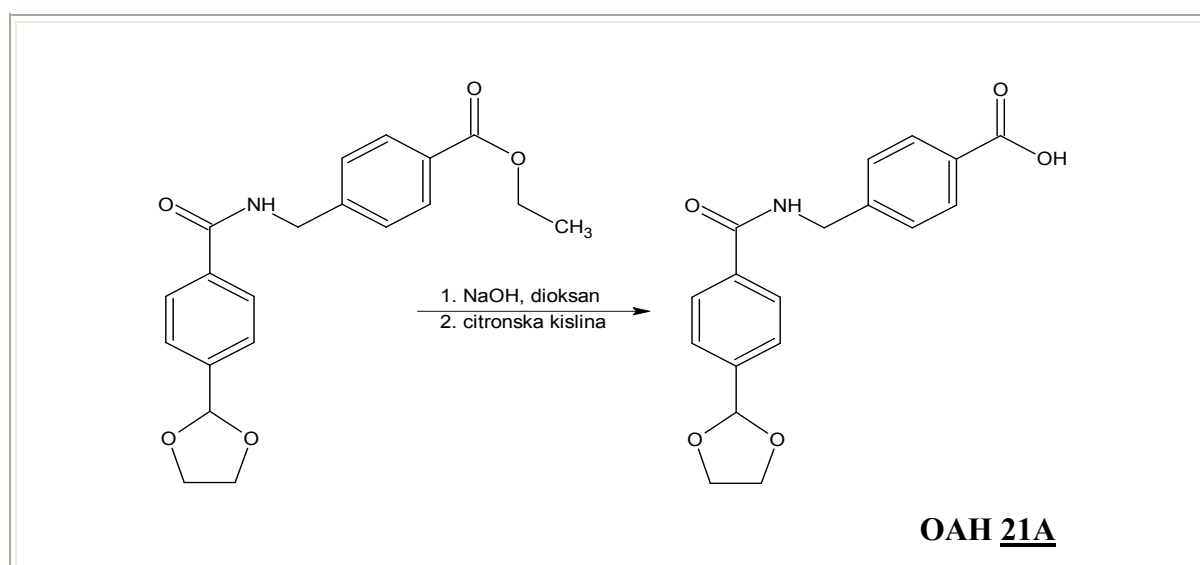
MS (ESI): m/z (%): 356 (MH⁺, 100)

IR (KBr): ν 3330, 2983, 2358, 1718, 1636, 1576, 1534, 1507, 1427, 1364, 1315, 1275, 1179, 1106, 1023, 850, 762, 708, 574, 555 cm⁻¹.

Tališče: 90-95 °C

HR-MS: Izračunano za C₂₀H₂₂NO₅ : 356,1484. **Izmerjeno:** 356,1498.

4.36 .Sinteza 4-(((4-(1,3-dioksolan-2-il)benzoil)amino)metil) benzojske kisline (OAH 21A)



V bučko smo natehtali 980 mg (2,76 mmol) etil 4-(((4-(1,3-dioksolan-2-il)benzoil)amino)metil)benzoata in dodali 20 mL 1M NaOH ter 20 mL dioksana. Reakcijsko zmes smo nato 2 uri mešali pri sobni temperaturi, in jo zatem nakisali z 10% citronske kisline do pH=3. Raztopino smo nato dvakrat ekstrahirali z 30 mL diklorometana. Združene organske faze smo nato pol ure sušili z Na₂SO₄ ter topilo odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 510 mg (1,55 mmol) svetlo oranžnega trdnega produkta.

Izkoristek: 56%

Elementna sestava: C₁₈H₁₇NO₅

M= 327,331 gmol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 4,02 (m, 2H, CH₂-NH), 4,06 (m, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 5,80 (s, 1H, Ar-H), 7,42-7,91 (AA'BB', 4H, J= 8,2 Hz, $\Delta\nu$ = 148 Hz, Ar-H), 7,52-7,94

(AA'BB', 4H, J= 8,3 Hz, $\Delta\nu = 116$ Hz, 4H, Ar-H), 9,14 (s, 1H, CO-NH), 12,8 (s, 1H, COOH) ppm.

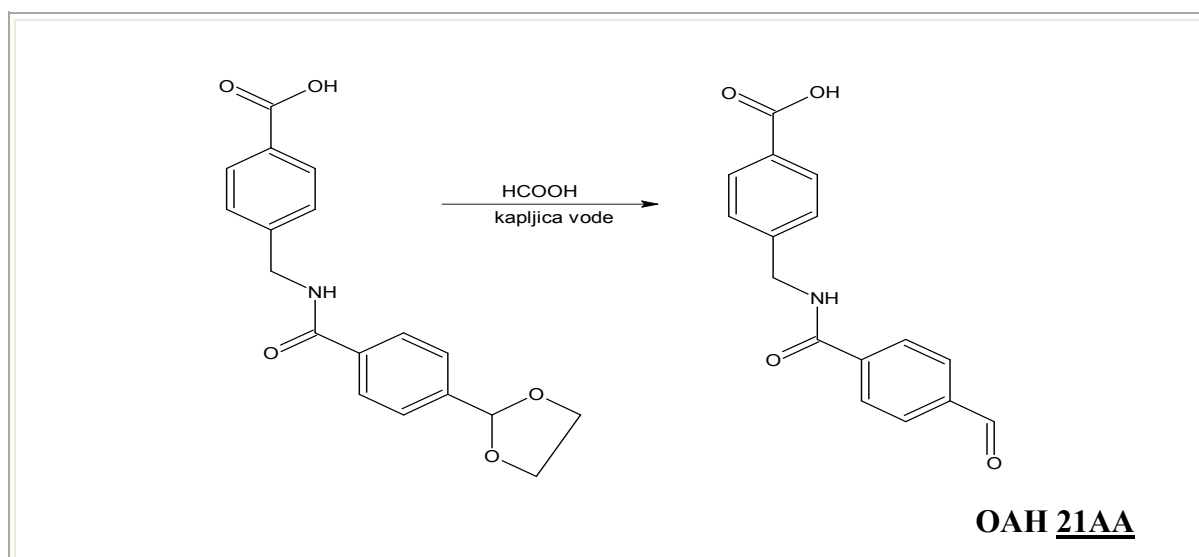
MS (ESI): m/z (%): 328 (MH⁺, 100), 350 (MNa⁺, 15)

IR (KBr): ν 3271, 2888, 2677, 1686, 1637, 1550, 1430, 1293, 1242, 1180, 1110, 1079, 1037, 1017, 972, 874, 789, 764, 710, 686, 639, 564, 542 cm⁻¹.

Tališče: 219-223 °C

HR-MS: Izračunano za C₁₈H₁₈NO₅ : 328,1193. **Izmerjeno:** 328,1185.

4.37. Sinteza 4-(((formilbenzoil)amino)metil)benzojske kisline (OAH 21AA)



V bučko smo natehtali 510 mg (1,55 mmol) 4-(((4-(1,3-dioksolan-2-il)benzoil)amino)metil)benzojske kisline, ki smo ji dodali 15 mL metanojske kisline in kapljico vode. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi čez noč. Potem smo metanojsko kislino odparili pod znižanim tlakom. Produktu dodali 10 mL etra, pustili nekaj minut, ter ga odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 460 mg (1,30 mmol) svetlo oranžnega trdnega produkta.

Izkoristek: 84 %

Elementna sestava: C₁₆H₁₃NO₄

M= 283,279 gmol⁻¹

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4,58 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-NH}$), 7,44-7,93 (AA'BB', 4H, $J = 8,4$ Hz, $\Delta\nu = 140$ Hz, Ar-H), 8,00-8,11 (AA'BB', 4H, $J = 8,4$ Hz, $\Delta\nu = 22,8$ Hz, Ar-H), 9,32 (s, 1H, CO-NH), 10,1 (s, 1H, CHO), 12,9 (s, 1H, COOH) ppm.

