

# VSEBINA

<b>VSEBINA</b> .....	<b>1</b>
<b>POVZETEK</b> .....	<b>3</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>4</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	<b>5</b>
<b>1 UVOD</b> .....	<b>7</b>
1.1 PROTIMIKROBNE UČINKOVINE IN NJIHOV MEHANIZEM DELOVANJA.....	7
1.2 RAZVOJ REZISTENCE NA PROTIMIKROBNE UČINKOVINE.....	8
1.3 BAKTERIJSKA CELIČNA STENA .....	10
1.3.1 Celična stena grampozitivnih in gramnegativnih bakterij.....	10
1.4 PEPTIDOGLIKAN.....	12
1.4.1 Struktura peptidoglikana.....	12
1.4.2 Biosinteza peptidoglikana.....	14
1.5 MUR-LIGAZE .....	16
1.5.1 Ligaza MurC .....	17
1.5.2 Ligaza MurD.....	18
1.5.3 Inhibitorji encima MurC .....	19
1.5.4 Inhibitorji encima MurD .....	23
<b>2 NAČRT ZA DELO</b> .....	<b>25</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>31</b>
3.1 MATERIALI .....	31
3.2 METODE.....	31
3.2.1 Kromatografske metode.....	31
3.2.2 Spektroskopske metode.....	31
3.2.3 Temperatura tališča .....	32
3.2.4 Optična sučnost.....	32
3.2.5 Biokemijska testiranja.....	33
3.2.6 Nomenklatura in risanje spojin .....	33
<b>4 EKSPERIMENTALNO DELO</b> .....	<b>34</b>
4.1 PRVA SINTEZNA POT.....	34
4.1.1 Sinteza <i>N</i> -( <i>terc</i> -butiloksikarbonil) L-levcina (OSJ 6).....	34
4.1.2 Sinteza naftalen-2-sulfonohidrazida (OSJ 26) .....	34
4.1.3 Sinteza <i>terc</i> -butil-4-metil-1-2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksopentan-2-ilkarbamata (OSJ 17(1)) .....	35
4.1.4 Sinteza <i>N</i> -(2-amino-4-metilpentanoil)naftalen-2-sulfonohidrazinijevega klorida (OSJ 34).....	37
4.1.5 Sinteza <i>N</i> -(4-metil-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksopentan-2-il)benzensulfonamida (OSJ 27).....	38
4.1.6 Sinteza <i>N</i> -(4-metil-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksopentan-2-il)-2-nitrobenzensulfonamida (OSJ 33) .....	39
4.1.7 Sinteza 5-(klorosulfonil)salicilne kisline (OSJ 46) .....	41

4.1.8	Sinteza 2-hidroksil-5-( <i>N</i> -(4-metil-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksopentan-2-il)sulfamoil) benzojske kisline (OSJ 62) .....	41
4.1.9	Sinteza 4-metoksi- <i>N</i> -(4-metil-1-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksopentan-2-il)benzensulfonamida (OSJ 87) .....	43
4.1.10	Sinteza <i>N</i> -(4-metil-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksopentan-2-il)benzamida (OSJ 97) .....	44
4.2	DRUGA SINTEZNA POT .....	45
4.2.1	Sinteza 1-metoksi-4-metil-1-oksopentan-2-aminijevega klorida (OSJ 3).....	45
4.2.2	Sinteza metil 4-metil-2-(3-nitrofenilsulfonamido)pentanoata (OSJ 5) .....	46
4.2.3	Sinteza 4-metil-2-(3-nitrofenilsulfonamido) pentanojske kisline (OSJ 10).....	47
4.2.4	Sinteza naftohidrazida (OSJ 119).....	48
4.2.5	Sinteza <i>N</i> -(1-(2-(2-naftoil)hidrazinil)-4-metil-1-oksopentan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamida (OSJ 19) .....	49
4.2.6	Sinteza 3, 5-dihidroksibenzohidrazida (OSJ 122).....	50
4.2.7	Sinteza <i>N</i> -(1-(2-(3,5-dihidroksibenzoil)hidrazinil)-4-metil-1-oksopentan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamida (OSJ 22) .....	51
4.2.8	Sinteza 2-(2-nitrofenil)acetohidrazida (OSJ 123) .....	53
4.2.9	Sinteza <i>N</i> -(4-metil-1-(2-(2-(2-nitrofenil)acetil)hidrazinil)-1-oksopentan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamida (OSJ 23) .....	54
4.2.10	Sinteza 3H-indazol-3-karbohidrazida (OSJ 124).....	55
4.2.11	Sinteza <i>N</i> -(1-(2-(3a,7a-dihidro-3H-indazol-3-karbonil)hidrazinil)-4-metil-1-oksopentan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamida (OSJ 24) .....	56
4.2.12	Sinteza kinazolin-2,4(1H,3H)-diona (OSJ 48).....	58
4.2.13	Sinteza 2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidrokinazolin-7-sulfonilklorida (OSJ 58).....	58
4.2.14	Sinteza 2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidrokinazolin-7-sulfonohidrazida (OSJ 68(1)) .....	59
4.2.15	Sinteza <i>N</i> -(1-(2-(2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidrokinazolin-7-ilsulfonil)hidrazinil)-4-metil-1-oksopentan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamida (OSJ 81) .....	60
<b>5</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA .....</b>	<b>62</b>
5.1	RAZPRAVA O SINTEZAH SPOJIN .....	62
5.1.1	Zaščita amino skupine L-levcina (OSJ 6).....	62
5.1.2	Zaščita karboksilne skupine L-levcina (OSJ 3) in njena odstranitev (OSJ 10).....	63
5.1.3	Sinteza hidrazidov .....	64
5.1.4	Tvorba amidne vezi z reagentoma EDC in Hobt .....	64
5.1.5	Odstranitev terc-butiloksikarbonilne (BOC) zaščite (OSJ 34).....	66
5.1.6	Sinteza kinazolin-2,4(1H, 3H)-diona (OSJ 48).....	67
5.1.7	Priprava aromatskih sulfonilkloridov (OSJ 46 in OSJ 58).....	68
5.1.8	Pripenjanje različnih substituentov na prostoaminsko skupino .....	69
5.2	PREGLED SINTETIZIRANIH KONČNIH SPOJIN .....	69
5.3	REZULTATI BIOKEMIJSKEGA TESTIRANJA SPOJIN .....	71
<b>6</b>	<b>SKLEP .....</b>	<b>74</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURA .....</b>	<b>75</b>

## POVZETEK

Nagel pojav bakterijskih sevov, rezistentnih na večino antibiotikov, ki so trenutno na tržišču, predstavlja resen problem pri zdravljenju mikrobnih infekcij. Zato je nujno iskanje novih protimikrobnih učinkovin, ki bi bile usmerjene na nova tarčna mesta v bakterijski celici. Ena najpomembnejših razlik, ki loči bakterijsko celico od človeške, je njena toga in mehansko zelo odporna celična stena, katere glavni gradnik je makromolekula peptidoglikana. Ker ima le-ta edinstveno zgradbo, predstavlja idealno tarčo za razvoj novih protimikrobnih učinkovin. Večina znanih protibakterijskih učinkovin zavira sintezo peptidoglikana v poznejših stopnjah. Zgodnejše stopnje njegove biosinteze, kjer med drugim sodelujejo encimi Mur-ligaze, pa predstavljajo enega izmed novejših, v veliki meri še neizkoriščenih možnosti zaviranja mikroorganizmov.

V okviru diplomskega dela smo na podlagi spojine vodnice *N*-(4-metil-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksopentan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamida, ki se je izkazala kot inhibitor MurC, sintetizirali deset potencialnih inhibitorjev encimov Mur. Z modifikacijo spojine vodnice smo po dveh različnih poteh pripravili seriji dveh tipov spojin z ohranjenim osnovnim levcinhidrazidnim skeletom.

Šestim končnim spojinam smo izmerili inhibitorno aktivnost na encim MurC. Pri tem so se tri spojine izkazale kot šibki inhibitorji tega encima. Čeprav spojina vodnica ne izkazuje nobene inhibitorne aktivnosti na encim MurD, smo vseh deset končnih spojin testirali tudi na ta encim. Nobena od sintetiziranih spojin se ni izkazala kot učinkovit inhibitor encima MurD.

Rezultati naših raziskav širijo znanje na področju sintezne kemije in usmerjajo nadaljnji razvoj na področju odkrivanja novih protimikrobnih učinkovin.

## ABSTRACT

The fast spreading of bacterial strains that are resistant to the variety of antibiotics currently available on the market, presents a serious problem in treating microbial infections. This situation has generated an urgent need for the development of new antimicrobial agents active against previously unexplored targets in bacterial cell. One of the most important difference that distinguish the bacterial cell from the human cell is its thick and mechanically very rigid cell wall and the macromolecule of peptidoglycan as its key component. Because of its unique structure peptidoglycane is an ideal target for development of new antimicrobial agents. Most of known antibacterial agents inhibit synthesis of peptidoglycan in later steps. The early steps of the biosynthesis of peptidoglycan precursor catalyzed by a series of Mur enzymes represents one of the newer, still unexploited targets of new antibiotics.

In our work based on chosen lead compound *N*-(4-methyl-1-(2-(naftalene-2-ylsulfonyl)hidrazynil)-1-oxopentan-2-yl)-3-nitrobenzensulfonamide, which is an inhibitor of MurC, we synthesized ten novel potential inhibitors of Mur enzymes. Using structural modifications of the lead and two different synthesing routes we have prepared two types of compounds. All of these compounds have leucinhydrazide moiety.

The ability to inhibit MurC was measured for six synthesized compounds. The results demonstrate weak inhibitory activity for three compounds. Although the lead compound did not show any inhibitory activity towards MurD, we tested them anyway, but none of the substances were active.

The results of our study broaden the knowledge in the field of synthetic chemistry and direct further development of new antimicrobial drugs.

**SEZNAM OKRAJŠAV**

ADP	adenozindifosfat
AMPPNP	nehidrolizirajoči analog ATP
ATP	adenozintrifosfat
BOC	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
(BOC) <sub>2</sub> O	di- <i>tert</i> -butildikarbonat
CDCl <sub>3</sub>	devteriran kloroform
d	dublet (NMR)
dd	dublet dubleta (NMR)
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EI	elektronska ionizacija (electron ionisation) (MS)
ESI	elektrosprej ionizacija (Electron Spray Ionization) (MS)
Et <sub>3</sub> N	trietilamin
EtOAc	etilacetat
EtOH	etanol
FAB	metoda ionizacije z obstreljevanjem s pospešenimi atomi (fast atom bombardment) (MS)
GlcNAc	N-acetilglukozamin
Hobt	1-hidroksibenzotriazol hidrat
IR	infrardeča spektroskopija
IC <sub>50</sub>	srednja inhibitorna koncentracija
J	sklopitvena konstanta (NMR)
M	molekulska masa
m	multiplet (NMR)
Mf	mobilna faza
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	na meticilin odporni <i>Staphylococcus aureus</i>
MurA	UDP-N-acetilglukozamin enolpiruvat-transferaza
MurB	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: diaminopimelinat-ligaza	mezo-
MurF	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-mezo- diaminopimelinat D-alanin-D-alanin-ligaza	
MurG	N-acetilglukozamin-transferaza	
MurNAc	N-acetilmuraminska kislina	
MS	masna spektrometrija	
NADPH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata	
NMM	N-metilmorfolin	
NMR	jedrska magnetna resonanca	
P <sub>i</sub>	anorganski fosfat	
PRSP	na penicilin odporni <i>Staphylococcus pneumoniae</i>	
RA	rezidualna aktivnost	
Rf	retencijski faktor	
s	singlet (NMR)	
THF	tetrahidrofuran	
TLC	tankoplastna kromatografija	
UDP	uridindifosfat	
UDP-GlcNAc	UDP-N-acetilglukozamin	
UDP-GlcNAc-EP	UDP-N-acetilglukozamin enolpiruvat	
UDP-MurNAc	UDP-N-acetilmuraminska kislina	
UMP	uridinmonofosfat	
UMA	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin	
VRE	na vankomicin odporna <i>Enterococcus faecium</i> in <i>faecalis</i>	
VRSA	na vankomicin odporni <i>Staphylococcus aureus</i>	

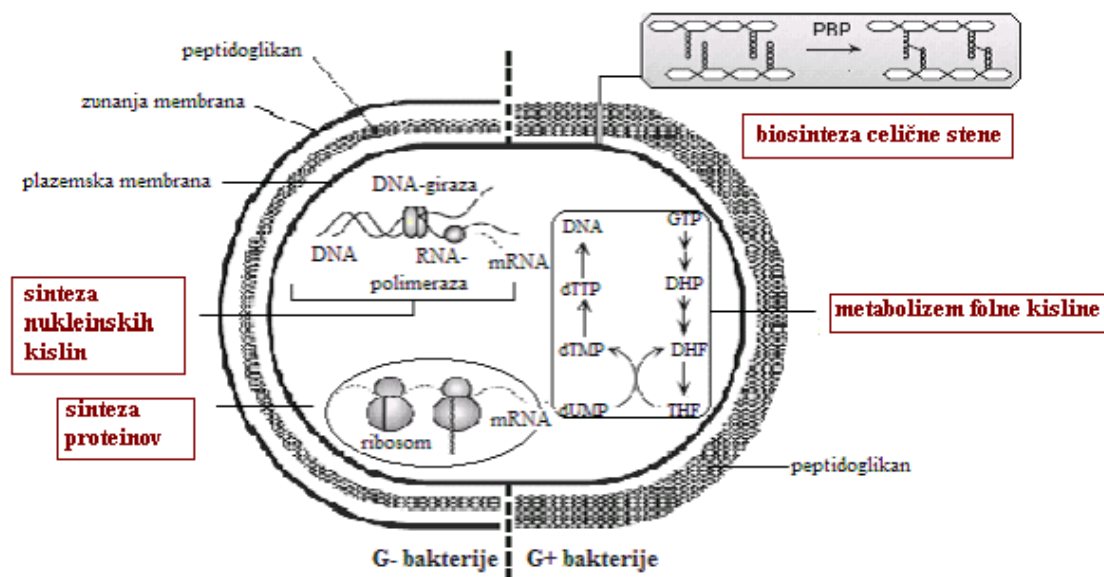
# 1 UVOD

## 1.1 Protimikrobne učinkovine in njihov mehanizem delovanja

Antibiotiki so sekundarni metaboliti različnih vrst mikroorganizmov (bakterij, gliv, alg), ki v majhnih odmerkih inhibirajo rast in razvoj mikroorganizmov, na evkariontskega gostitelja pa nimajo resnejšega toksičnega vpliva. Delujejo na dva načina, tako da preprečijo rast (bakteriostatično delovanje) ali povzročijo smrt (baktericidno delovanje) mikroorganizmov. V širšem pomenu mednje štejemo tudi polysintezne derivate, ki jih dobimo s farmacevtsko-kemijsko modifikacijo naravnih antibiotikov. Spojine popolnoma sinteznega izvora, kot so sulfonamidi in kinoloni pa uvrščamo med kemoterapevtike (1,2).

Protimikrobne učinkovine ponavadi delimo glede na njihovo kemijsko strukturo in mehanizem delovanja. Najpomembnejši razredi inhibirajo štiri tarčna mesta bakterijske celice (slika 1):

- biosintezo celične stene ( $\beta$ -laktamski in glikopeptidni antibiotiki, vankomicin, fosfomicin)
- sintezo proteinov (makrolidi, tetraciklini, aminoglikozidi, kloramfenikol)
- sintezo in metabolizem nukleinskih kislin (kinoloni, rifampicin)
- metabolizem folne kisline (sulfonamidi, trimetoprim) (1,3).



Slika 1: Glavna tarčna mesta delovanja protimikrobnih učinkovin

Z izjemo linezolida in daptomicina v zadnjih 30 letih ni bilo patentiranih in na tržišče uvedenih nobenih novih razredov protimikrobnih učinkovin, zato obstaja toliko večja potreba po novih protibakterijskih učinkovinah. Visoka učinkovitost, dobre farmakokinetične lastnosti, majhna toksičnost, delovanje na več različnih tarč in majhna možnost za razvoj rezistence so lastnosti, ki naj bi jih imela idealna protibakterijska učinkovina (4,6).

## 1.2 Razvoj rezistence na protimikrobne učinkovine

Čeprav so bile infekcijske bolezni glavni vzrok smrti na začetku prejšnjega stoletja, je odkritje in razvoj protimikrobnih učinkovin od leta 1930 revolucionarno spremenilo zdravljenje mikrobnih okužb (3). Obolevnost in predvsem smrtnost zaradi infekcijskih bolezni, sta se drastično zmanjšala, hkrati pa je prekomerna uporaba protimikrobnih učinkovin povzročila močan selektivni pritisk na obstoječe mikroorganizme. Preživele so le najbolj odporne bakterije, ki so sledile osnovnemu evolucijskem principu in se razmeroma hitro prilagodile novim spremembam v okolju. Njihov razmnoževalni cikel, ki traja približno 20 minut omogoča nastanek številnih generacij v samo nekaj urah in tako priložnost hitrega evolucijskega prilagajanja (3,5).

Zaradi selekcijskih procesov so bakterije razvile različne mehanizme odpornosti po enem ali več od naslednjih biokemijskih mehanizmov:

- proizvodnja encimov, ki razgradijo ali spremenijo protibakterijske učinkovine,
- sprememba permeabilnosti celične stene,
- zmanjšanje akumulacije antibiotika s črpanjem le-tega iz celice s pomočjo membranskih črpalk ali zmanjšan privzem protibakterijskih snovi v celico zaradi inhibicije tvorbe porinov in s tem zmanjšanega vnosa hidrofilnih antibiotikov,
- sprememba vezavnega mesta za protibakterijsko učinkovino na tarčnem proteinu, tako da se zmanjša afiniteta za antibiotik ali pa se poveča število receptorskih molekul,
- sprememba presnovne poti (3).

Rezistenco lahko glede na izvor delimo na genetsko ali negenetsko. Genetske osnove rezistence predstavljajo kromosomske determinante, mutacije (insercije, delecije, inverzije, duplikacije) in izvenkromosomske determinante - plazmidi. Konjugacija,



transdukcija in transformacija so trije načini, po katerih lahko poteka prenos genetskega materiala oz. rezistentnih genov (1).

Rezistenca na antibiotike je lahko intrinzična (naravna), ki se razvije pred izpostavitvijo učinkovini, ali ekstrinzična, ki nastane kot posledica izpostavitve učinkovini (1). Pri *Pseudomonas aeruginosa* njena majhna permeabilnost celične stene predstavlja glavni razlog intrinzične rezistence na več antibiotikov. Ekstrinzično rezistenco največkrat povzročijo plazmidi in transpozoni ali pa je le-ta posledica kromosomskih mutacij (3).

Poznamo več patogenih mikroorganizmov, ki so skoraj popolnoma rezistentni na antibiotike, na meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), na vankomicin rezistentna *Enterococcus faecium* in *faecalis* (VRE), na vankomicin rezistentni *Staphylococcus aureus* (VRSA), na karbapenem rezistentna *Actinobacter baumannii* in *Pseudomonas aeruginosa* ter na penicilin in makrolidne antibiotike rezistenten *Streptococcus pneumoniae* (6,7).

Prisotnost velikega števila bakterijskih sevov rezistentnih na antibiotike predstavlja resno grožnjo za človeško zdravje in kaže na to, da je pojav rezistence na pravzaprav vse znane protimikrobne učinkovine neizbežen proces in le vprašanje časa. Rezistenca na penicilin, ki se je v terapevtske namene začel uporabljati leta 1942, se je pojavila le nekaj let zatem, pri streptomycinu pa le eno leto po odkritju leta 1944. Izjema je bil vankomicin, pri katerem se je rezistenca pojavila skoraj 30 let po začetkih uporabe v terapiji, kar je posledica njegove omejene uporabe v prvih 25 letih, saj je veljal kot antibiotik zadnje izbire (3). To dokazuje resnost situacije in nam narekuje smotrno predpisovanje in uporabo antibiotikov (7). Raziskave namreč kažejo, da se več kot 50% antibiotikov uporablja za preventiven namen, zdravljenje in za različne namene pri živalih (3).

Pri reševanju problema rezistence je treba imeti v mislih dva vidika, zmanjšanje uporabe antibiotikov na eni strani in vzpodbujanje raziskovanja novih učinkovin, ki delujejo na še neraziskane tarče (8). Pri iskanju novih potencialnih tarč se je potrebno osredotočiti na bistvene razlike med bakterijsko in človeško celico, z namenom doseganja selektivne toksičnosti, ki je ključna lastnost dobrega antibiotika. Ena pomembnejših razlik, ki loči človeško celico od bakterijske, je makromolekula peptidoglikana, ki je značilna le za prokariotske organizme. Odkritih je bilo že veliko učinkovin, ki inhibirajo končne stopnje v biosintezi peptidoglikana, medtem ko zgodnejše stopnje v njegovi biosintezi, v katerih sodelujejo specifične Mur-ligaze predstavljajo enega izmed novejših, v veliki meri še neizkoriščenih prijemališč za razvoj novih antibiotikov (9).

### 1.3 Bakterijska celična stena

Bakterijska celična stena, ki obdaja citoplazmo, je zelo kompleksna makromolekularna struktura. Ta izredno rigidna, močno strukturirana in mehansko zelo močna plast je pomembna za ohranitev celične celovitosti in oblike. Med drugim ščiti celično vsebino pred spremembami osmotskega tlaka v okolju in pred encimi gostitelja ter sodeluje pri rasti in delitvi celice. Deluje pa tudi kot polprepustna membrana, ki omogoča privzem želenih snovi iz okolice.

Njena najpomembnejša struktura je peptidoglikan, ki ga sestavlja mreža linearnih polisaharidnih verig in ki s svojo trdnostjo zagotavlja preživetje celice v močno hipotoničnem okolju, v katerem bi sicer nabreknila in lizirala (12, 13, 14).

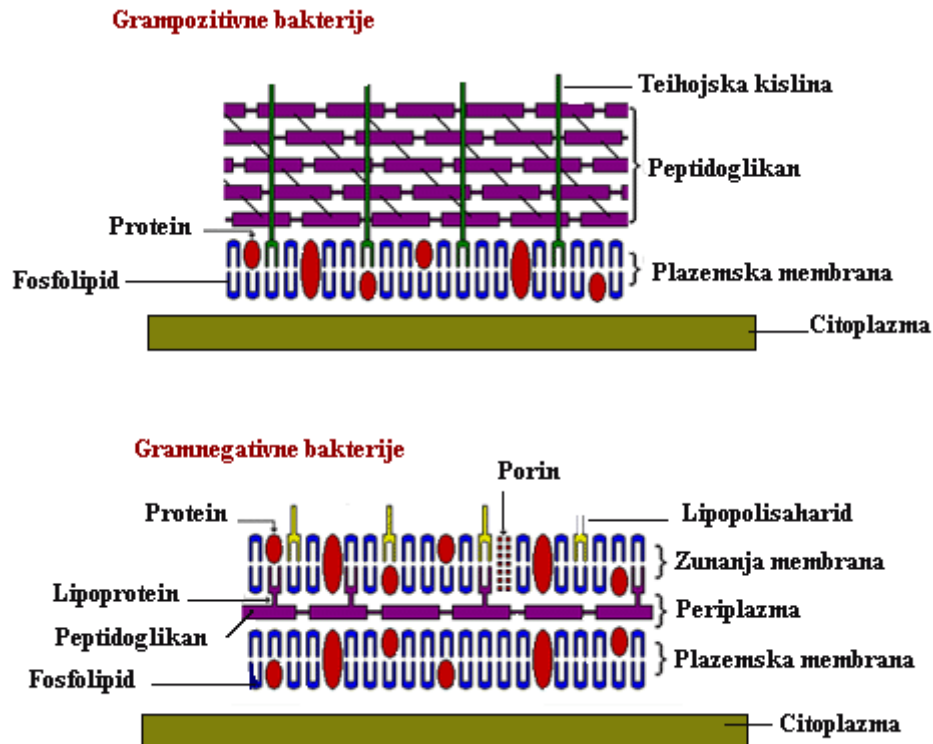
#### 1.3.1 Celična stena grampozitivnih in gramnegativnih bakterij

Čeprav je najpomembnejša struktura celične stene, tako pri grampozitivnih kot gramnegativnih bakterijah peptidoglikan, obstajajo velike razlike v njuni zgradbi (slika 2).

Celična stena grampozitivnih bakterij je po svoji strukturi preprostejša kot pri gramnegativnih bakterijah. Plazemsko membrano pri grampozitivnih bakterijah obdaja celična stena iz številnih peptidoglikanskih plasti, ki jih je lahko tudi do 40. Peptidoglikan po celi površini prebadajo anionski polimeri, kot sta teihojska in teihuronska kislina, ki predstavljata antigenski determinanti in sta na eni strani kovalentno povezani s plazemsko membrano, na drugi pa s peptidoglikanom. Teihojsko kislino kemijsko sestavljajo enote glicerol fosfata ali ribitol fosfata, teihuronsko pa enote heksuronske kisline. Obe kislini s svojimi fosfatnimi, hidroksilnimi in aminskimi skupinami predstavljata ionsko-izmenjevalni sistem, ki skrbi za dobavo  $Mg^{2+}$  ionov plazemski membrani, ti pa so pomembni za delovanje encimov v biosintezi peptidoglikana (1,12).

Pri gramnegativnih bakterijah je zgradba celične stene bolj kompleksna. Od citoplazemske membrane navzven vsebuje periplazemski prostor, ki vsebuje številne vezavne proteine. Nato sledi enoplasten peptidoglikan, ki ga obdaja čvrsta zunanja membrana. Ta je sestavljena iz fosfolipidnega dvosloja, proteinov, številnih encimov, transmembranskih proteinskih kanalčkov (porinov) in kompleksnih lipopolisaharidov, ki predstavljajo antigensko determinanto in so odgovorni za aktivacijo imunskega odgovora pri gostitelju. Prepustnost celične stene gramnegativnih bakterij je zaradi te zunanje

membrane močno zmanjšana, saj ne prepušča hidrofilnih nabitih molekul z molekulsko maso 600-900 in zelo lipofilnih spojin, kot so barvila, maščobne kisline, detergenti in tudi nekateri antibiotiki (1, 11).



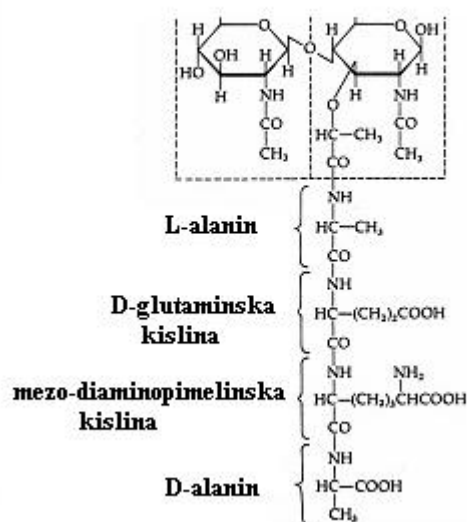
*Slika 2: Grobi strukturi celične stene grampozitivnih in gramnegativnih bakterij*

## 1.4 Peptidoglikan

### 1.4.1 Struktura peptidoglikana

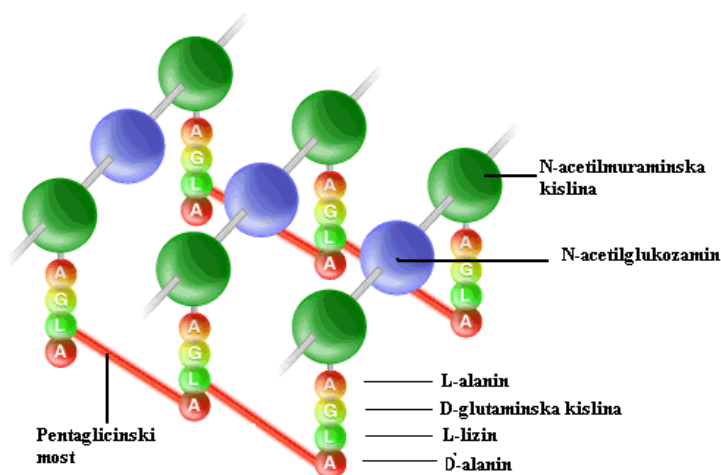
Peptidoglikan, ki obdaja citoplazemsko membrano skoraj vseh bakterij, je sestavljen iz linearnih polisaharidnih verig, glikanskih vlaken, ki so prečno povezane s kratkimi peptidnimi mostički. Glikanska vlakna sestavljajo izmenjujoče se sladkorne enote N-acetilglukoamina (GlcNAc) in N-acetilmuraminske kisline (MurNAc), med seboj povezane z 1,4- $\beta$  glikozidno vezjo. MurNAc, ki je derivat GlcNAc ima na C-3 atomu z etersko vezjo pripeto laktoilno skupino. Na karboksilno skupino vsakega ostanka muraminske kisline pa je s peptidno vezjo pripeta veriga štirih aminokislin, katerih zaporedje je največkrat sledeče: L-alanin-D-glutaminska kislina-mezo-diaminopimelinska kislina-D-alanin (slika 3). Peptidna vez se tvori direktno med prosto amino skupino aminokisline na tretjem mestu ene glikanske verige in karboksilno skupino D-alanina na četrtem mestu sosednje verige in tvori mrežasto strukturo (slika 4) (13).

N-acetilglukoamin in N-acetilmuraminska kislina



Slika 3: Zgradba osnovne monomerne enote peptidoglikana gramnegativnih bakterij

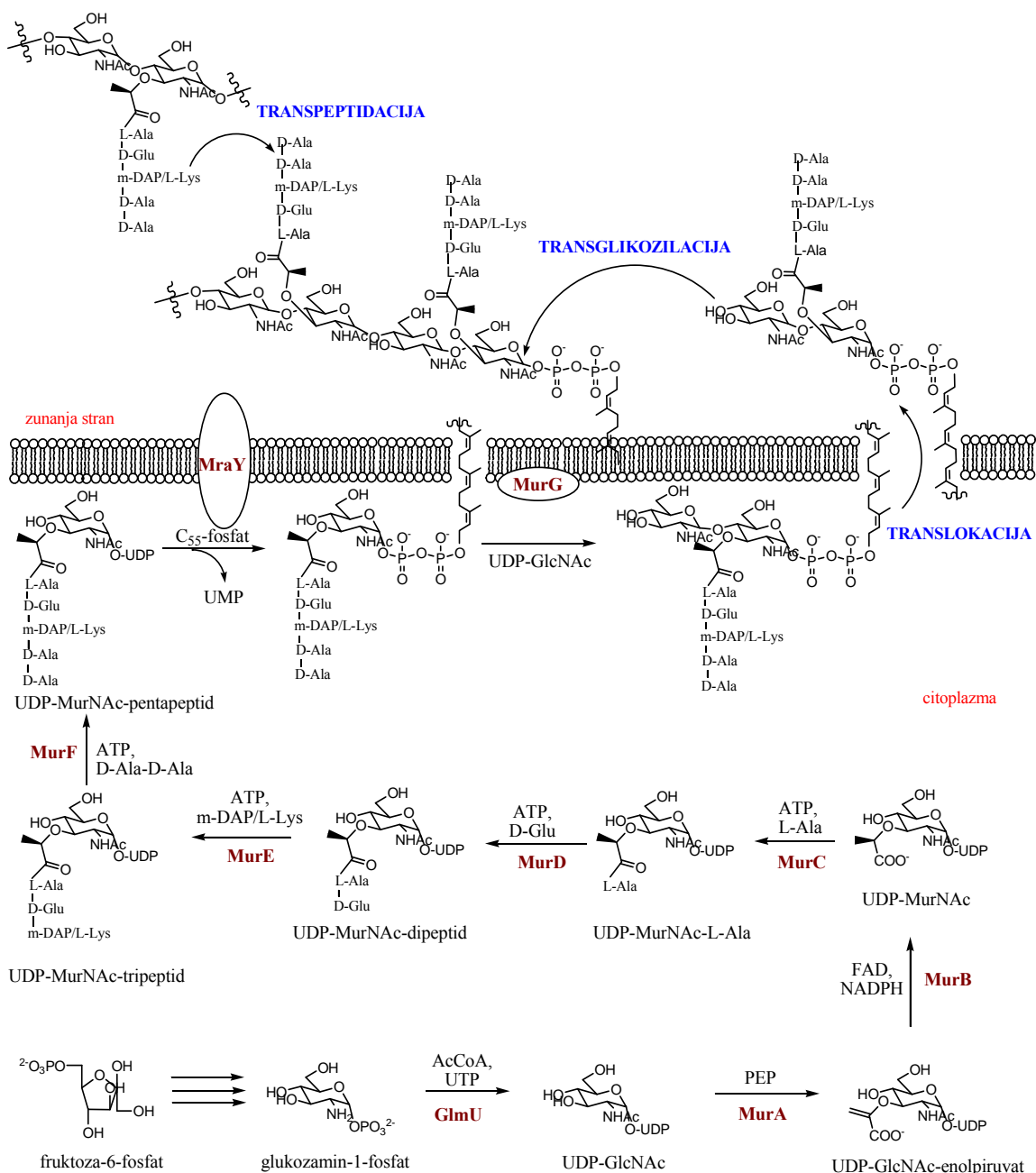
Podrobne raziskave peptidoglikana kažejo, da obstajajo določene razlike v zgradbi pri različnih bakterijskih vrstah. Različno je lahko število tetrapeptidnih verig, pri gramnegativnih bakterijah jih je samo 20%, medtem ko jih je pri grampozitivnih lahko več kot 90%. Mezo-diaminopimelinska kislina je najpogosteje zastopana aminokislina na tretjem mestu v peptidni verigi, a je pri nekaterih vrstah lahko zamenjana z L-lizinom, L-ornitinom, L-diaminobutanojsko kislino ali L-homoserinom. Pri grampozitivnih bakterijah povezuje glikanska vlakna pentaglicinski most, ki povezuje terminalno D-alanilno enoto ene verige z L-lizinom druge. Razlika je lahko tudi v D-glutaminskem fragmentu, kjer je lahko karboksilna skupina nesubstituirana ali v obliki amida, ter v sami muraminski kislini, ki je lahko na C-6 atomu acetilirana (12).