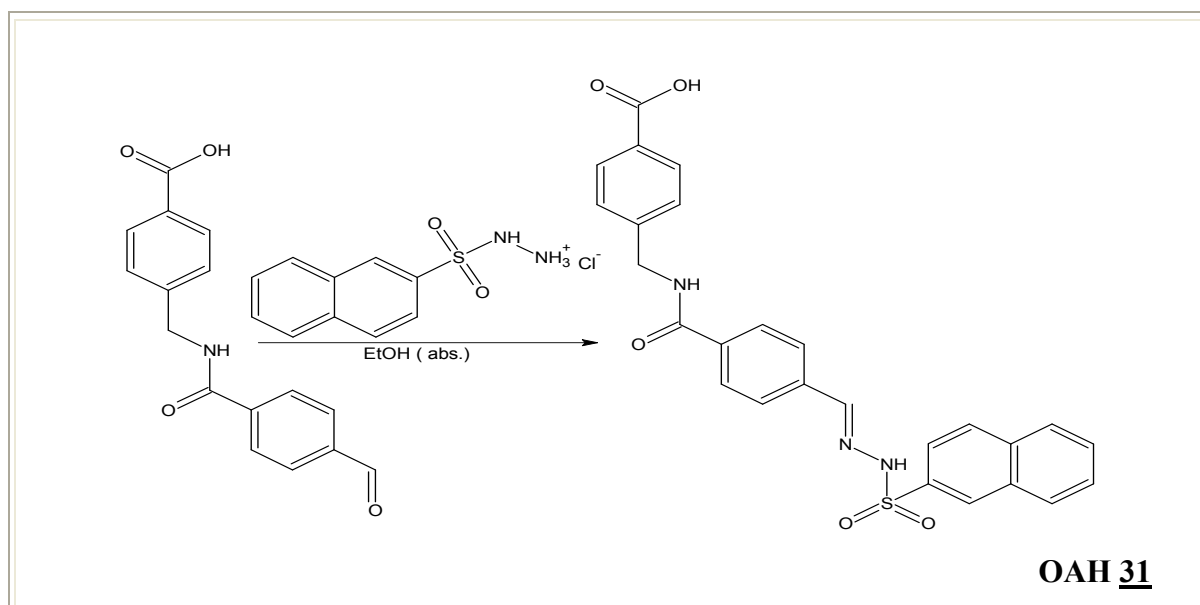
MS (ESI): m/z (%): 284 (MH^+ , 100)

IR (KBr): ν 3291, 3058, 1696, 1638, 1609, 1576, 1538, 1460, 1416, 1296, 1206, 1181, 1148, 1117, 1018, 993, 937, 838, 810, 745, 708, 648, 551 cm^{-1} .

Tališče: 210-214 $^\circ\text{C}$

HR-MS: Izračunano za $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{NO}_4$: 284,0930. Izmerjeno: 284,0923.

4.38. Sinteza 4-(((4-((-2-(2-naftalensulfonil)hidrazono)metil)benzoi)amino)benzojske kisline (OAH 31)



V suho bučko smo natehtali 270 mg (0,96 mmol) 4-(((formilbenzoi)amino)metil)benzojske kisline in 274 mg (1,06 mmol) soli naftalen-2-sulfonohidrazida ter dodali 15 mL brezvodnega etanola. Bučko smo opremili z vodnim povratnim hladilnikom in pri temperaturi vrenja zmes segrevali preko noči. Izpadla je svetlo rumena oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem. Dobili 172 g (0,35 mmol) svetlo rumenega trdnega produkta.

Izkoristek: 37 %

Elementna sestava: $\text{C}_{26}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$

M= 487,528 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 4,58 (m, 2H, CH₂-NH), 7,39-7,72 (AA'BB', 4H, J= 8,3 Hz, Δv = 88,9 Hz, Ar-H), 7,64-8,05 (AA'BB', 4H, J= 8,3 Hz, Δv = 93,3 Hz, Ar-H), 7,87-7,91 (m, 5H, Ar-H), 8,18 (s, 1H, Ar-H), 8,22 (s, 1H, Ar-H), 8,59 (s, 1H, CH=NH), 9,11 (s, 1H, CO-NH), 11,76 (s, 1H, =N-NH-SO₂), 12,83 (s, 1H, COOH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 488 (MH⁺, 100)

IR (KBr): ν 3292, 3213, 3060, 2897, 2359, 1695, 1634, 1613, 1535, 1505, 1457, 1427, 1362, 1328, 1225, 1162, 1071, 1018, 967, 931, 815, 753, 679, 584, 549 cm⁻¹.

Tališče: 229-232 °C

HR-MS: Izračunano za C₂₆H₂₂N₃O₅S : 488,1272. **Izmerjeno:** 488,1280.

5. REZULTATI IN DISKUSIJA

5.1. Razprava o sintezi 4-(arilsulfonilhidrazonoil)benzamidnih inhibitorjev Mur C in Mur D

5.1.1. Sinteza naftalen-2-sulfonohidrazida (OAH 0)

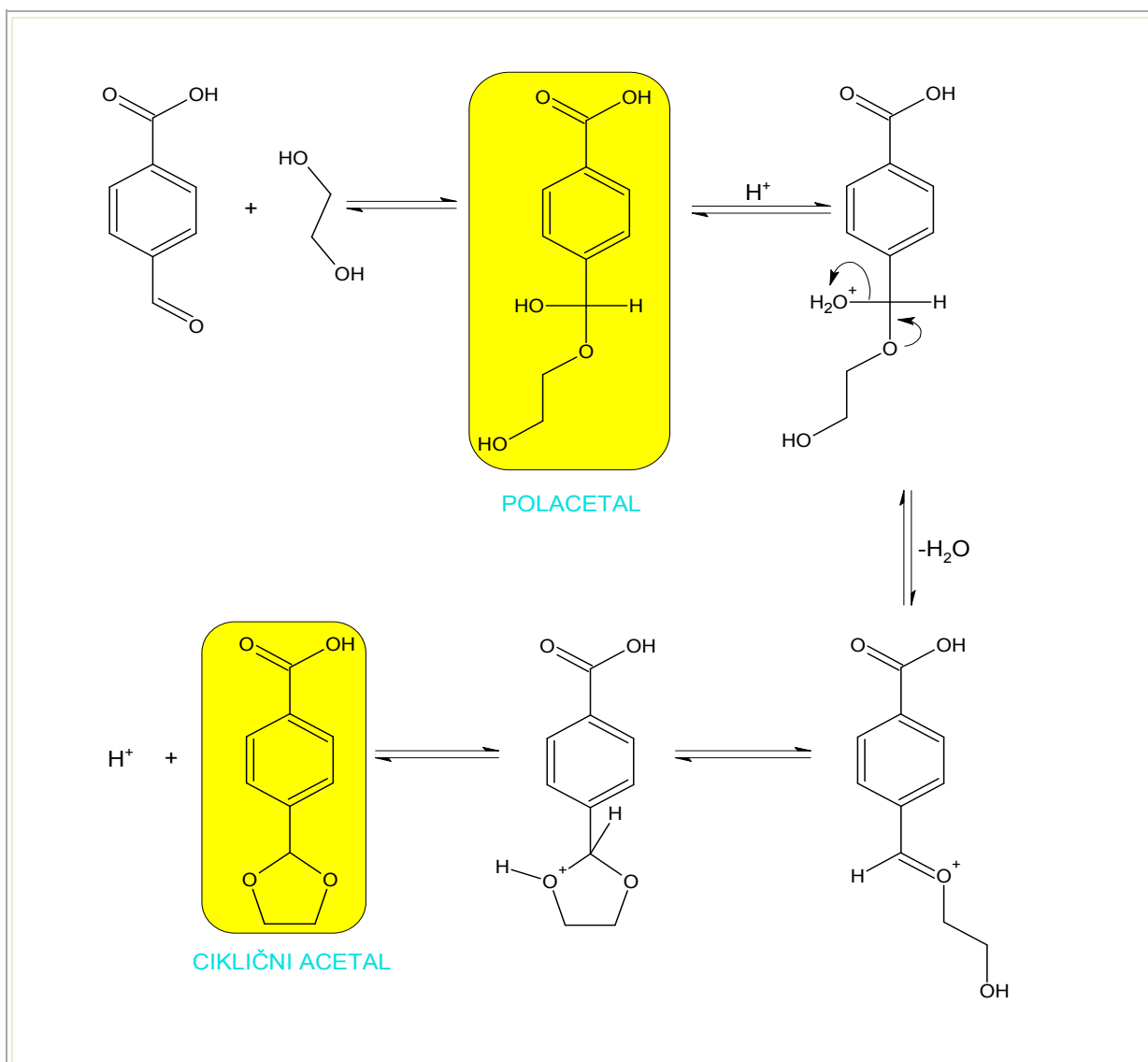
Sintezo naftalen-2-sulfonohidrazida smo izvedli tako, da smo hidrazin monohidratu, ki smo ga natehtali v bučko pri $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (ledeno kopel smo pripravili iz ustreznih količinskih razmerij ledu, EtOH in CaCl_2), po kapljicah s pomočjo kapalnika dodajali raztopino naftalen-2-sulfonil klorida v THF. Hidrazin monohidrat ($\text{NH}_2\text{NH}_2 \times \text{H}_2\text{O}$) je 64% raztopina brezvodnega hidrazina v vodi. Je zelo reaktivna molekula, ki hitro eksotermno reagira z elektrofilnimi reagenti. Zaradi reaktivnosti hidrazin monohidrata je pomembno, da reakcijo izvajamo pod kontroliranimi pogoji, pri nizki temperaturi. Če bi povečali temperaturo ali če bi dodajali hidrazinhidrat v raztopino sulfonilklorida, bi lahko nastal disubstituirani produkt. Reakcijsko zmes smo sprali z 10% vodno raztopino NaCl, s čimer smo odstranili prebiten hidrazin monohidrat, poleg tega smo na ta način zaradi higroskopnosti vodne raztopine NaCl odstranili tudi vodo iz organske faze. Preostanek vode smo nato odstranili še s sušilnim sredstvom.