*Slika 4: Prečne povezave polimernih verig peptidoglikana pri grampozitivnih bakterijah*

### 1.4.2 Biosinteza peptidoglikana

Biosinteza peptidoglikana je večstopenjski proces, ki ga lahko v osnovi razdelimo na tri dele. V prvi stopnji se v citoplazmi sintetizirajo prekursorji, sledi prenos le teh do lipidnega nosilca, ki jih prenese čez celično membrano, v zadnji stopnji pa poteka prehod prekursorjev v celično steno in pritrditev na že obstoječi peptidoglikan (slika 5) (12).



Slika 5: Shematski prikaz posameznih stopenj biosinteze peptidoglikana

Prvi korak pri biosintezi peptidoglikana je nastanek GlcNAc v štirih stopnjah iz fruktoze-6-fosfata. Sledi sinteza MurNAc v dveh stopnjah, ki ju katalizirata encima MurA in MurB. Katalitični encim MurA veže enolpiruvat iz fosfoenolpiruvata na 3'-hidroksilno skupino UDP-GlcNAc, pri čemer nastane UDP-GlcNAc-EP, nakar sledi redukcija enola do laktoilne skupine z NADPH, kar katalizira encim MurB(10, 12).

Istočasno poteka biosinteza D-aminokislin in sicer po dveh poteh: z racemizacijo  $\alpha$ -ogljikovega atoma L-aminokislina s pomočjo ustrezne aminokislinske racemaze ali s stereoselektivno redukcijo  $\beta$ -keto kisline. Tako nastanejo D- alanin, D-glutaminska kislina in mezo-diaminopimelinska kislina (12).

Končni citoplazemski prekursor MurNAc-pentapeptid nastane tako, da se na prosto karboksilno skupino laktilnega etra MurNAc preko amidne vezi veže skupina petih aminokislin, in to s pomočjo sintetaz, ki kot vir energije uporabljajo ATP. Encimi MurC, MurD in MurE omogočajo vezavo aminokislin v sledečem zaporedju: L-alanin, D-glutaminska kislina in mezo-diaminopimelinska kislina. Preostala dva D-alaninska ostanka pa se dodata kot dipeptid v reakciji, ki jo katalizira MurF (10,12).

Naslednja stopnja, t.i. krog lipidnega nosilca poteka na citoplazemski membrani. Nastali UDP-MurNAc-pentapeptid se najprej poveže s fosforiliranim lipidnim nosilcem (undekaprenolfosfatom, ki je sestavljen iz 55 C-atomov) in ga imenujemo Lipid I. Reakcijo, pri kateri se sprosti UMP, katalizira membranski encim MraY. Na Lipid I se nato pripne še GlcNAc s pomočjo encima MurG in nastane struktura imenovana Lipid II. Z 1,4- $\beta$  glikozidno vezjo povezan disaharid pentapeptid se nato prenese na zunanjo stran citoplazemske membrane, kar imenujemo translokacija (10,11).

Na zunanji strani citoplazemske membrane se začne vgradnja osnovnega gradnika v že obstoječi peptidoglikan, tako da se tvorijo glikozidne povezave med disaharidnimi enotami - transglikozilacija, pri čemer nastanejo daljša glikanska vlakna. Ena molekula lipidnega nosilca se pri tem regenerira v obliki pirofosfata, nato pa se še defosforilira s pomočjo encima undekaprenil pirofosfat-fosfataze.

Transpeptidacija oz. prečno povezovanje peptidnih verig na sosednjih glikanskih vlaknih poteče v zadnji stopnji. Pri tem sodelujejo encimi transpeptidaze, ki se najprej vežejo na D-alanin-D-alaninsko enoto pentapeptida in nato odcepijo terminalni D-alanin. Energija, ki se pri tem sprosti se porabi za tvorbo peptidne vezi, ki nastane med karboksilno skupino preostalega alanina in končno amino skupino mezo-

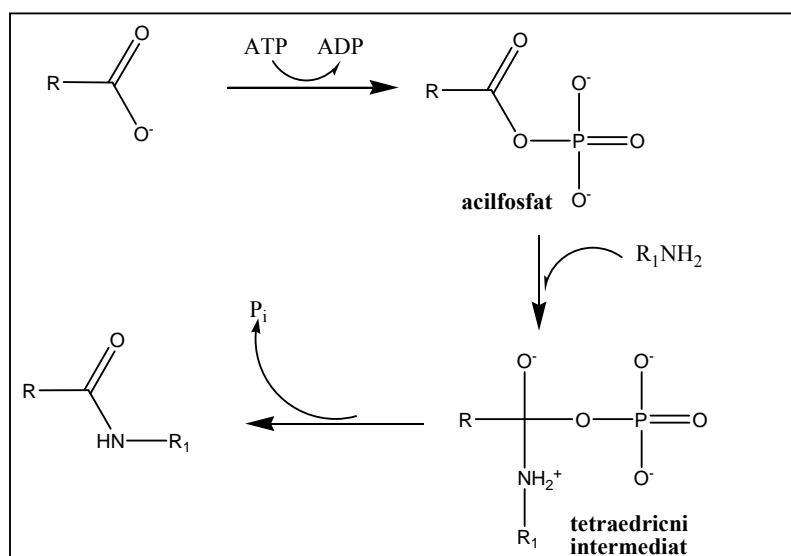
diaminopimelinske kisline ali pentaglicinskim mostom sosednje glikanske verige, tako da poteče premreženje (10).

Poznavanje posameznih biokemijskih mehanizmov večstopenjskega procesa biosinteze peptidoglikana je osnova za načrtovanje in sintezo novih in učinkovitih protibakterijskih učinkovin (12).

## 1.5 Mur-ligaze

Številne študije so pokazale, da so Mur-ligazam skupne tri značilnosti (14):

1. Spadajo v isto naddružino encimov, saj imajo podobno sekvenco aminokislin in so evolucijsko sorodne (12, 14).
2. Delujejo po podobnem encimskem mehanizmu (slika 6), tako da aktivirajo prosto karboksilno skupino UDP prekursorja z  $\gamma$ -fosfatno skupino ATP in tvorijo s tem ADP ter acilfosfatni intermediat. Tega nukleofilno napade aminska skupina pripenjajoče se aminokisline ali dipeptida, pri čemer nastane fosforiliran tetraedrični intermediat. Po odcepitvi anorganskega fosfata (Pi) nastane nova peptidna vez (10,12,14).



*Slika 6: Mehanizem nastanka peptidne vezi preko tetraedričnega intermediata*

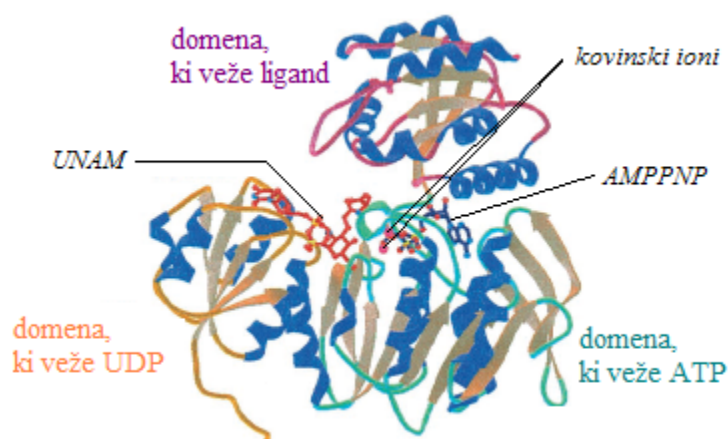
3. Mur encimi so sestavljeni iz treh domen, pri čemer je N-terminalna domena odgovorna za vezavo UDP-prekursorja, centralna za vezavo ATP in C-terminalna za vezavo aminokisline ali dipeptida. Obstajajo v odprti ali zaprti konformaciji in imajo podobno 3D kristalno strukturo (14).



### 1.5.1 Ligaza MurC

MurC je 50 kDaltonov velik protein, ki katalizira pripenjanje prve aminokislina, to je največkrat L-alanin, redkeje glicin ali L-serin, na peptidno verigo(14).

Kristalna struktura ligaze MurC je znana in so jo določili pri bakterijah *Haemophilus influenzae*, *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli* (slika 7) (14). Encim je sestavljen iz treh domen. N-terminalna je sestavljena iz 5 centralnih paralelnih  $\beta$ -struktur, ki jo obdajajo 4  $\alpha$ -vijačnice in vsebuje dinukleotidni vezavni zavo, t.j. Rossmanovo zvitje. Ta domena veže nukleotidni del substrata UDP-MurNAc z zanko, ki vsebuje veliko glicinov in tvori povezave s fosfatnima skupinama UDP. Centralna domena tvori interakcije s purinskim obročem adenina in fosfatnimi skupinami ATP. Je največja in ima na sredini 7 paralelnih  $\beta$ -struktur, okrog njih pa je razporejenih 5  $\alpha$ -vijačnih fragmentov in 3 antiparalelne  $\beta$ -strukture. C-terminalna domena je sestavljena iz 5 paralelnih in 1 antiparalelne  $\beta$ -strukture, obdaja pa jih 5  $\alpha$ -vijačnic. Prav tako vsebuje Rossmanovo zvitje. Aminokislinski ostanki te domene so ključni za interakcije, ki omogočajo orientacijo in pravilno lego liganda (L-alanina) in rastoče verige peptidoglikana (9, 10, 15).



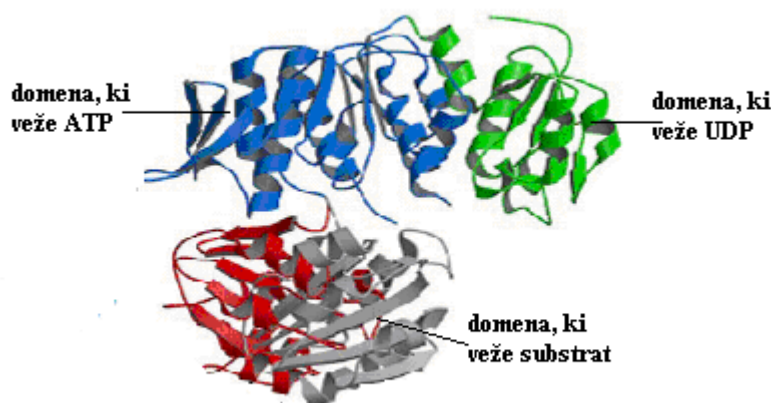
*Slika 7: Prostorska struktura encima MurC v kompleksu z UNAM, AMPPNP in kovinskimi ioni*

### 1.5.2 Ligaza MurD

MurD je 47 kDaltonov velik protein, ki pripenja D-glutaminsko kislino na novo nastajajoči citoplazemski prekurzor peptidoglikana (15).

Kristalna struktura MurD (slika 8) iz *E. coli* v kompleksu z UDP-MurNAc-L-Ala je bila prva opisana kristalna struktura kateregakoli encima iz družine Mur sintetaz. Encim je sestavljen iz treh globularnih domen. N- in C- terminalna domena vsebujeta dinukleotidno vezavno področje, t.j. Rossmanovo zvitje, centralna pa mononuleotidno vezavno področje (16). N-terminalna domena je sestavljena iz petih paralelnih  $\beta$ -struktur, ki jo obdajajo 4  $\alpha$ -vijačnice. Centralna domena je sestavljena iz šestih paralelnih  $\beta$ -struktur, ki jih obdaja 7  $\alpha$ -vijačnic, in tri majhne antiparalelne  $\beta$ -strukture. C-terminalna domena pa je iz šestih  $\beta$ -struktur, ki so sestavljene iz 5 paralelnih verig in 1 antiparalelne verige, obdanih z 5  $\alpha$ -vijačnicami (17,18).

MurD ligaza za svoje delovanje potrebuje dva magnezijeva iona, pri tem je eden pomemben za vezavo ATP, drugi pa za nastanek acilfosfatnega intermediata (14).

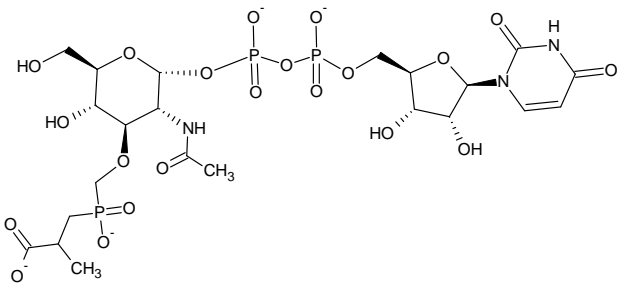
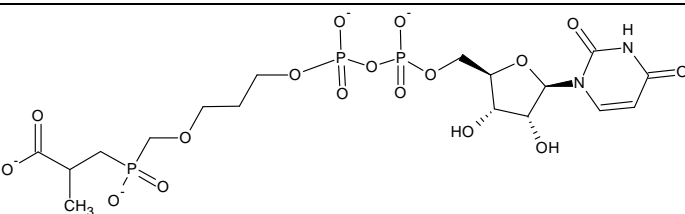


*Slika 8: Prostorska struktura encima MurD*

### 1.5.3 Inhibitorji encima MurC

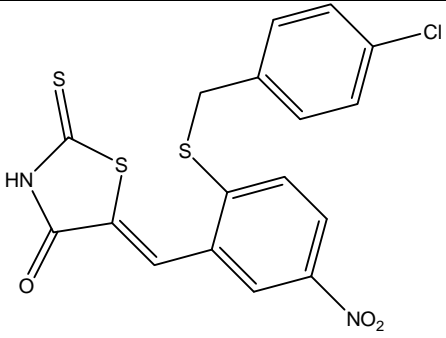
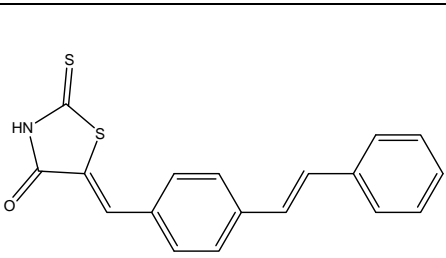
Najbolj učinkoviti in razširjeni inhibitorji aminokislinske ligaze MurC so fosfinatni inhibitorji, ki so derivati fosfinske kisline. Te spojine se v aktivnem mestu s pomočjo ATP fosforilirajo, nastane fosforil fosfinatna struktura, ki zelo dobro oponaša tetraedrično prehodno stanje, ki nastane pri normalnem procesu tvorbe peptidne vezi (19).