5.1.2. Zaščita aldehydne skupine 4-formilbenzojske kisline

Aldehydno skupino smo zaščitili s pomočjo etilenglikola v obliki cikličnega acetala. Pri tej reakciji poteče najprej polarna adicija ene OH skupine etilenglikola na karbonilno skupino, pri čemer nastane polacetal. Sledi kislinsko katalizirana druga stopnja reakcije, kjer najprej poteče dehidracija in nato adicija druge OH skupine etilenglikola. Produkt reakcije je ciklični acetal. (slika 17) (26,27).

Kot katalizator pri reakciji uporabimo *p*-toluensulfonsko kislino (PTSA). Reakcija, ki poteka, je ravnotežna, in ker jo želimo pomakniti v smer nastajanja produkta uporabimo molekularna sita, ki vežejo vodo, ki nastaja pri reakciji. Ko je reakcija potekla do konca smo molekularna sita odfiltrirali in matičnici, ki vsebuje naš produkt dodali 10% vodno raztopino citronske kisline, s čimer smo odstranili preostanek PTSA in etilenglikola. Ker v vodni fazi

ostane tudi nekaj našega produkta, izvedemo reekstrakcijo z organskima topiloma etilacetatom in heksanom.



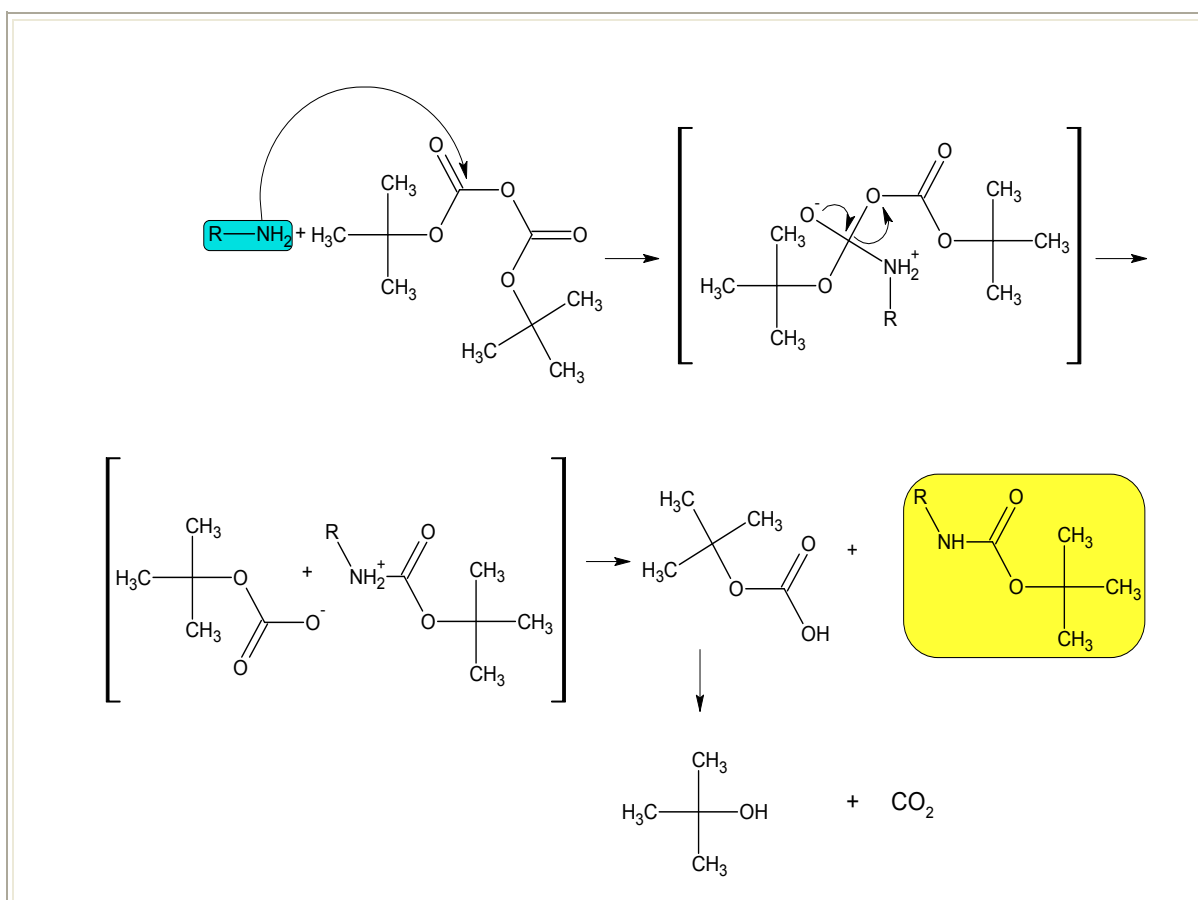
Slika 17: Mehanizem nastanka cikličnega acetala

5.1.3. Zaščita anilinske NH₂ skupine (OAH 17)

Aminsko skupino 4-aminofenola smo zaščitili v obliki karbamata z di-*tert*-butil dikarbonatom. Potekla je nukleofilna adicija s sledečo eliminacijo: N-aciliranje. Aromatska amino skupina je kot nukleofil reagirala z elektrofilnim ogljikom (BOC)₂O, pri čemer so nastali *tert*-butil-4-hidroksifenilkarbammat, *tert*-butilni alkohol in CO₂ (slika 18).

V molekuli 4-aminofenola sta dve nukleofilni skupini in sicer aromatski NH₂ in OH, ki bi lahko reagirali z (BOC)₂O. Reakcijo lahko z izbiro ustreznih reakcijskih pogojev

usmerimo v smer nastajanja N-aciliranega produkta. Kot topilo izberemo zmes vode in dioksana ter reakcijo izvajamo pri nižji temperaturi (0-5 °C), s čimer še dodatno zmanjšamo možnost nastanka O-aciliranega produkta. Znano je tudi, da je aminska skupina močnejši nukleofil kot hidroksilna skupina. (BOC)₂O smo dokapavali na ledeni kopeli tudi zato, da smo preprečili njegovo morebitno hidrolizo, dioksan pa smo kot topilo izbrali zato, ker se dobro meša tako z polarnimi kot z nepolarnimi topili. Z izbiro ustreznih topil smo izboljšali topnost (BOC)₂O in topnost našega produkta.



Slika 18: Mehanizem zaščite aminske skupine z (BOC)₂O.

5.1.4. Tvorba etra s klorpropionsko kislino (OAH 24)

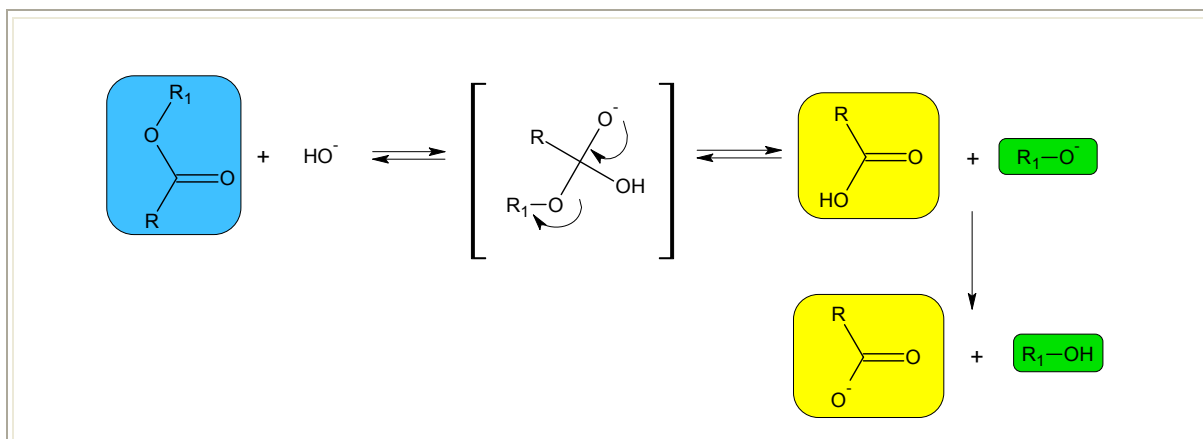
Reakcijo smo izvedli dvostopenjsko po mehanizmu klasične Wiliamsonove sinteze etrov. V prvi stopnji smo najprej *in situ* pripravili natrijev etilat, tako da smo v absolutni etanol dodajali v koščke narezan natrij. Ker je reakcija zelo eksotermna, bučko opremimo z vodnim povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko. Ko ves natrij zreagira z absolutnim etanolom (etanol mora biti brezvoden saj Na z vodo eksplozivno reagira) dodamo spojino

OAH 17. Natrijev etilat je zelo močna baza, ki je fenolno skupino terc-butil-4-hidroksifenilkarbamata pretvorila v fenolatni anion, ki je dober nukleofil, ki nam je olajšal nadaljnji potek reakcije. Med potekom reakcije zaznamo rožnato obarvanje, kar lahko pripišemo nastanku kinona, ki tudi nastaja kot stranski produkt med samo reakcijo. Nato dodamo klorpropionsko kislino in pri povišani temperaturi poteče nukleofilna substitucija s fenolatnim anionom spojine **OAH 17**.

5.1.5. Alkalna hidroliza etilnega estra

Z alkalno hidrolizo etilnega estra smo pripravili spojini **OAH 21A** in **OAH 32A**. Za alkalno hidrolizo smo se odločili zato, ker je hidroliza estrov v kislem reverzibilen proces, alkalna hidroliza pa je ireverzibilna. Gre za bimolekularno reakcijo, kjer v prvi stopnji baza kot nukleofil napade karboksilni ogljik estra. V drugi stopnji nastaneta kislina in alkohol, ki se zaradi velike razlike v kislosti pretvorita v karboksilatni anion in alkohol. Zaradi tega je zadnja stopnja ireverzibilna (slika 19) (26).

Kot topilo smo uporabili dioksan, v katerem sta bili spojini **OAH 21** in **OAH 32** dobro topni. Da je reakcija potekla smo ugotovili tako, da smo razvili TLC izhodne spojine in reakcijske zmesi po končani reakciji. Slednja lisa je ostala na začetku kromatograma, kar je pomenilo, da je reakcija potekla, saj spojina zaradi večje polarnosti ionizirane oblike karboksilne skupine ni potovala. Raztopino smo nakisali z 10% vodno raztopino citronske kisline s čimer smo karboksilno skupino prevedli v neionizirano obliko in s tem dosegli, da je spojina po ekstrakciji z diklorometanom prešla v organsko fazo. Nato smo z orositvenim reagentom za kisline, bromkrezolnim zelenim, in z orositvenim reagentom za aldehide, 2,4-dinitrofenilhidrazinom, preverili, če je hidroliza potekla in če smo med reakcijo odščitili zaščiten aldehydno skupino. Ker po oroševanju nismo dobili povsem jasnih rezultatov, smo strukturo produkta ugotovili šele s pomočjo NMR eksperimenta.

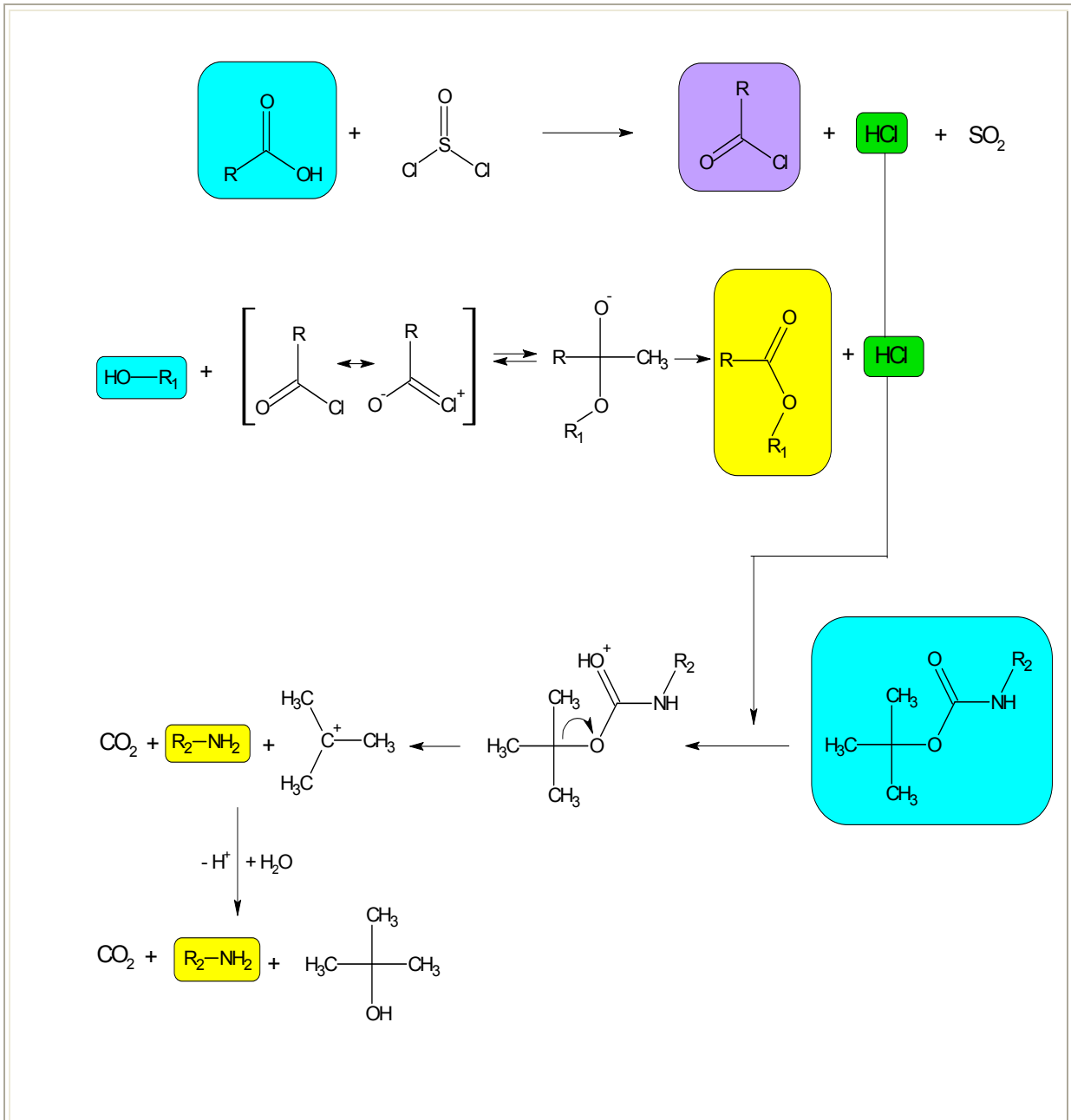


Slika 19: Alkalna hidroliza

5.1.6. Odstranitev zaščite z aminske skupine in tvorba estra s kislinskim kloridom (OAH 28)

Pri tej reakciji smo na karboksilni skupini izhodnega sintona tvorili etilni ester in hkrati odstranili zaščito na amski skupini. (slika 20) Estrsko vez smo tvorili z reaktivnimi kislinskimi kloridi, ki so najbolj reaktivni derivati karboksilnih kislin. Potekla je nukleofilna substitucija. Najprej smo aktivirali karboksilno skupino s tionil kloridom in jo tako pretvorili v kislinski klorid. Kot stranska produkta reakcije nastajata HCl in SO₂. Sledila je nukleofilna substitucija med nukleofilno OH skupino etanola, ki je napadla elektrofilen C-atom aktivirane karboksilne skupine, nato je sledil izstop dobro izstopajoče skupine, klorida. Pri reakciji nastaja tudi HCl, ki je reagirala na drugem delu molekule. Potekla je solvoliza, pri čemer je nastal primarni amin, CO₂ in 2-metil-2-propanol. Takšen mehanizem omogoča nastanek karbokationa ⁺C(CH₃)₃, ki je stabiliziran zaradi pozitivnega induktivnega efekta metilnih skupin.