Prvi izredno učinkovit objavljen inhibitor encima MurC (*E. coli*) je fosfinatni analog prehodnega stanja z  $IC_{50} = 49$  nM, ki je bil tudi biološko ovrednoten (spojina **1**), (preglednica I)(20). Ugotovili so, da kakršnakoli strukturna modifikacija tega inhibitorja značilno zmanjša inhibitorno aktivnost. Tako zamenjava sladkornega dela s fleksibilnim 1,3-propandiolnim vmesnikom zmanjša inhibitorno aktivnost za več kot 1000 krat (spojina **2**) (preglednica I) (9).

<b><u>1</u></b>		<b><math>IC_{50} = 49</math> nM (MurC)</b>
<b><u>2</u></b>		<b><math>IC_{50} = 60</math> <math>\mu</math>M (MurC)</b>

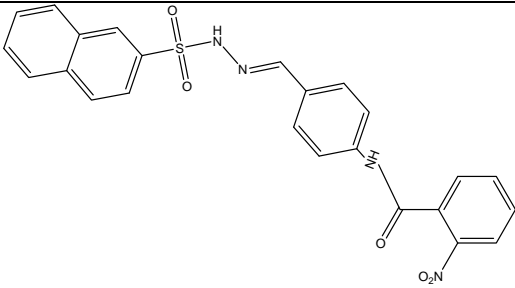
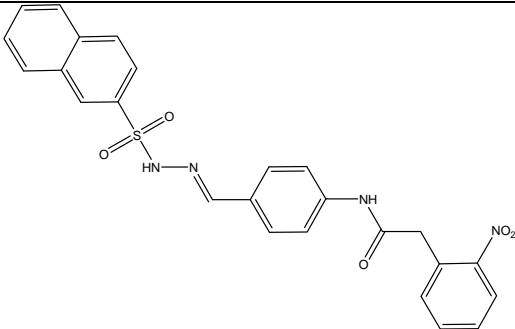
**Preglednica I:** Fosfinatni inhibitorji encima MurC

Benziliden rodanini so nizkomolekularne nepeptidne spojine, ki prav tako inhibirajo MurC (spojini **3** in **4**) (preglednica II). Na podlagi sinteze več analogov so ugotovili, da je za inhibitorno delovanje nujno potrebna prosta NH skupina, ki tvori vodikove vezi v aktivnem mestu MurC. Analoge so testirali na bakterijskih celicah in ugotovili, da nekatere spojine iz vrste benziliden rodaninov inhibirajo grampozitivni na meticilin rezistentni *S. aureus* (MRSA), nobena pa ni bila aktivna proti gramnegativni *E. coli*. Določeni analogi so citotoksični za CHO (Chinese hamster ovary) celice (21).

<b><u>3</u></b>		<b>IC<sub>50</sub> = 27 μM (MurC)</b>
<b><u>4</u></b>		<b>IC<sub>50</sub> = 18 μM (MurC)</b>

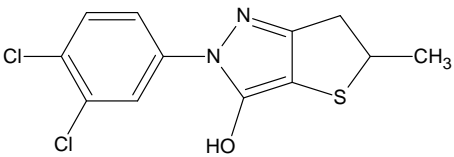
**Preglednica II:** Inhibitorja encima MurC z benzilidenrodaninsko strukturo

Benziliden rodanina **3** in **4**, ki izkazujeta dobro inhibitorno aktivnost, sta služila kot spojini vodnici za nadaljnje kemijske modifikacije in sintezo spojin z *N*-benzilidensulfonhidrazidnim fragmentom. Najprej so osnovni rodaninski obroč (2-oksotiazolidin-4-on) zamenjali z acikličnim arilnim substituentom, pripetim na sulfonhidrazidni fragment. Ta še vedno vsebuje kislo NH skupino, ki se je izkazala kot nujno potrebna za inhibitorno delovanje pri benziliden rodaninih. Nadomestili so tudi *p*-klorobenziltio fragment z različnimi skupinami, da so dobili etre, sulfonate, karboksamide (spojini **5** in **6**) (preglednica III) in karbociklične estre, ki so se izkazali kot dobri inhibitorji MurC in MurD (22).

<u>5</u>		<b>IC<sub>50</sub> = 51 μM (MurC)</b>
<u>6</u>		<b>IC<sub>50</sub> = 27 μM (MurC)</b>

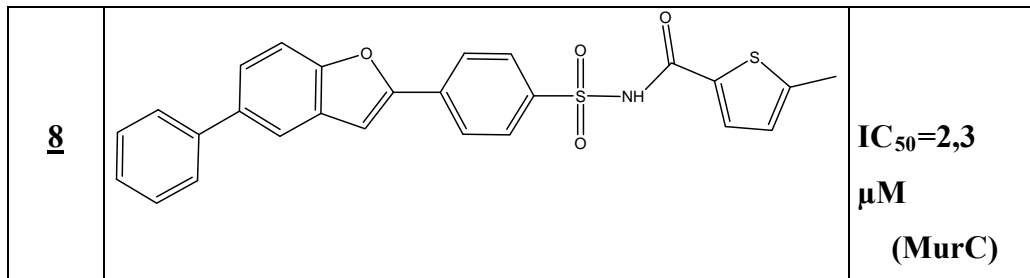
**Preglednica III:** Inhibitorja MurC in MurD z *N*-benzilidensulfonhidrazidnim fragmentom

Derivati 2-fenil-5,6-dihidro-2H-tieno[3,2-*c*]pirazol-3-ola kažejo dobro inhibitorno aktivnost proti *S. aureus* MurB, MurC (spojina 7 z IC<sub>50</sub> = 23,2 μM) (preglednica IV) in MurD ter dobro protimikrobno aktivnost proti grampozitivnim bakterijam, vključno z na meticilin rezistentni *S. aureus* (MRSA), na vankomicin rezistentnim enterokokom (VRE) in na penicilin rezistentnim *S. pneumoniae* (PRSP). Nobeden pa ni bil aktiven proti gramnegativnim bakterijam pri MIC < 32 μg/ml (23).

<u>7</u>		<b>IC<sub>50</sub> = 23,2 μM (MurC)</b>
----------	---	---

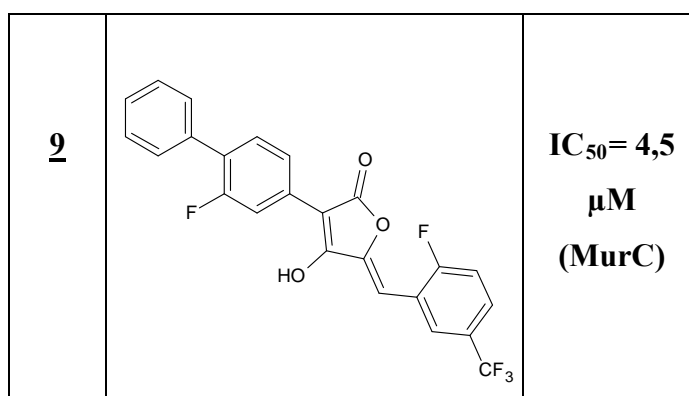
**Preglednica IV:** Derivati 2-fenil-5,6-dihidro-2H-tieno[3,2-*c*]pirazol-3-ola kot inhibitorji MurC

Tudi derivati benzofuran acil-sulfonamidov kompetitivno tekmujejo za ATP in UDP-MurNAc in kažejo dobro inhibitorno aktivnost na MurC. Spojina **8** ima  $IC_{50}=2,3 \mu\text{M}$ , ampak na žalost ima visoko afiniteto do vezave na plazemske proteine (preglednica V) (24).



*Preglednica V: Inhibitor encima MurC z benzofuran acilsulfonamidno strukturo*

Sintetiziranih je bilo več kot 180 pulvinonov, ki je pokazalo dobro inhibitorno aktivnost proti encimom MurA, MurB, MurC in MurD. Spojina **9** z  $IC_{50}=4,5 \mu\text{M}$  je dober inhibitor MurC, prav tako je aktivna proti grampozitivnim bakterijam, vključno z rezistentnimi sevi (preglednica VI) (25).

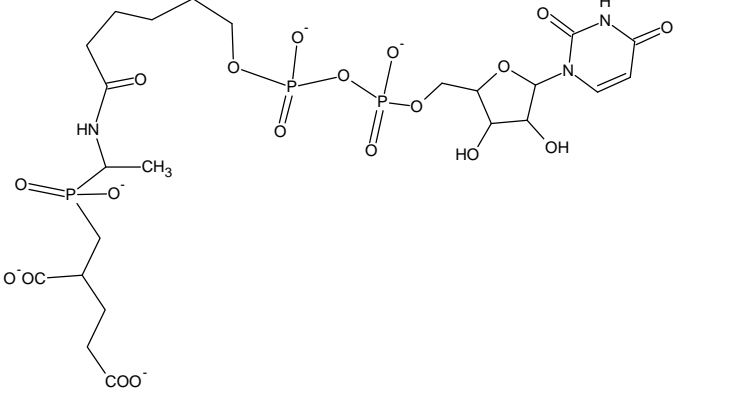
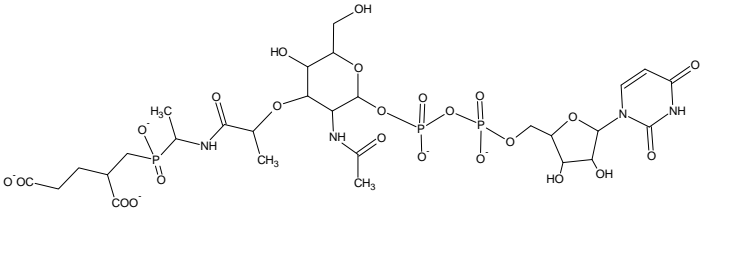


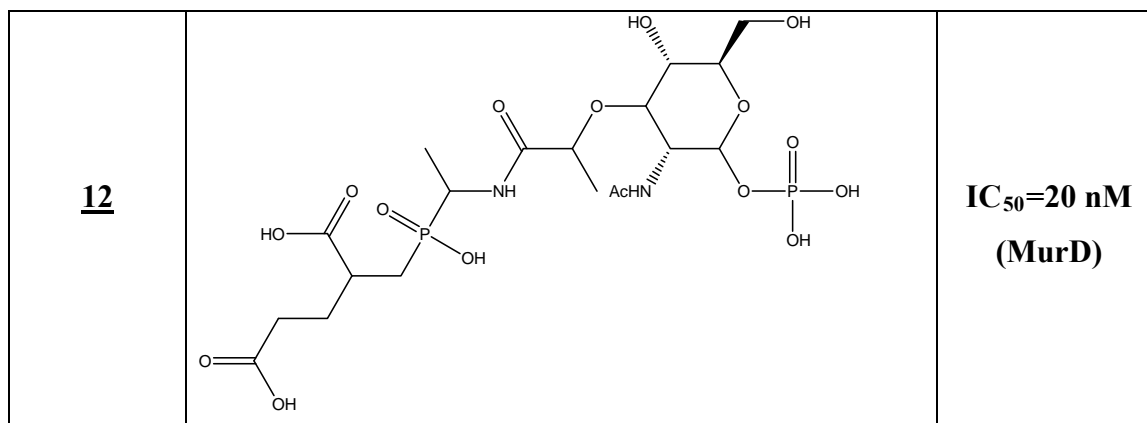
*Preglednica VI: Pulvinonski inhibitor encima MurC*

### 1.5.4 Inhibitorji encima MurD

MurD je prvi encim za katerega so pripravili fosfinatne inhibitorje (20). Prvi učinkovit inhibitor je bil poenostavljen mimetik tetraedičnega prehodnega stanja z  $IC_{50}=680$  nM (spojina **10**) (preglednica VII). Po vgraditvi N-muraminske kisline namesto hidrofobnega distančnika in omejitvi stereokemije konfiguracije  $\alpha$ -amino fosfinata se je znatno povečala učinkovitost mimetikov prehodnega stanja (spojina **11**) (preglednica VII).

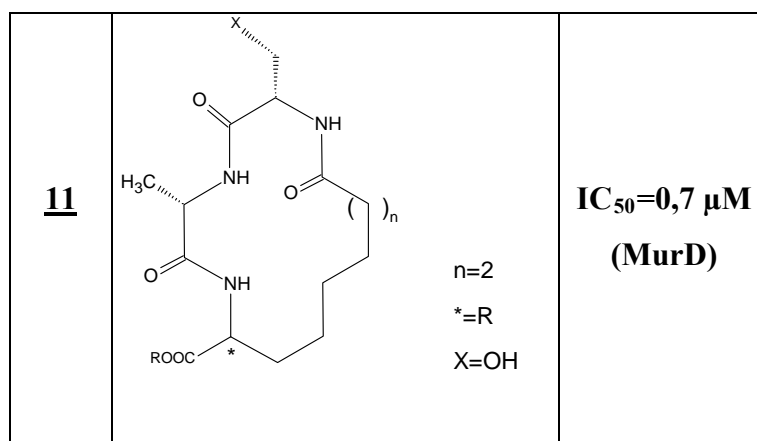
Prisotnost terminalne fosfatne skupine na anomerni OH skupini še poveča inhibitorno aktivnost učinkovine (spojina **12**) (preglednica VII). Kljub dobri inhibitorni aktivnosti, pa fosfinatni inhibitorji ne izkazujejo protibakterijskega delovanja (26).

<p><b><u>10</u></b></p>		<p><b><math>IC_{50}=680</math> nM (MurD)</b></p>
<p><b><u>11</u></b></p>		<p><b><math>IC_{50}&lt;1</math> nM (MurD)</b></p>



**Preglednica VII:** Fosfinatni inhibitorji encima MurD

Po odkritju kristalne strukture encima MurD so s pomočjo molekulskega modeliranja razvili nov razred makrocikličnih inhibitorjev. Ugotovili so, da je mogoče izpustiti precejšnji del sladkornega dela in obenem ohraniti inhibicijo (spojina **13**) (preglednica VIII) (27).



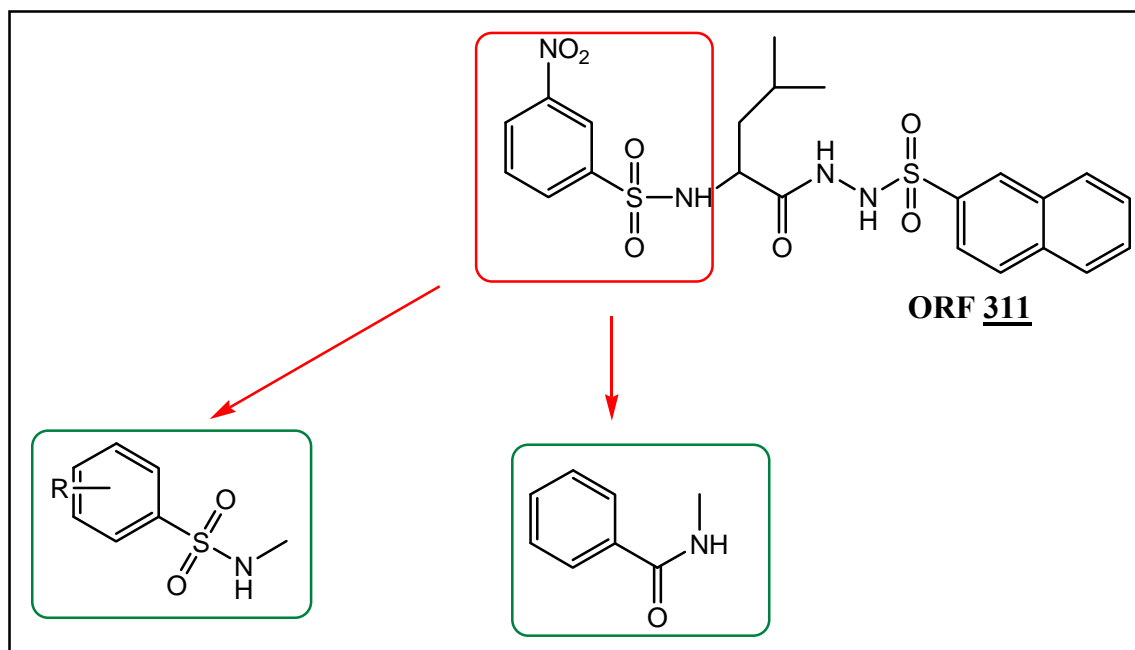
**Preglednica VIII:** Primer makrocikličnega inhibitorja MurD



## 2 NAČRT ZA DELO

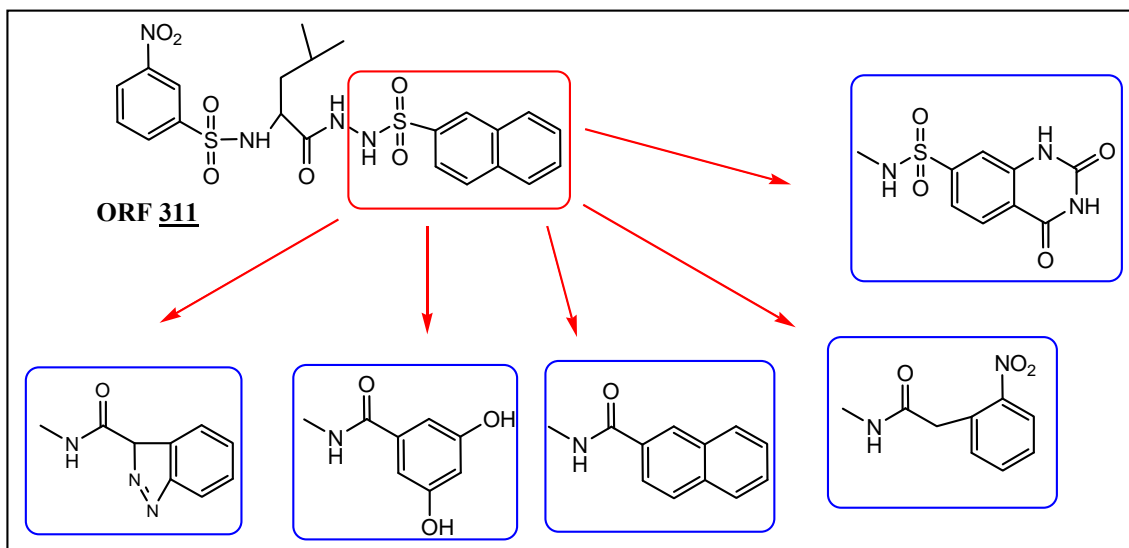
Z eksperimentalnim delom v okviru diplomske naloge želimo pripraviti več novih, potencialnih inhibitorjev encimov MurC in MurD. Pri načrtovanju naših spojin bomo kot spojino vodnico uporabili *N*-(4-metil-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksopentan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamid (**ORF 311**), ki ima v 250  $\mu\text{M}$  koncentraciji rezidualno aktivnost 43% ter  $\text{IC}_{50}$  okoli 245  $\mu\text{M}$ , kar kaže na dokaj dobro inhibitorno aktivnost na izoliranem MurC encimu. Čeprav spojina vodnica na encim MurD ne izkazuje nobene inhibitorne aktivnosti ( $\text{RA} = 100\%$ ), bomo naše končne spojine testirali tudi na ta encim. Pri testiranju na bakterijsko delovanje je spojina vodnica pokazala dobro učinkovitost predvsem na grampozitivni na meticilin rezistentni *S.aureus* (MRSA) z  $\text{MIC} = 128 \mu\text{g/ml}$ , medtem ko na *E.coli* ni imela delovanja.

V okviru naše diplomske naloge bomo spojino vodnico modificirali na obeh koncih molekule in tako pripravili različne analoge. 3-nitrofenilsulfonilni fragment bomo zamenjali z različnimi aromatskimi sulfonilkloridi in z benzoilkloridom (slika 9).



*Slika 9: Substitucija 3-nitrobenzensulfonylnega dela spojine vodnice*

Zamenjali pa bomo tudi naftalen-2-sulfonylni del z različnimi fragmenti (slika 10) in nato vsem novim spojinam *in vitro* določili inhibitorno aktivnost na MurC in MurD encimih z encimsko metodo biokemijskih testiranj. Tem spojinam bodo kasneje določili tudi protibakterijsko delovanje, vendar ne v sklopu naše diplomske naloge. Rezultati omenjenih testiranj bodo pripomogli k razumevanju strukturnih zahtev za učinkovanje na MurC in MurD encimih ter bodo usmerili nadaljnje raziskave na tem področju.

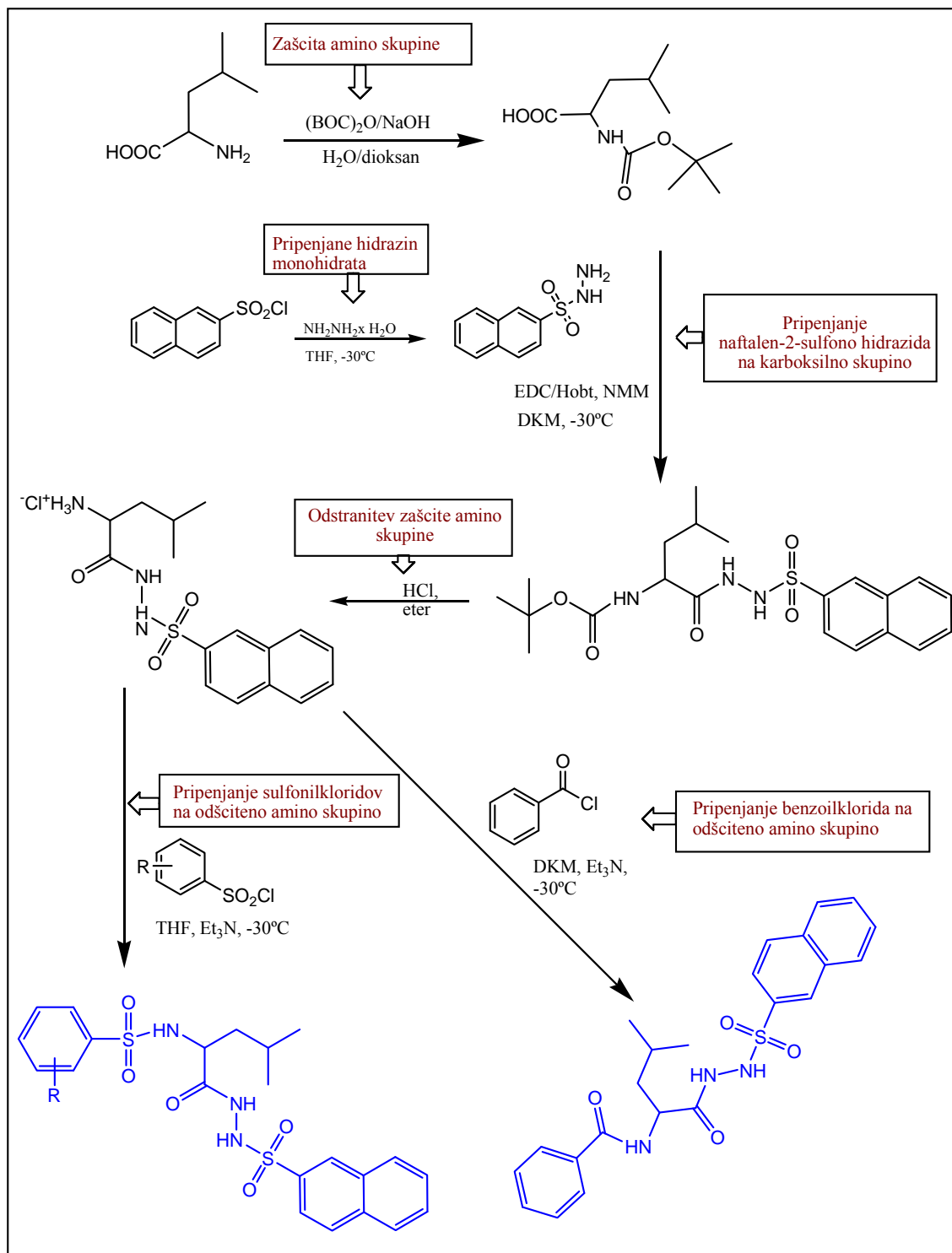


**Slika 10:** Substitucija naftalen-2-sulfonylnega fragmenta spojine vodnice

Sinteza spojin bo potekala po dveh različnih sinteznih poteh:

### 1. Prva sintezna pot

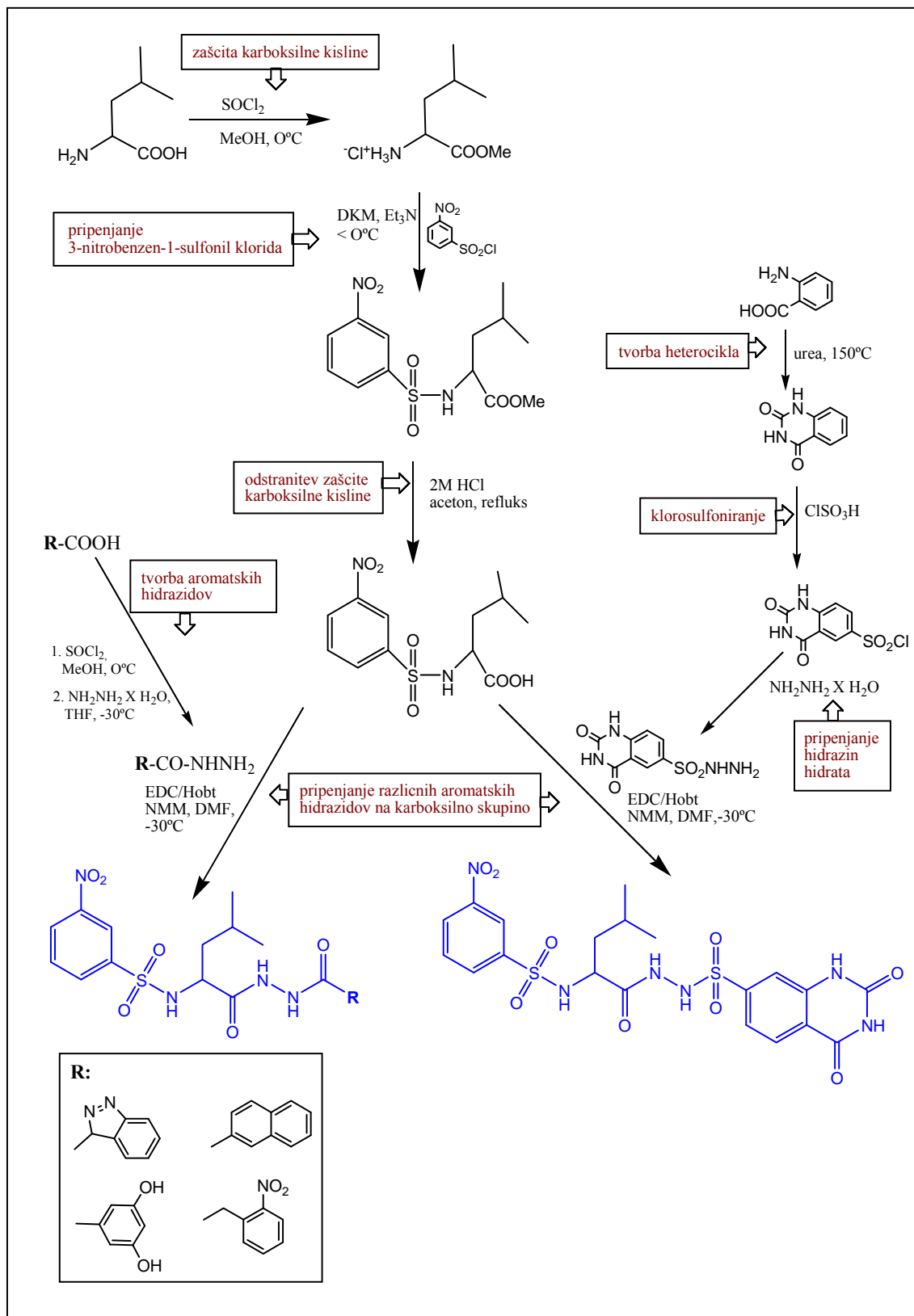
Kot izhodno spojino bomo vzeli L-levcin in najprej z  $(\text{BOC})_2\text{O}$  (di-*tert*-butildikarbonat) zaščitili prosto aminsko skupino. Iz naftalen-2-sulfonylklorida in hidrazin monohidrata bomo pripravili naftalen-2-sulfonylhidrazid kot pomemben sinton in ga pripeli na prosto karboksilno skupino L-levcina. Sledila bo odstranitev *tert*-butiloksikarbonilne zaščite v kislem z nasičeno HCl in uvajanje različnih aromatskih sulfonylkloridov ter benzoilklorida na odščiteni aminski skupini (slika 11).



Slika 11: Reakcijska shema prve sintezne poti

**2. Druga sintezna pot:**

Pri drugi sintezni poti bomo prav tako izhajali iz L-levcina in najprej zaščitili prosto karboksilno skupino s tvorbo metilnega estra. Sledilo bo pripenjanje 3-nitro-benzen-1-sulfonilklorida in tvorba sulfonamidne vezi. V naslednji stopnji bomo izvedli hidrolizo metilnega estra v kislem. Pripravili bomo tudi različne aromatske hidrazide kot pomembne sintone in jih nato pripeli na odščiteno karboksilno kislino. Pri tem bo prišlo do nastanka amidne vezi med prosto karboksilno kislino in amsko skupino aromatskih hidrazidov. Reakcija bo potekla s pomočjo EDC in Hobt (slika 12).



Slika 12: Reakcijska shema druge sintezne poti

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 Materiali

Pri delu smo uporabljali kemikalije in topila proizvajalcev Acros, Aldrich, Fluka, Merck in Kemika.

### 3.2 Metode

#### 3.2.1 Kromatografske metode

##### Tankoplastna kromatografija

Za tankoplastno kromatografijo (TLC) smo uporabljali plošče Kieselgel 60 F<sub>254</sub> izdelovalca Merck z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Uporabljene mobilne faze so navedene pri vsaki spojini posebej. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko ( $\lambda=254$  nm) in različne orositvene reagente, ki so prav tako navedeni za vsako spojino posebej.

##### Kolonska in flash kromatografija

Za kolonsko kromatografijo smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel z velikostjo 0,063-0,20 mm izdelovalca Merck in različne mobilne faze.

Za flash kromatografijo pa smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm izdelovalca Merck in različne mobilne faze.

#### 3.2.2 Spektroskopske metode

##### Jedrska magnetna resonanca (NMR)

<sup>1</sup>H NMR spektri so bili posneti z instrumentom Bruker Avance DPX<sub>300</sub> na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, ki deluje v okviru Centra za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti. Kot topilo smo uporabljali DMSO-d<sub>6</sub> in CDCl<sub>3</sub>. Spektri so bili posneti pri 300,12 MHz s TMS kot internim standardom pri temperaturi 302 K.

Spektre smo obdelali z računalniškim programom MestRe-C podjetja Mesterlab Research S.L.

#### Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti na spektrometru Varian-MAT 311 A z EI, ESI ali FAB tehniko na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Za nekatere spojine so bili posneti tudi HR-MS spektri kot nadomestek elementne analize spojin.

#### Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektri so bili posneti s spektrometrom Perkin Elmer 1600 FT-IR na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani.

#### Elementna analiza

Vsebnosti elementov C, H, N so bile izmerjene z analizatorjem Perkin Elmer 2400 CHN na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

Za določene spojine so bili namesto elementne analize posneti HR-MS spektri, ki nam prikažejo možno kombinacijo vsebnosti posameznega elementa v spojini glede na molekulsko maso.

### **3.2.3 Temperatura tališča**

Temperaturo tališča smo merili z Polytherm A Heintsch mikroskopom podjetja Wagner & Munz z grelno mizico.

### **3.2.4 Optična sučnost**

Optična sučnost spojin je bila izmerjena s polarimetrom na Fakulteti za farmacijo, na katedri za farmacevtsko kemijo. Izmerjena je bila pri valovni dolžini 589,3 nm in temperaturi 20°C.



### **3.2.5 Biokemijska testiranja**

Spojine, ki smo jih sintetizirali, so bile testirane na inhibitorno aktivnost na encimih MurC in MurD s testom z malahitnim zelenim. Test se izvaja na mikrotitrski ploščici s pripravljenimi raztopinami encima, substrata in testiranih spojin. Osnova testa je tvorba fosfomolibdatnega kompleksa med Pi, ki nastane pri hidrolizi ATP, in barvilom malahitnim zeleno. Kompleks lahko kvantificiramo spektrofotometrično pri 650 nm. 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.

Teste smo izvajali na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo v okviru projekta INTAFAR.