Nastanek proste NH₂ skupine smo preverili z orositvenim reagentom ninhidrinom, ki amine obarva rdeče. Po orositvi TLC ploščice in nadaljnjem segrevanju se je prikazala rdeča lisa, ki je potrdila prosto NH₂ skupino našega produkta, spojine **OAH 28**. Ker pa se je nad našo liso pojavila še ena lisa, smo produkt čistili še s kolonsko kromatografijo.

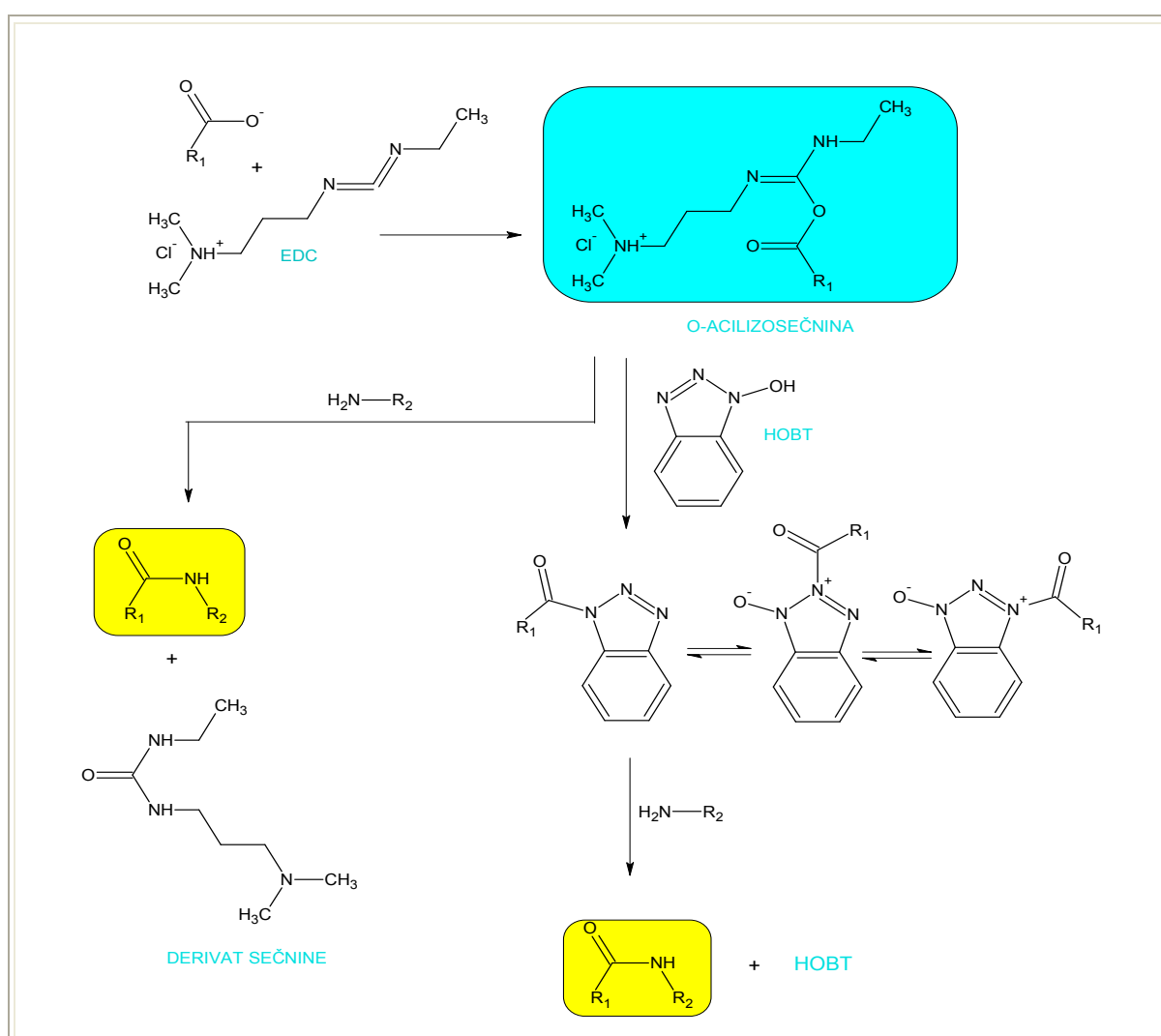
Slika 20: Odstranitev zaščite NH₂ in tvorba estra

5.1.7. Tvorba amidne vezi

Karbodiimidna metoda je najpogostejša metoda za tvorbo amidne vezi. Reagenta, ki ju v reakciji uporabimo sta 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)karbodiimidijev klorid (EDC) in 1-hidroksibenzotriazol (HOBT). EDC je reagent, odgovoren za aktivacijo karboksilne kisline (pride do tvorbe aktiviranega estra), ki sama po sebi ni dovolj reaktivna za reakcijo z amini. karboksilatni anion se veže na protoniran karbodiimid in nastane zelo reaktivna O-

acilizosečnina. Ta reagira z amsko skupino, pri čemer nastaneta peptid ter derivat sečnine. Reakcija, ki poteče pri nastanku amidne vezi, je nukleofilna substitucija na karbonilnem C-atomu.

Neželena reakcija pri tej metodi je premestitev acilne skupine iz O na N pri O-acilizosečnini. Tako lahko nastane N-acilizosečnina, pri kateri aminoliza ne poteče. Tvorbo tega stranskega produkta preprečimo z dodatkom 1-hidroksibenzotriazola (HOBT). Ta reagent z O-acilizosečnino tvori aktivirane benzotriazolne estre, pri katerih poteče aminoliza veliko hitreje (slika 21). Tako zmanjšamo obseg neželenih premestitev, ciklizacij, racemizacij in tvorbe simetričnih anhidridov. Posledično je izkoristek reakcije večji (28).



Slika 21: Mehanizem tvorbe peptidne vezi z uporabo EDC in HOBT.

S karbodiimidno metodo tvorbe amidne vezi smo pripravili naslednje spojine: **OAH 13A**, **OAH 800**, **OAH 2B**, **OAH 4B**, **OAH 5B**, **OAH 4A**, **OAH 2A**, **OAH 3A**,

OAH 21 in **OAH 32**. Pri reakciji smo izhajali iz **OAH 1**, spojine, ki ima aldehidno skupino zaščiteno v obliki cikličnega acetala. Na prosto karboksilno skupino te spojine smo v prisotnosti EDC in HOBT pripeli različne primarne amine. Najprej smo **OAH 1** raztopili v diklorometanu, dodali enako množino reagentov EDC in HOBT, ter trietilamin kot bazo, ki je potrebna za pretvorbo karboksilne skupine v karboksilatni anion, ki je potreben za potek reakcije. Preden smo začeli z izolacijo spojine, smo po 24 urah razvili kromatogram izhodnih spojin in produkta, ki nam je pokazal kako je reakcija potekala, če sploh in če so nastali stranski produkti. Z ekstrakcijo smo želeli čim bolj očistiti produkt. Najprej smo organsko fazo spirali z 10% raztopino citronske kisline, s katero smo pretvorili prebitni trietilamin v sol ter odstranili morebitne nezreagirane reagente. Nato smo za spiranje uporabili nasičeno vodno raztopino NaHCO_3 , s katero smo se znebili kislin (nezreagirana izhodna spojina), sledilo je spiranje organske faze z vodo, s katero smo se znebili morebitnih v vodi topnih nečistot. Na koncu smo organsko fazo sprali z nasičeno vodno raztopino NaCl , ki je odstranila vodo, ter sušili z Na_2SO_4 , ki je sušilno sredstvo za kvantitativno odstranjevanje vode. Nekatere končne produkte smo očistili še z kolonsko kromatografijo ali prekrystalizacijo.