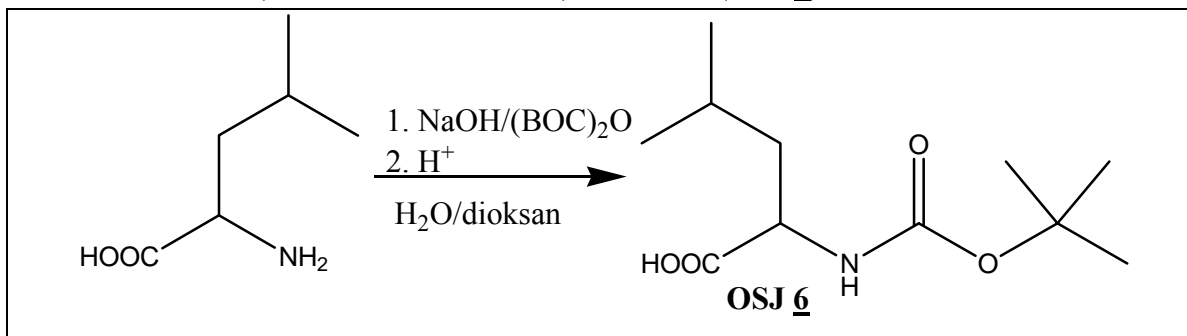
### **3.2.6 Nomenklatura in risanje spojin**

Pri poimenovanju spojin in risanju strukturnih formul smo uporabljali računalniški program ChemDraw, verzija 9.0, podjetja CambridgeSoft.

## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1 Prva sintezna pot

#### 4.1.1 Sinteza *N*-(*tert*-butiloksikarbonil) L-levcina (OSJ 6)

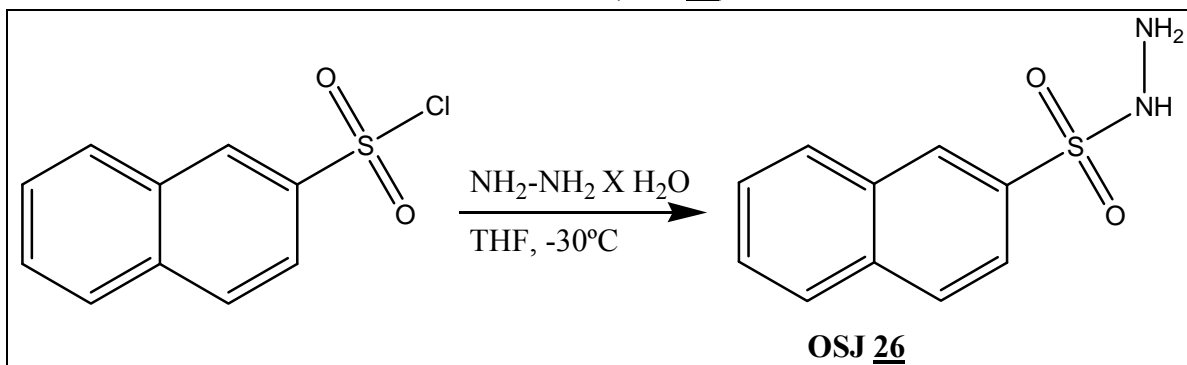


Spojino **OSJ 6** smo sintetizirali po postopku iz članka (28).

10,00 g (76,34 mmol) L-levcina smo suspendirali v 8 ml vode in 8 ml dioksana ter dodali 8 ml 1 M NaOH. Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli na približno 10°C in po kapljicah ob mešanju dodali v 8 ml dioksana raztopljenih 16,63 g (76,2 mmol) di-*tert*-butildikarbonata ((BOC)<sub>2</sub>O). Pri sobni temperaturi smo reakcijsko zmes mešali 2 uri in nato pod znižanim tlakom odparili dioksan. Zaostanku smo dodali 200 ml vode in z 1M HCl nakisali do pH 2. Pri tem je nastalo 14,19 g (61,35 mmol, 81%) bele oborine, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem.

$T_{\text{tališča}}$ : 80-83°C (v lit: 81-83°C)

#### 4.1.2 Sinteza naftalen-2-sulfonohidrazida (OSJ 26)



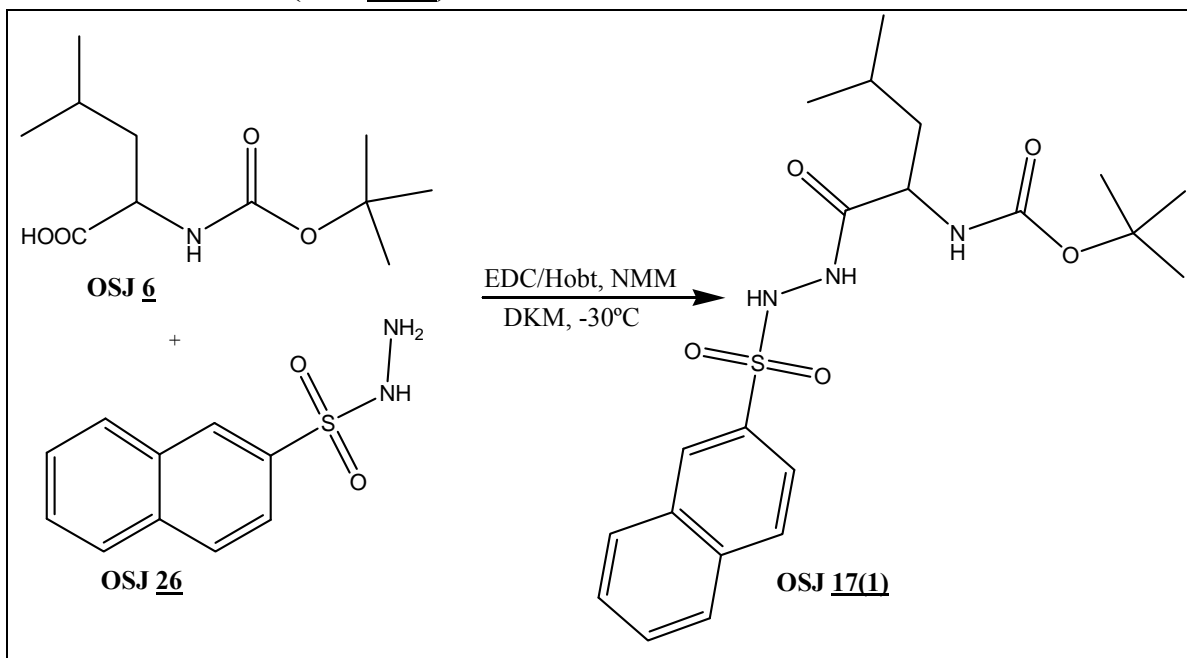
Spojino **OSJ 26** smo sintetizirali po postopku iz članka (29).

13,71 ml (441 mmol) hidrazin hidrata smo raztopili 50 ml THF. V drugi bučki smo raztopili 10 g (44,1 mmol) naftalen-2-sulfonilklorida v 100 ml THF. Obe bučki smo 20

minut ohlajali na ledeni kopeli do približno  $-30^{\circ}\text{C}$ . Nato smo raztopino naftalen-2-sulfonilklorida zelo počasi s kapalnikom dodajali v raztopino hidrazin hidrata. Reakcijsko zmes smo 1 uro mešali na ledeni kopeli, nato pa čez noč na sobni temperaturi. Organsko topilo smo odparili pod znižanim tlakom. Ostanek v bučki smo prelili s 30 ml etilacetata, pomešali in nato prelili s 50 ml heksana. Izpada je oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem. Dobili smo 5,83 g (25,28 mmol, 57%) belih kristalov.

$T_{\text{tališča}}$ :  $132\text{-}134^{\circ}\text{C}$  (v lit:  $131^{\circ}\text{C}$  (29))

#### 4.1.3 Sinteza *tert*-butil-4-metil-1-2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-okso-*pentan*-2-ilkarbamata (**OSJ 17(1)**)



3,00 g (12,97 mmol) *N*-(*tert*-butiloksikarbonil)-L-levcina (**OSJ 6**) smo raztopili v 50 ml diklormetana, ohladili na ledeni kopeli do približno  $-30^{\circ}\text{C}$  in dodali 2,80 g (10,80 mmol) naftalen-2-sulfonohidrazida (**OSJ 26**), 2,4 ml (25,94 mmol) NMM, 2,49 g (12,97 mmol) EDC in 1,75 g (12,97 mmol) Hobt. Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom in 24 ur mešali na sobni temperaturi. Po pretečenem času smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Ostaneku smo dodali 100 ml diklormetana in spirali dvakrat z 20 ml 10% citronske kisline, dvakrat z 20 ml nasičene vodne raztopine  $\text{NaHCO}_3$  in dvakrat s 25 ml nasičene vodne raztopine  $\text{NaCl}$ . Združene organske faze smo 15 minut sušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Masa nastalega

produkta je bila 4,455 g. Očistili smo ga s flash kromatografijo (SF: silikagel, MF: heksan: EtOAc = 2,5:1). Dobili smo 1,78 g (4,10 mmol, 38%) belih kristalov.

**Rf:** 0,26 (Mf: heksan/EtOAc = 2:1)

**Izkoristek:** 38%

**Elementna sestava:** C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S

**M** = 435,18 g/mol

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 87-90°C

**<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.73 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 0.76 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>) 1.14-1.00 (m, 3H, CH<sub>2</sub>, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.31 (s, 9H, (CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 3.91-3.76 (m, 1H, CH-NH), 6.72 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH-NH-CO), 7.74-7.60 (m, 2H, Ar-H), 7.82 (dd, *J* = 8.7, 1.4 Hz, 1H, Ar-H), 13-8.00 (m, 3H, Ar-H), 8.39 (s, 1H, Ar-H), 9.97 (s, 1H, NH-NH-CO), 10.17 (s, 1H, NH-NH-SO<sub>2</sub>) ppm

**MS (ESI): m/z (%):** 458 (MNa<sup>+</sup>, 86), 336 (100)

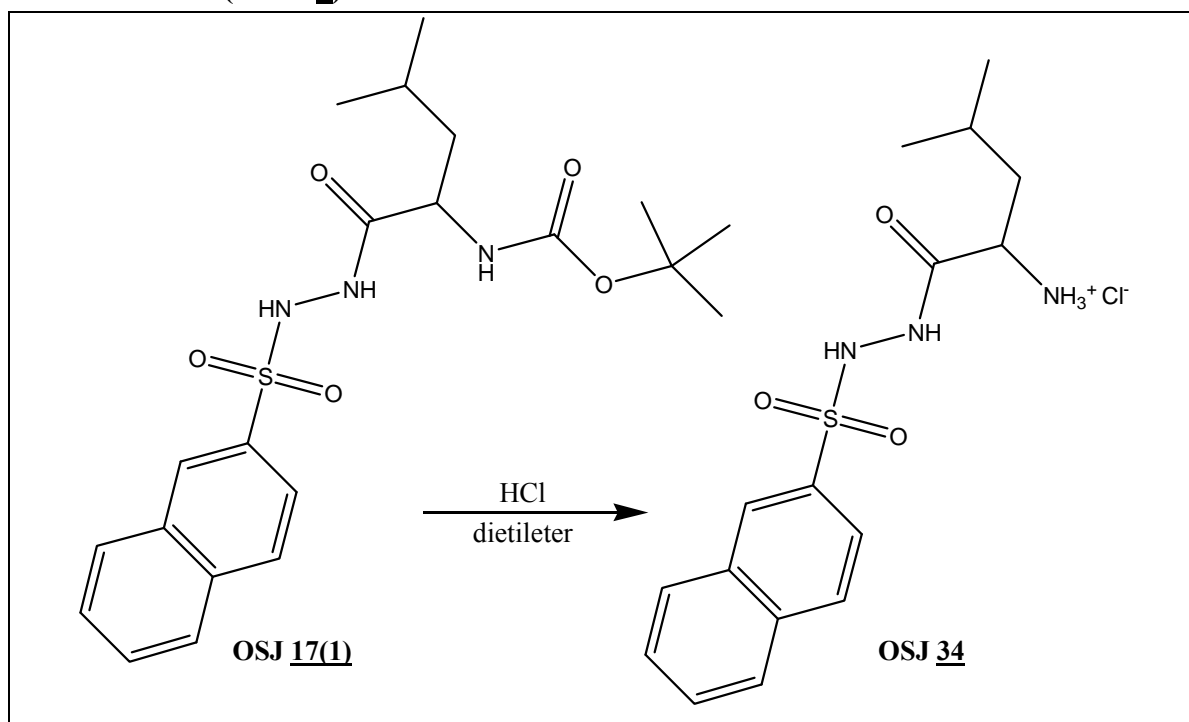
**Elementna analiza za C<sub>21</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S:**

	% C	% H	% N
Izračunano:	57,91	6,71	9,65
Ugotovljeno:	57,99	6,89	9,62

**IR (KBr):** 3361, 2958, 1690, 1591, 1507, 1368, 1340, 1249, 1168, 1132, 1074, 1046, 1020, 952, 866, 750, 680,4, 641,549, 473 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -73,12° (c = 0,25 g/100ml, MeOH)

#### 4.1.4 Sinteza *N*-(2-amino-4-metilpentanoil)naftalen-2-sulfonohidrazinijevega klorida (OSJ 34)



1,03 g (2,37 mmol) *tert*-butil 4-metil-1-2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksoptan-2-ilkarbamata (OSJ 17(1)) smo raztopili v 100 ml dietiletra in 30 minut na ledu prepihovali z nasičeno HCl. Nato smo pod znižanim tlakom odparili topilo in ostanek v bučki še enkrat prelili z dietiletrom. Nastalo belo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem. Masa nastalih belih kristalov je znašala 688 mg (0,185 mmol, 78%).

**Rf:** 0 (MF: heksan:EtOAc = 1:1)

**Izkoristek:** 78%

**Elementna sestava:** C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S x HCl

**M** = 371,882 g/mol (335,42 g/mol brez HCl)

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 178-186°C

**<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.73 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 0.76 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 1.29-1.16 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.43-1.29(m, 1H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3,91-3.76 (m, 1H, CH-NH), 7.74-7.63 (m, 2H, CH-NH-CO, Ar-H), 7.89 (dd, *J* = 8.8, 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.07-8.02 (m, 1H, Ar-H), 8.17-8.08 (m, 2H, Ar-H), 8.51-8.42 (m, 1H, Ar-H), 10.34 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, NH-NH-CO), 10.69 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, NH-NH-SO<sub>2</sub>) ppm

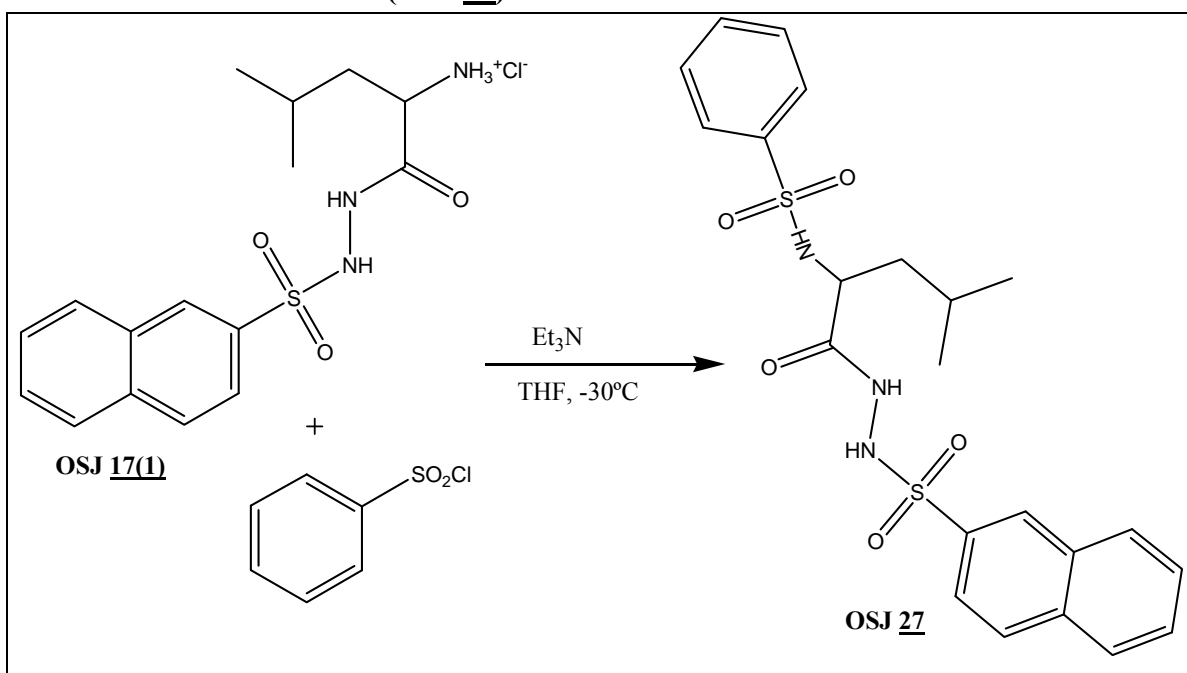
**MS (ESI): m/z (%):** 336 (MH<sup>+</sup>, 100)

**HR-MS: m/z:** MH<sup>+</sup> 336,1394 (izračunano za C<sub>16</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>S: 336,1382)

**IR (KBr):** 3259, 2960, 1690, 1522, 1392, 1368, 1344, 1249, 1167, 1132, 1074, 952, 903, 863, 748, 670, 545, 477 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -60,62° (c = 0,195 g/100ml, MeOH)

#### 4.1.5 Sinteza *N*-(4-metil-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksopentan-2-il)benzensulfonamida (**OSJ 27**)



200 mg (0,538 mmol) *N*-(2-amino-4-metilpentanoil)naftalen-2-sulfonohidrazinijevega klorida (**OSJ 34**) smo raztopili v 5 ml THF in ohladili na ledeni kopeli do približno -30°C ter dodali 0,22 ml (1,614 mmol) Et<sub>3</sub>N. Nato smo počasi dodali 95,02 mg (0,445 mmol) benzensulfonil klorida in pustili mešati na sobni temperaturi 24 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili in ostanku smo dodali 50 ml EtOAc. Raztopino smo spirali dvakrat z 20 ml 10% citronske kisline, dvakrat z 20 ml nasičene vodne raztopine NaHCO<sub>3</sub> in dvakrat s 25 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Združene organske faze smo 15 minut sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (SF:silikagel, MF: heksan:EtOAc = 1:1). Dobili smo 147 mg (0,31 mmol, 58%) belih kristalov.