5.1.8. Odstranitev zaščite z aldehidne skupine

Zaščito v obliki 1,3-dioksolana smo odstranili v kislem. Reakcijo smo izvedli tako, da smo substrat raztopili v metanojski kislini in dodali kapljico prečiščene vode, ki je potrebna za proces hidrolize. Reakcija je potekla po istem mehanizmu kot nastanek polacetalov in cikličnih acetalov, le v obratni smeri. Ker je nastanek polacetalov in acetalov ravnotežna reakcija, lahko le-to usmerjamo glede na pogoje, ki jih izberemo in s tem pomaknemo ravnotežje v smer, ki nam ustreza. V našem primeru smo v reakcijsko zmes dodali prebitek kisline in s tem pomaknili ravnotežje v smer nastanka aldehida.

5.1.9. Pripenjanje naftalen-2-sulfonohidrazida

Ta reakcija predstavlja zadnjo stopnjo v sinteznem postopku naših spojin. Gre za reakcijo med aminske skupino naftalen-2-sulfonohidrazida in prosto aldehidno skupino derivatov 4-formilbenzojske kisline. Poteče adicija primarne amino skupine na prosto karbonilno skupino s sledečo eliminacijo vode.

Končne spojine smo sintetizirali po dveh sinteznih postopkih. V prvem sinteznem postopku, kjer smo pripravili spojine **OAH 2**, **OAH 3** in **OAH 5A**, smo derivat 4-formilbenzojske kisline raztopili v tetrahidrofuranu in dodali brezvodni trietilamin. Bazo smo dodali zato, ker smo domnevali, da aminska skupina naftalen-2-sulfonohidrazida ne sme biti v protonirani obliki, ker bi se zmanjšala njena reaktivnost. Spojine, ki smo jih dobili, smo čistili s kolonsko kromatografijo. Posledično so bili izkoristki nizki, zato smo poskušali reakcijo izvesti še brez baze.

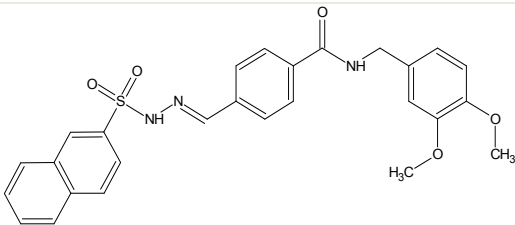
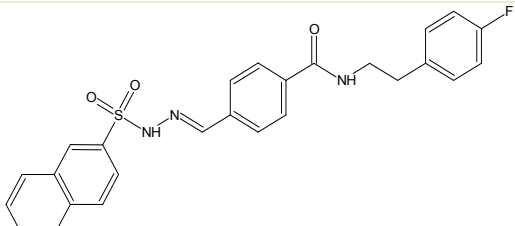
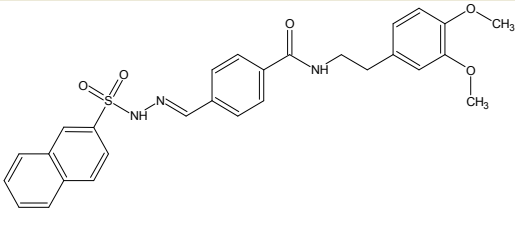
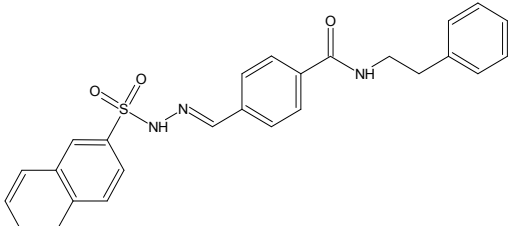
V tem primeru smo k reagentoma, derivatu 4-formilbenzojske kisline in naftalen-2-sulfonohidrazidu dodali absolutni etanol, ki je predstavljal dobre pogoje za izvedbo reakcije, saj je v tem primeru izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem. Tako smo pripravili spojine **OAH 7**, **OAH 13**, **OAH 16**, **OAH 12**, **OAH 31** in **OAH 36**.

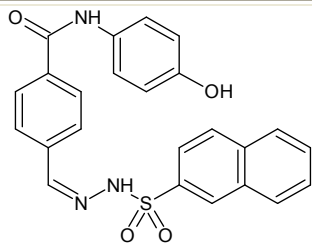
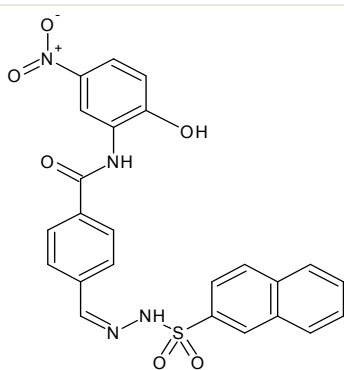
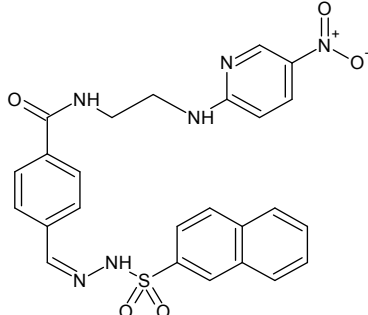
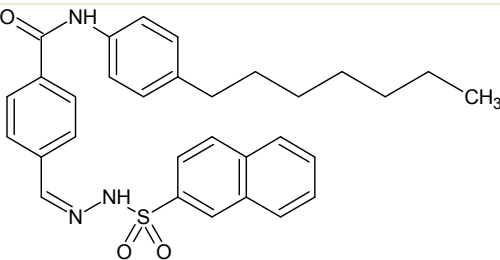
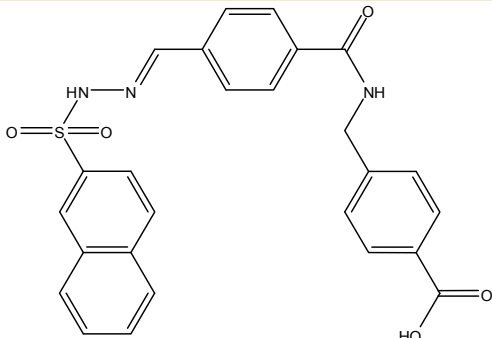
5.2. Rezultati biokemičnega testiranja spojin

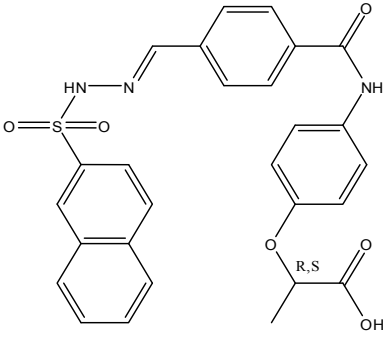
Večino sintetiziranih končnih spojin smo biokemijsko testirali na encimih Mur C in Mur D. Rezultati so zbrani v tabeli IV.

Rezidualna aktivnost encima (RA) je razmerje katalitičnih aktivnosti encima z inhibitorjem in brez inhibitorja. Izrazimo jo v odstotkih in je merilo za učinkovitost inhibitorja.