**Rf:** 0,25 (MF: heksan:EtOAc = 1:1)

**Izkoristek:** 58%

**Elementna sestava:** C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>

**M** = 475,581g/mol

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 215-217°C

**<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.44 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 0.61 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 0.89-0.77 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.04-0.91 (m, 1H, CH-CH<sub>3</sub>), 3.72-3.53 (m, 1H, CH-NH), 7.55-7.52 (m, 2H, Ar-H), 7.60-7.57 (m, 1H, Ar-H), 7.65-7.61 (m, 1H, Ar-H), 7.67-7.66 (m, 1H, Ar-H), 7.78-7.77 (m, 2H, Ar-H), 7.85-7.80 (m, 2H, Ar-H), 8.03-8.00 (d, *J* = 9.0 Hz, 2H, Ar-H), 8.12-8.07 (m, 1H, Ar-H), 8.38 (s, 1H, SO<sub>2</sub>-NH) 9.93 (d, *J* = 3.5 Hz, 1H, NH-NH-CO), 10,26 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, NH-NH-SO<sub>2</sub>) ppm

**MS (ESI): m/z (%):** 476 (MH<sup>+</sup>, 75), 336 (100)

**HR-MS: m/z:** MH<sup>+</sup> 476,1310 (izračunano za C<sub>22</sub>H<sub>26</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub>: 476,1314)

**Elementna analiza za C<sub>22</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>S<sub>2</sub> · 0,6 H<sub>2</sub>O:**

% C    % H    % N

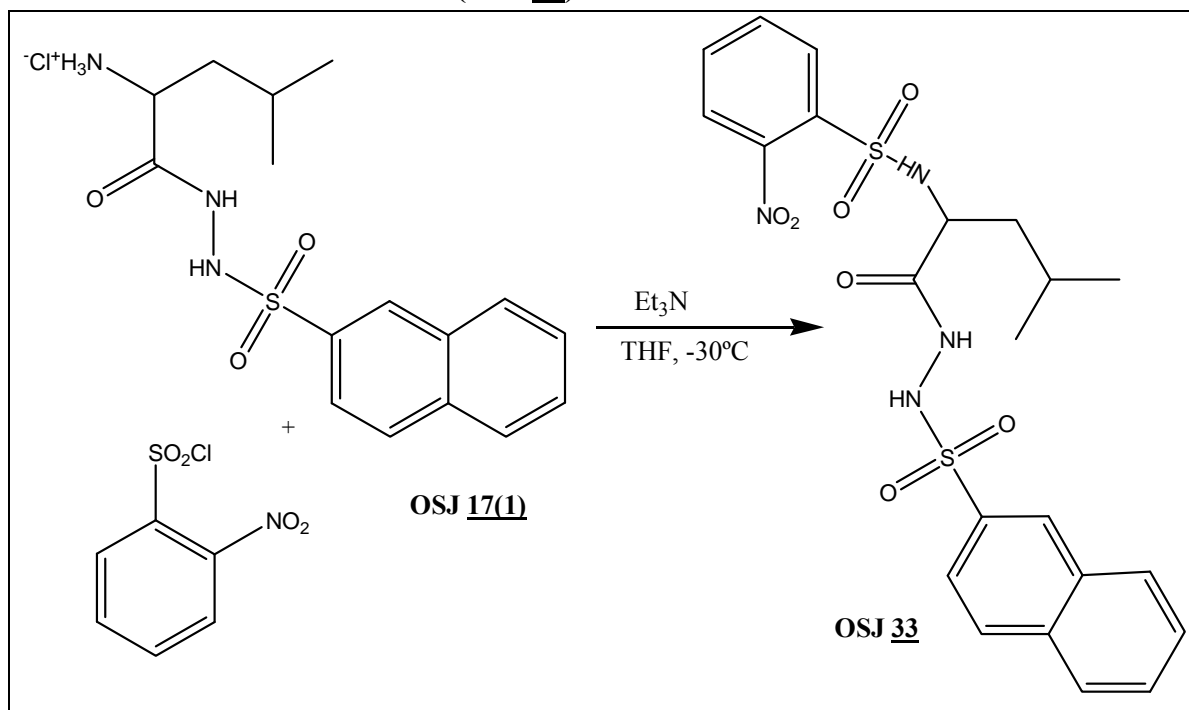
Izračunano: 54,33    5,43    8,64

Ugotovljeno: 54,07    5,16    8,47

**IR (KBr):** 3364, 3250, 2953, 1685, 1521, 1344, 1162, 1075, 822, 745, 660, 570, 474 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -51,32° (c = 0,205 g/100ml, MeOH)

#### 4.1.6 Sinteza *N*-(4-metil-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-okso-pentan-2-il)-2-nitrobenzensulfonamida (OSJ 33)



190 mg (0,51 mmol) *N*-(2-amino-4-metilpentanoil)naftalen-2-sulfonohidrazinijevega klorida (**OSJ 34**) smo raztopili v 3 ml THF in ohladili na ledeni kopeli do približno  $-30^{\circ}\text{C}$  ter dodali 0,22 ml (1,614 mmol)  $\text{Et}_3\text{N}$ . Nato smo počasi dodali 113 mg (0,51 mmol) 2-nitrobenzen-1-sulfonilklorida in pustili mešati na sobni temperaturi 24 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo in ostanku smo dodali 50 ml EtOAc. Raztopino smo spirali dvakrat z 10 ml 10% citronske kisline in enkrat s 15 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Združene organske faze smo 15 minut sušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Nato smo dodali 20 ml dietiletra in oborino odfiltrirali s presesavanjem. Produkt smo prekrizalizirali iz etanola. Masa nastalih belih kristalov je znašala 32 mg (0,06 mmol, 11%).

**Rf:** 0,58 (MF: heksan:EtOAc = 1:1)

**Izkoristek:** 11%

**Elementna sestava:**  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_2$

**M** = 520,579 g/mol

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 220-223 $^{\circ}\text{C}$

**$^1\text{HNMR}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  0.56 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, CH- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 0.70 (d,  $J = 6.4$  Hz, 3H, CH- $\underline{\text{C}}\text{H}_3$ ), 1.13-1.00 (m, 2H,  $\underline{\text{C}}\text{H}_2$ ), 1.40-1.25 (m, 1H,  $\underline{\text{C}}\text{H}-(\text{CH}_3)_2$ ), 3.86-3.66 (m, 1H,  $\underline{\text{C}}\text{H}-\text{NH}$ ), 7.75-7.59 (m, 2H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.85-7.74 (m, 3H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.97-7.86 (m, 2H, Ar-H), 8,15- 7.98 (m, 3H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 8.36 (s, 1H,  $\text{SO}_2-\underline{\text{N}}\text{H}$ ), 10.07-9.84 (m, 1H,  $\text{NH}-\underline{\text{N}}\text{H}-\text{CO}$ ), 10,40-10.17 (m, 1H,  $\text{NH}-\underline{\text{N}}\text{H}-\text{SO}_2$ ) ppm.

**MS (ESI): m/z (%):** 521 ( $\text{MH}^+$ , 100)

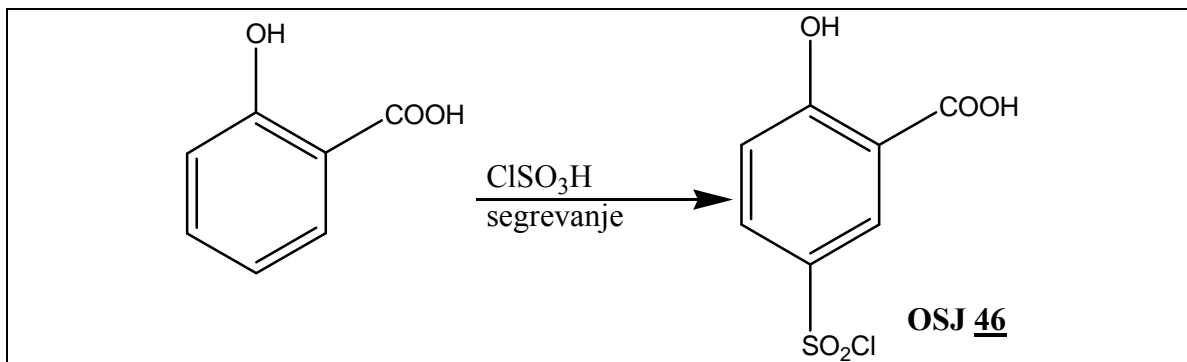
**HR-MS: m/z:**  $\text{MH}^+$  521,1145 (izračunano za  $\text{C}_{22}\text{H}_{25}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_2$ : 521,1165)

**IR (KBr):** 3334, 3251, 2950, 1649, 1535, 1345, 1168, 1126, 819, 784, 675, 654,  $\text{cm}^{-1}$

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -65,46^{\circ}$  ( $c = 0,205$  g/100ml, MeOH)



#### 4.1.7 Sinteza 5-(klorosulfonyl)salicilne kisline (OSJ 46)

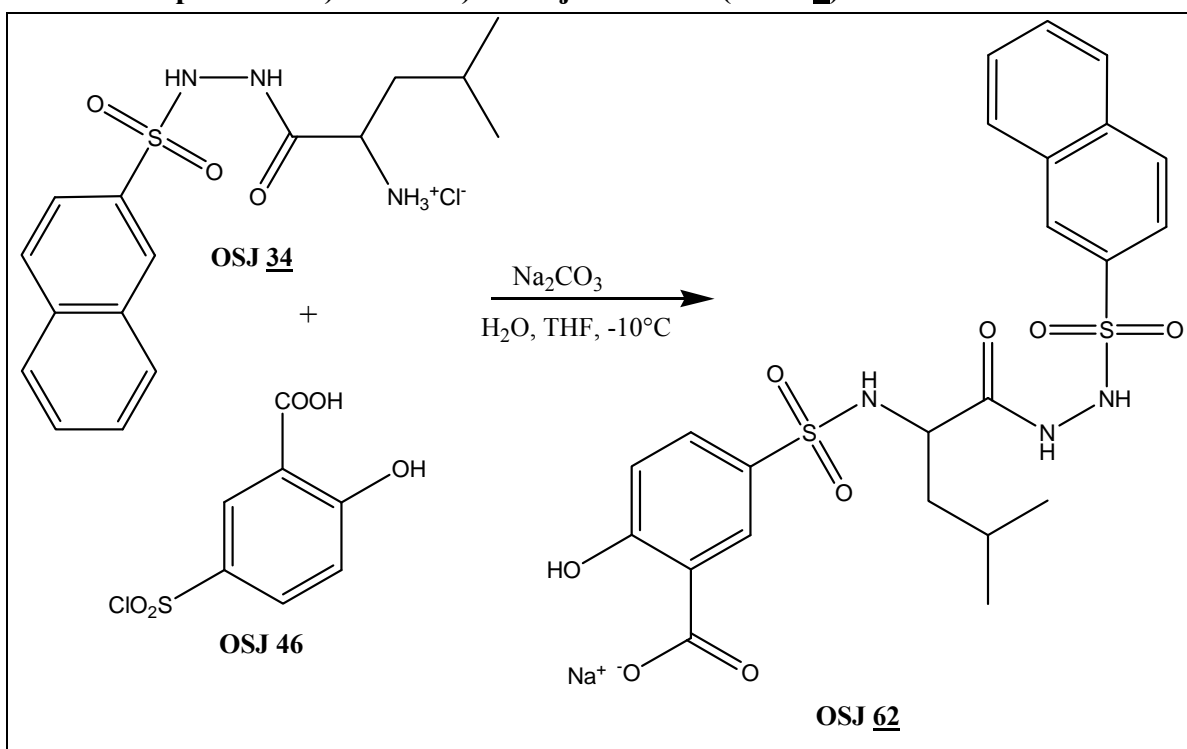


Spojino smo sintetizirali po postopku iz članka (30).

24,1 ml (362 mmol) klorosulfonske kisline smo ohladili na ledu in ji nato počasi dodajali 10 g (76,2 mmol) salicilne kisline. Reakcijsko zmes segrevali na  $75^\circ\text{C}$  1 uro, jo nato ohladili in počasi zlili na led. Dobili smo 8,2 g (34,6 mmol, 45%) bele oborine.

$T_{\text{taljšča}}$ :  $170\text{--}172^\circ\text{C}$  (lit.:  $169\text{--}171^\circ\text{C}$  (30))

#### 4.1.8 Sinteza 2-hidroksil-5-(N-(4-metil-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonyl)hidrazinil)-1-oksopentan-2-il)sulfamoil) benzojske kisline (OSJ 62)



300 mg (0,807 mmol) *N*-(2-amino-4-metilpentanoil)naftalen-2-sulfonohidrazinijevega klorida (**OSJ 34**) smo raztopili v 5 ml THF. Dodali smo še 5 ml vode in ohladili na ledeni kopeli na približno -10°C. Nato smo dodali 213,8 mg (2,02 mmol) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> in počasi ob mešanju še 287,7 mg (1,21 mmol) spojine **OSJ 46**. Reakcijsko zmes smo pustili mešati pri sobni temperaturi 24 ur, nato pa pod znižanim tlakom odparili topilo. Masa nastalega produkta je znašala 566 mg. Produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (SF: silikagel, MF: DKM:MeOH = 7:1). Dobili smo 71 mg (0,13 mmol, 20%) olivno zelenih kristalov.