Tabela IV: Rezultati biokemičnega testiranja sintetiziranih končnih spojin

| Oznaka | STRUKTURA | M (g/mol) | C (μ M) | RA% Mur C | RA% Mur D |
|-----------|---|--------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| OAH 2 |  | 503,571 | 250 | 88 | 103 |
| OAH 3 |  | 475,536 | 100 | 72 | 105 |
| OAH 5A |  | 517,597 | 250 | 103 | 100 |
| OAH 13 |  | 457,545 | 100 | 58 | 94 |

| | | | | | |
|-----------|---|---------|-----|-------------------------|-----|
| OAH 7 |  | 445,491 | 100 | 97 | 41 |
| OAH 9 |  | 490,489 | 250 | Interakcije s testom | |
| OAH 12 |  | 518,546 | 250 | 68 | 100 |
| OAH 16 |  | 527,678 | | Ni topna v DMSO | |
| OAH 31 |  | 487.53 | 250 | Interakcije s testom | |

| | | | | | |
|-------------------|---|--------|-----|--|----|
| <p>OAH 36</p> |  | 517,55 | 250 | | 95 |
|-------------------|---|--------|-----|--|----|

Vse spojine testirane v prisotnosti 0,005% koncentracije Tritona X-114.

Dobljene rezultate biokemičnega testiranja smo ovrednotili na podlagi RA vrednosti, na osnovi katerih smo dobili podatke o jakosti ter odnosu med strukturo in delovanjem sintetiziranih spojin. Manjša RA vrednost pomeni, da spojina pri dani koncentraciji upočasnjuje encimsko katalizirano reakcijo. Razlike v RA so znotraj vrednosti eksperimentalnih napak, če so v mejah med 80 in 120%. Spojinama **OAH 31** in **OAH 9** nismo mogli določiti RA vrednosti zaradi interakcij s testom. Spojina **OAH 16** ni bila topna v topilu DMSO, spojini **OAH 36** pa smo določili aktivnost le na Mur D ligazo.

Najbolj aktivna spojina, ki smo jo sintetizirali, je bila **OAH 7** (RA= 41% pri 100 μ M), ki je do neke mere upočasnila delovanje le encima Mur D, na encim Mur C pa ni izkazala nobenega učinka. Verjetno OH skupina vezana na *para* mestu aromatskega obroča vpliva na aktivnost samega inhibitorja, saj lahko tvori vodikove vezi v aktivnem mestu encima. Izmed ostalih sintetiziranih spojin ni nobena kazala inhibitornega delovanja na encim Mur D. Na encim Mur C je imela najbolj izraženo inhibitorno delovanje spojina **OAH 13** (RA= 58% pri 100 μ M) in v majnji meri tudi spojina **OAH 3** (RA= 72% pri 100 μ M).

Če med seboj primerjamo spojine **OAH 13**, **OAH 3** in **OAH 5A** vidimo, da imajo vse tri spojine vezan aromatski obroč na amidno vez prek distančnika dveh CH_2 skupin. Vidimo tudi, da vezava metoksi skupin na aromatski obroč ni ugodna, prav tako vezava fluora zmanjša inhibitorno aktivnost spojine. Aromatski obroč brez substituentov je najugodnejši za inhibitorno aktivnost teh spojin iz česar lahko sklepamo, da so lipofilne spojine z vezano metoksi ali fluoro skupino manj aktivne.

Učinkovita je tudi spojina **OAH 12**, ki ima preko distančnika dveh CH_2 atomov vezano skupino 6-nitro-3-pirimidinsko skupino, ki inhibitorno deluje na encim Mur C. Iz že sintetiziranih spojin je bilo ugotovljeno, da ima položaj nitro skupine velik vpliv na inhibitorno delovanje same spojine. V primeru, da je nitro skupina vezana na orto mesto

aromata je aktivnost precej večja kot, če je vezana na para mesto.(11) V našem primeru bi bilo verjetno ugodneje če bi bila NO_2 skupina vezana na orto in ne na meta položaju.

Podobne spojine so bile na Katedri za farmacevtsko kemijo že sintetizirane in sicer derivati (N' -fenilmetiliden)naftalen-2-sulfonohidrazida in imajo na mestu 4 fenilnega obroča preko amidne vezi vezan aromatski substituent. Te spojine imajo NH del amidne vezi vezan direktno na fenilni obroč. Najmočnejša izmed teh spojin ima $\text{IC}_{50} = 33$. Nekatere spojine, ki imajo amidno vez v enakem položaju kot naše, imajo primerljive vrednosti $\text{IC}_{50} = 35$. Glede na te vrednosti spadajo te spojine med najbolj aktivne nizkomolekularne inhibitorje (11). Čeprav so naše spojine strukturno podobne že sintetiziranim, takšne aktivnosti z izjemo **OAH 7** žal nimajo.

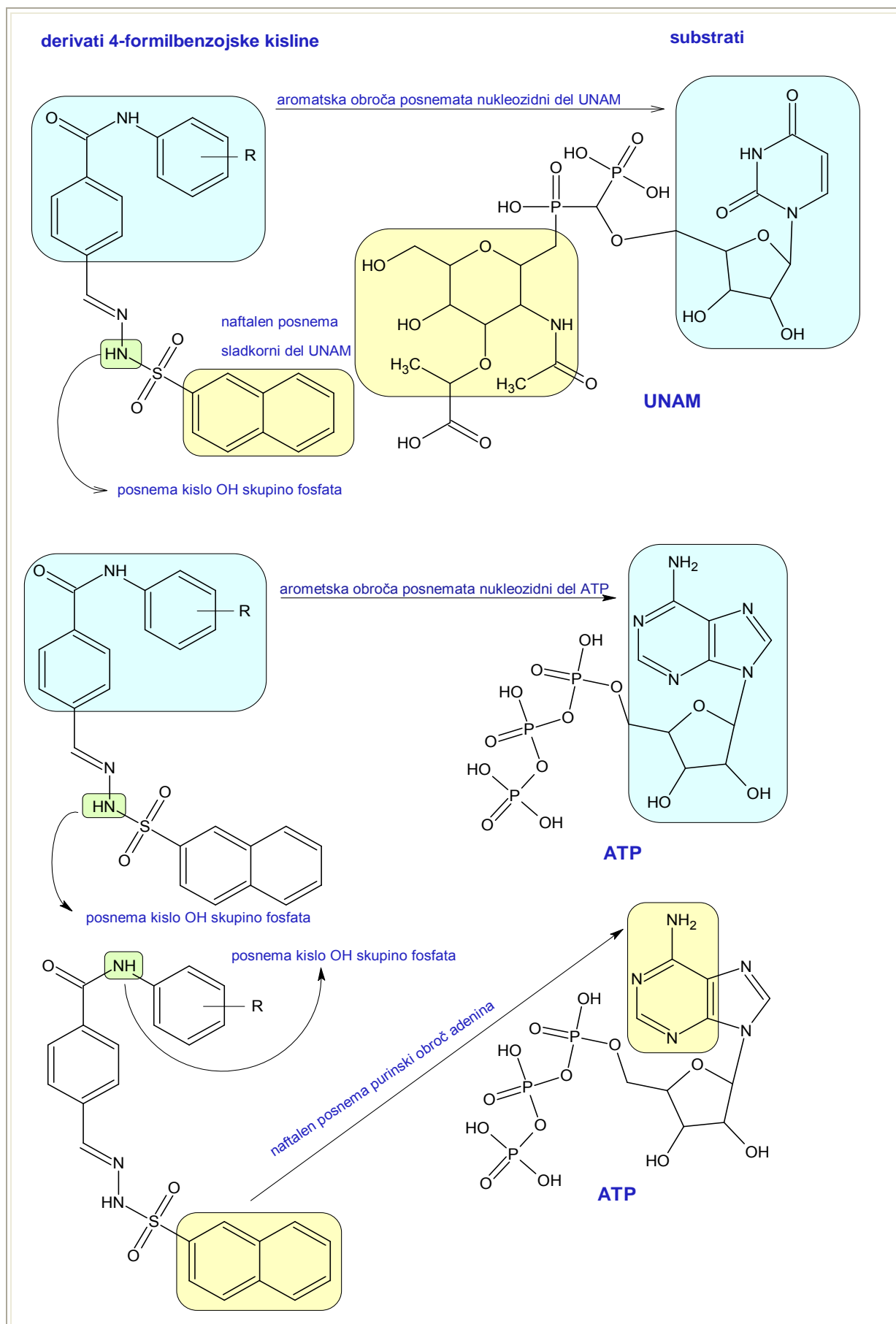
Ko smo primerjali naše spojine s strukturami substratov in produktov reakcij, ki jih katalitirata encima Mur C in Mur D, smo ugotovili, da so naše spojine podobne UNAM, UDP, in ATP. Glede na to lahko sklepamo, da se naše spojine vežejo bodisi na UDP-vezavno mesto, bodisi na ATP-vezavno mesto. Medtem ko smo primerjali strukturne dele naših spojin z UNAM, UDP in ATP smo pomislili na tri možne vezave naših spojin.

Naftalen, ki ga imajo vse naše spojine, bi lahko posnemal purinski obroč pri adeninu. Naše spojine imajo tudi kislo NH skupino, ki bi lahko tvorila enake interakcije z encimom kot kisla OH skupina fosfatnega dela ATP. Razdalji med obročnim sistemom in kislim vodikom sta podobni pri ATP, UDP in naših spojinah.

Nadalje smo pomislili tudi na možnost, da se naftalen naših spojin veže na tisto mesto, kamor se sicer veže sladkorni del substrata UNAM. Ostala obroča bi se lahko vezala na mesto, s katerim tvori interakcije nukleozidni del UNAM. Kisla NH skupina naših spojin, pa lahko posnema kisle OH skupine fosfata.

V tretje pa smo pomislili na možnost vezave aromatskih obročev na tisto mesto encima, kamor se veže nukleozidni del ATP. Kisla NH skupina sulfonohidrazidnega dela pa bi lahko posnemala fosfatno kislo OH skupino (slika 22).

Vsekakor bi bilo zanimivo zamenjati naftalenski obroč z bolj polarnimi derivati, ker bi na ta način morda lahko v večji meri izkoristili tvorbo interakcij z aminokislinskimi preostanki v aktivnem mestu.



Slika 22: Primerjava struktur UNAM, ATP in derivatov 4-formilbenzojske kisline.

6. SKLEP

V okviru diplomske naloge smo si zastavili načrt, po katerem smo uspešno sintetizirali deset končnih spojin. Nekatere pripravljene spojine so novi potencialni sulfonohidrazonoilni inhibitorji Mur C in Mur D ligaz.

Sintezni postopki, ki smo jih izvedli so vključevali reakcije zaščite reaktivne aldehydne skupine, zaščito anilinske amino skupine, tvorbo estra s pomočjo kislinskega klorida, tvorbo amidne vezi s karbodiimidno metodo, odstranitev zaščite aldehydne skupine in anilinske amino skupine v kislem, hidroliza estra v alkalnem ter pripenjanje naftalen-2-sulfonohidrazida. Za dokazovanje ustreznosti in čistote sintetiziranih spojin smo uporabili ustrezne analize postopke. Biološko aktivnost spojin pa smo dokazovali s pomočjo biokemijskih testov na encimih Mur C in Mur D.

Izmed sintetiziranih derivatov 4-formilbenzojske kisline nam je uspelo pripraviti dve spojini, ki uspešno inhibirata encim Mur C oziroma Mur D. Močnejši inhibitor encima Mur C je spojina 4-((2-(2-naftilsulfonil)hidrazono)metil)-*N*-fenetilbenzamid (**OAH 13**). Ta spojina se od ostalih spojin, ki so delovale na Mur C razlikuje v tem, da nima substituiranega aromatskega obroča. Na encim Mur D ima najmočnejšo inhibitorno aktivnost spojina *N*-(4-hidroksifenil)-4-((2-(2-naftilsulfonil)hidrazono)metil)benzamid (**OAH 7**). Ugotovili smo, da je za inhibitorno delovanje na encim Mur D koristna hidroksi skupina na *para* mestu distalnega aromatskega obroča.

Sintetizirane spojine nam nakazujejo smer nadaljnjega razvoja sulfonohidrazonoilnih inhibitorjev, hkrati pa dobljeni rezultati dodatno prispevajo k razumevanju odnosa med strukturo in delovanjem naših spojin.

7. LITERATURA

1. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry 6th Ed, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2008, 1028-1046.
2. Hardman JG, Limbird LE: Goodman&Gilman's the pharmacological basis of therapeutics 10th Ed, McGraw-Hill, 2001, 1189-1193
3. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: Pharmacology, 5th Ed, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2003, 620-653
4. Scholar EM, Pratt WB, The Antimicrobial Drugs, 2nd Ed, Oxford University Press, New York, 2000, 37-48
5. Walsh FM, Amyes SGB: Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens, Current Opinion in Microbiology, 2004, 7:439-444
6. www.scq.ubc.ca, Y.Grace, Attack of the superbugs:antibiotic resistance
7. Livermore DM: Minimising antibiotic resistance, Lancet Infect Dis 2005, 5: 450-459.
8. Bush K, Macielag M, Weidner-Wells M: Taking inventory: antibacterial agents currently at or beyond Phase 1. Current Opinion in Microbiology, 2004, 7: 466-476
9. Gobec S, Urleb U: Inhibitorji biosinteze peptidoglikana, Farmaceutski vestnik, 1999, 50: 183-193
10. Sillver LL, Does the cell wall of bacteria remain a viable source of targets for novel antibiotics?, Biochemical Pharmacology, 2006, 71: 996-1005
11. Frlan R, Obreza A: Design and synthesis of novel N-benzylidensulfonhydrazide inhibitors of Mur C and Mur D as potential antibacterial agents, 2008, 13: 11-13
12. Vollmer W, Blanot D: Peptidoglycane structure and architecture, Microbiological review, 2007, 1-19
13. Li Z et al.: 2-phenyl-5,6-dihydro-2H-thieno[3,2-c]pyrazol-3-ol derivatives as new inhibitors of bacterial cell wall biosynthesis. Bioorg Med Chem Lett 2003; 13: 2591-2594
14. Zoiiby AE, Sanachagrin F, Levesqe RC: Structure and function of Mur enzymes: development of novel inhibitors. Mol Microbiol 2003; 47: 1-12
15. Greenwood D: Antimicrobial Chemotherapy, 4th, Oxford University Press, New York, 2000, 11-28
16. Smith CA: Structure, function and dynamics in the mur family of bacterial cell wall ligases. J Mol Biol 2006; 362: 640-655

17. Kotnik M, Humljan J: Structural and functional characterization of enantiomeric glutamic acid derivatives as potential transition state analogue inhibitors of MurD ligase, *Journal of Molecular Biology*, 2007, 1:107-115
18. Ehmman DE, Demeritt JE, Hull KG, Fisher SL: Biochemical characterization of an inhibitor of *Escherichia coli* UDP-N-acetylmuramyl-L-alanine ligase. *Biochim et Biophys Acta* 2004; 1698: 167-174
19. Mol CD et al.: Crystal structures of active fully assembled substrate- and product-bound complexes of UDP-N-acetylmuramic acid:L-alanine Ligase (MurC) from *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol* 2003; 185: 4152-4162
20. Bertrand JA et al.: "Open" structures of MurD: domain movements and structural similarities with folypolyglutamate synthetase. *J Mol Biol* 2000; 301: 1257-1266
21. Bertrand JA, Auger G, Martin L, Fanchon E, Blanton D, Le Beller D, van Heijenoort J, Dideberg O: Determination of the MurD mechanism through crystallographic analysis of enzyme complexes. *J Mol Biol* 1999; 289: 579-590
22. Mui Mui Sim, Siew Bee Ng, Buss AD, Crasta SC, Kah Lin Goh, Sue Kim Lee: Benzylidene Rhodanines as novel inhibitors of UDP-N-acetylmuramate/L-alanine ligase. *Bioorg Med Chem Lett* 2002; 12: 697-699
23. Reck F, Marmor S, Fisher S, Wuonola MA: Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurC. *Bioorg Med Chem Lett* 2001; 11: 1451-1454
24. Gegnas LD, Wadell ST, Chabin RM, Reddy S, Wong KK: Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurD. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8: 1643-1648
25. Horton JR et al.: Macrocyclic inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurD. *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13: 1557-1560
26. Tišler M: *Organska kemija*. Tretja, popravljena in dopolnjena izdaja, Državna založba slovenije, 1991: 210-213
27. Hanson JR: *Functional group chemistry*. The Royal Society of chemistry, 2001: 79-91
28. Sewald N, Jakubke HD: *Peptides: Chemistry and Biology*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim 2002:148-150, 184-205
29. Antane et al.: Pulvinones as bacterial cell wall biosynthesis inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett* 2006; 16: 176-180