**Rf:** 0,26 (MF: DKM:MeOH = 7:1)

**Izkoristek:** 20%

**Elementna sestava:** C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>Na

**M** = 557,72 g/mol

**Opis:** olivni zeleni kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 189-193°C

**<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.45 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 0.61 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 1.13-1.00 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.40-1.25 (m, 1H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.60-3.48 (m, 1H, CH-NH), 6,65 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.36 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.46 (dd, *J* = 8.6, 2.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.74-7.60 (m, 2H, Ar-H), 7.82 (dd, *J* = 8.7, 1.7 Hz, 1H, Ar-H), 8.16-7.97 (m, 4H, Ar-H), 8.38 (s, 1H, SO<sub>2</sub>-NH), 10.00-9.39 (m, 1H, NH-NH-CO), 10.23 (s, 1H, NH-NH-SO<sub>2</sub>) ppm

**MS (ESI): m/z (%):** 558 (MH<sup>+</sup>, 100)

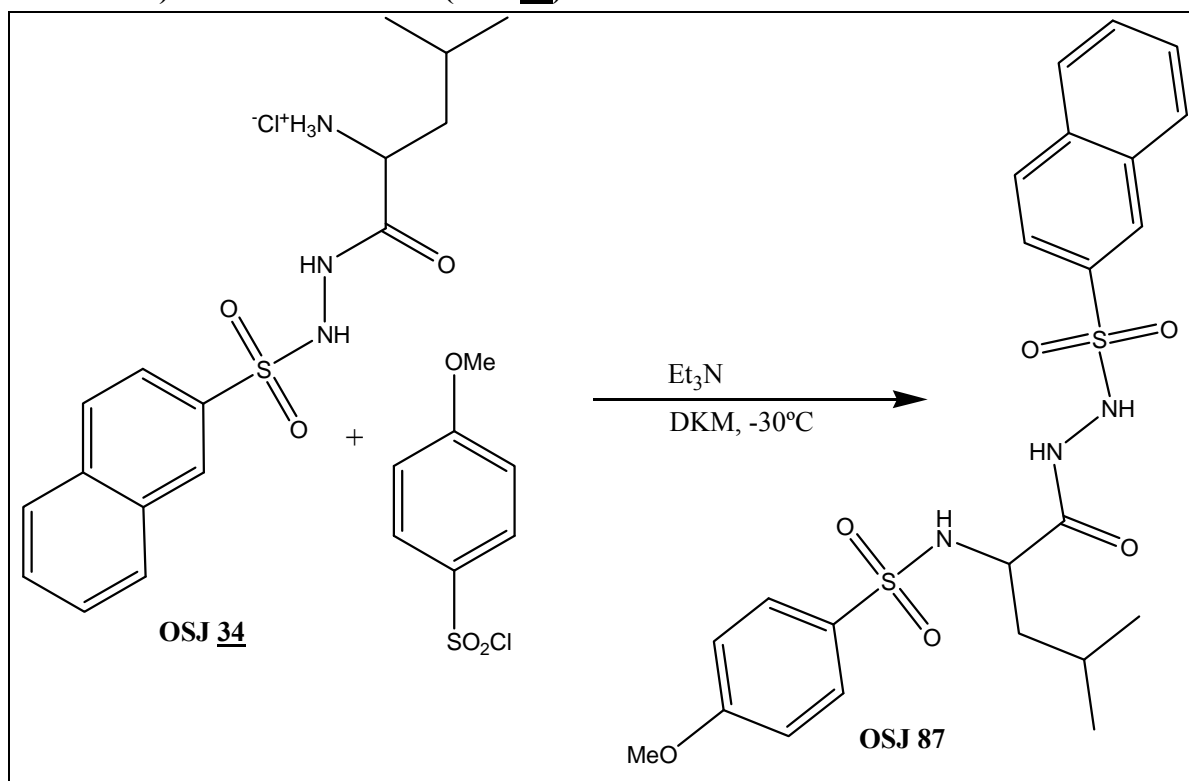
**Elementna analiza za C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>Na**

	% C	% H	% N
Izračunano:	49,54	4,34	7,54
Ugotovljeno:	49,29	5,28	7,56

**IR (KBr):** 3262, 2958, 2870, 2364, 1700, 1628, 1589, 1480, 1438, 1386, 1334, 1270, 1164, 1132, 1110, 1018, 923, 835, 663, 556 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -51,61° (c = 0,205 g/100ml, MeOH)

#### 4.1.9 Sinteza 4-metoksi-*N*-(4-metil-1-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-okso-*N*-pentan-2-il)benzensulfonamida (OSJ 87)



300 mg (0,807 mmol) spojine **OSJ 34** smo raztopili v 5 ml diklormetana in ohladili na ledeni kopeli na približno -30°C in dodali 0,33 ml (2,42 mmol) Et<sub>3</sub>N. Nato smo počasi dodali 166 mg (0,807 mmol) 4-metoksibenzen-1-sulfonilklorida in pustili mešati na sobni temperaturi 24 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo in produkt očistili s kolonsko kromatografijo (SF: silikagel, MF: heksan:EtOAc = 4:1), nato pa še dodatno prekrystalizirali iz dietiletra in petroletra. Dobili smo 33 mg belih kristalov (6,5 mmol, 8%).

**Rf:** 0,17 (MF: heksan:EtOAc = 4:1)

**Izkoristek:** 9%

**Elementna sestava:** C<sub>23</sub>H<sub>27</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>

**M** = 505,603 g/mol

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 72-75°C

**<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.73 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 0.76 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 1.48-1.22 (m, 9H, CH<sub>2</sub>, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, OCH<sub>3</sub>), 4.16-4.00 (m, 1H, CH-NH),

6.98-6.87 (m, 1H, Ar-H), 7.19-7.07 (m, 1H, Ar-H), 7.68-7.45 (m, 1H, Ar-H), 7.95-7.67 (m, 5H, Ar-H), 8.22-8.01 (m, 3H, Ar-H), 8.53-8.38 (m, 1H, SO<sub>2</sub>-NH), 11.16-11.01 (m, 1H, NH-NH-CO) ppm

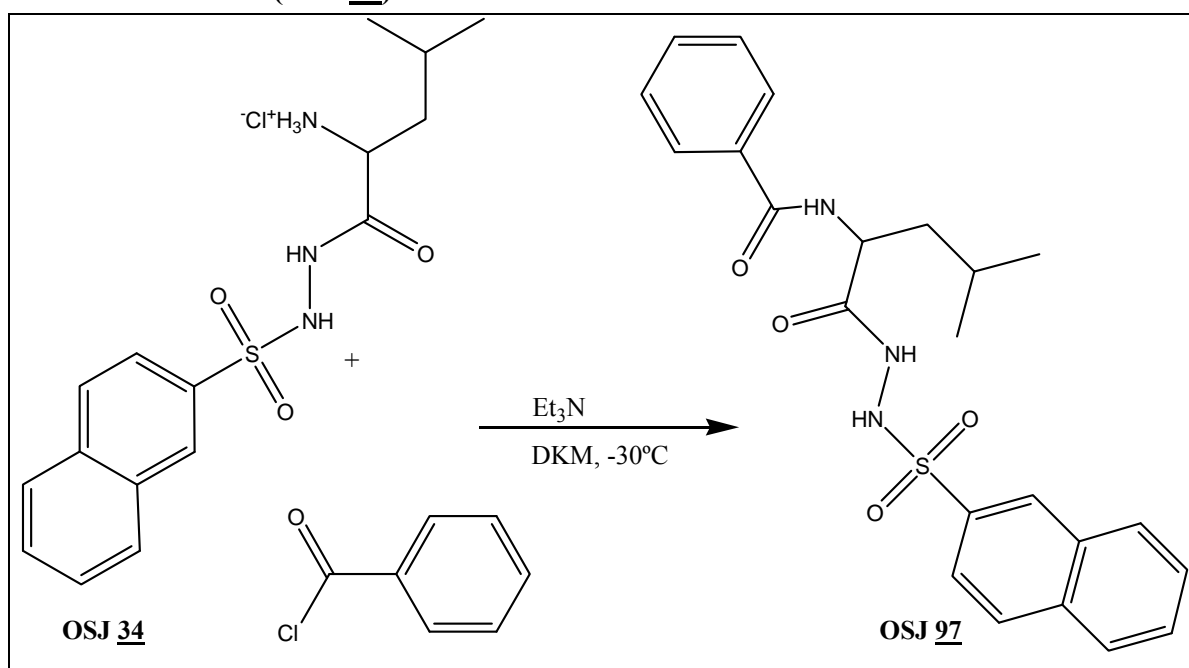
**MS (ESI):** m/z (%): 506 (MH<sup>+</sup>, 85), 362 (100)

**HR-MS:** m/z: MH<sup>+</sup> 506,1430 (izračunano za C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>: 506,1420)

**IR (KBr):** 3376, 2959, 2365, 1696, 1594, 1498, 1382, 1265, 1166, 897, 749, 660, 549 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -20,95° (c = 0,275 g/100ml, MeOH)

#### 4.1.10 Sinteza *N*-(4-metil-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksopentan-2-il)benzamida (OSJ 97)



300 mg (0,807 mmol) spojine **OSJ 34** smo raztopili v 5 ml diklormetana, ohladili na ledeni kopeli in dodali 0,33 ml (2,42 mmol) Et<sub>3</sub>N. Nato smo počasi dodali 141 mg (0,807 mmol) benzoilklorida in pustili mešati na sobni temperaturi 24 ur. Po preteklem času smo dodali 50 ml diklormetana in raztopino spirali dvakrat z 20 ml 10% citronske kisline, dvakrat z 20 ml nasičene vodne raztopine NaHCO<sub>3</sub> in dvakrat s 25 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Združene organske faze smo 15 minut sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (SF:silikagel, MF: heksan:EtOAc = 4:1). Masa nastale bele oborine je znašala 91 mg (0,21 mmol, 26%)

**Rf:** 0,20 (MF: heksan:EtOAc = 4:1)

**Izkoristek:** 26%

**Elementna sestava:** C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S

**M** = 439, 527 g/mol

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 99-103°C

**<sup>1</sup>HNMR (300MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 0.73 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 0.76 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>) 0.93-0.84 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.36-1.14 (m, 3H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.08-3.93 (m, 1H, CH-NH), 4.83-4.64 (m, 1H, CH-NH-CO) 7.37-7.27 (m, 3H, Ar-H), 7.51-7.40 (m, 1H, Ar-H), 7.58-7.51 (m, 2H, Ar-H), 7.93 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.99 (d, *J* = 8.9 Hz, 1H, Ar-H), 8.06 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 8.16 (dd, *J* = 8.8, 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 8.80-8.77 (m, 1H, Ar-H), 9.39-9.22 (m, 1H, Ar-H) ppm

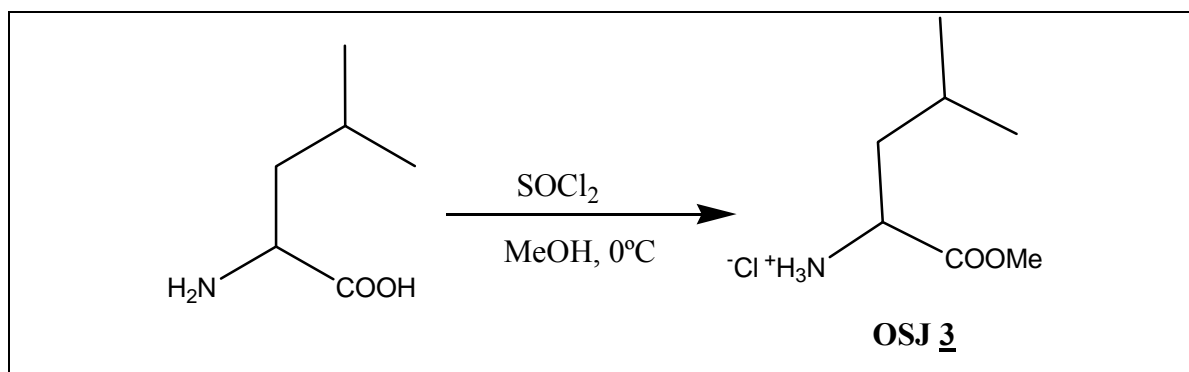
**MS (ESI): m/z (%):** 440 (MH<sup>+</sup>, 78), 362(100)

**IR (KBr):** 3385, 2959, 2344, 1690, 1508, 1368, 1235, 1171, 1072, 858, 748, 635, 570 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -58,67° (c = 0,15 g/100ml, MeOH)

## 4.2 Druga sintezna pot

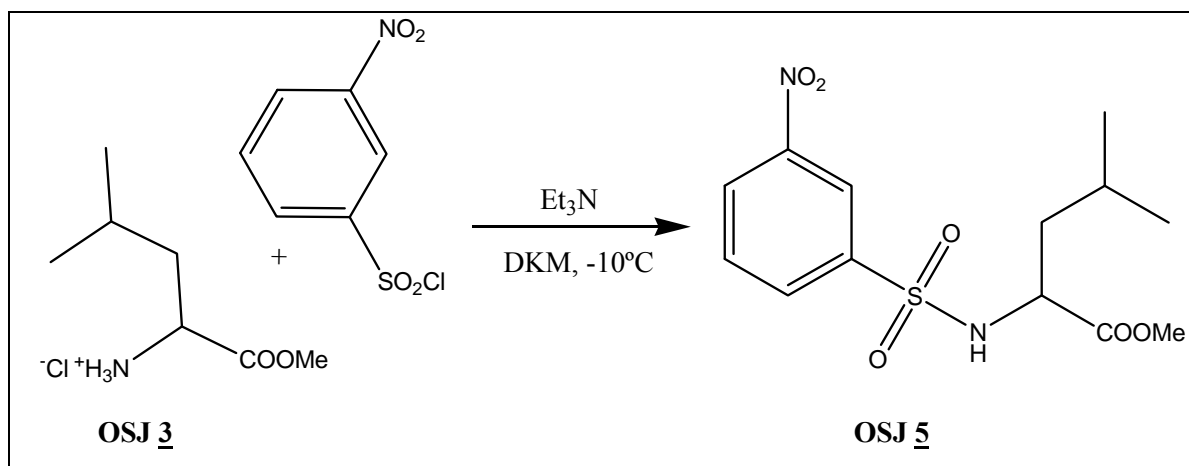
### 4.2.1 Sinteza 1-metoksi-4-metil-1-oksopentan-2-aminijevega klorida (OSJ 3)



Spojino **OSJ 3** smo sintetizirali po postopku iz članka (31).

10,00 g (76,23 mmol) L-levcina smo raztopili v 150 ml metanola in ohladili na ledu. Nato smo na ledu počasi dodali 11,09 ml (152,46 mmol) tionilklorida. Po končani reakciji smo dodali 50 ml dietiletra in nastalo oborino odfiltrirali s presesavanjem. Dobili smo 13,69 g (75,37 mmol, 99%) belih kristalov.

**T<sub>tališča</sub>:** 150 (v lit: 150°C (31))

4.2.2 Sinteza metil 4-metil-2-(3-nitrofenilsulfonamido)pentanoata (**OSJ 5**)

6,75 g (37,16 mmol) 1-metoksi-4-metil-1-oksopentan-2-aminijevega klorida (**OSJ 3**) smo raztopili v 150 ml diklormetana in raztopino ohladili na ledu, ki smo mu dodali NaCl oz. kuhinjsko sol (do približno  $-10^\circ\text{C}$ ). Nato smo dodali 10,35 ml (74,31 mmol)  $\text{Et}_3\text{N}$  in pustili, da se na ledu meša 10 minut. Počasi smo dodali 7,97 g (35,95 mmol) 3-nitrobenzen-1-sulfonilklorida in pustili mešati pri sobni temperaturi čez noč. Organsko fazo smo nato spirali dvakrat z 20 ml 10% citronske kisline, dvakrat z 20 ml nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$  in dvakrat s 25 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Združene organske faze smo 15 minut sušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Produkt smo čistili s flash kromatografijo (SF: silikagel, MF: EtOAc). Dobili smo 10,067 g (30,47 mmol, 82%) belih kristalov.

**Rf:** 0,73 (Mf: EtOAc)

**Izkoristek:** 82%

**Elementna sestava:**  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$

**M** = 330,36 g/mol

**Opis:** beli kristali

**T<sub>taljšča</sub>:** 56-58°C

$^1\text{HNMR}$  (300MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  0.71 (d,  $J = 6.5$  Hz, 3H,  $\text{CH-CH}_3$ ), 0.80 (d,  $J = 6.6$  Hz, 3H,  $\text{CH-CH}_3$ ), 1.50-1.43 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 1.66-1.51 (m, 1H,  $\text{CH-(CH}_3)_2$ ), 3.35 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.94-3.82 (m, 1H,  $\text{CH-NH}$ ), 7.90 (t,  $J = 7.8, 7.8$  Hz, 1H, Ar-H), 8.18 (dd,  $J = 7.7, 1.0$ , 1H, Ar-H), 8.53-8.43 (m, 2H, Ar-H), 8.73 (d,  $J = 8.9$  Hz, 1H,  $\text{NH-SO}_2$ ) ppm.

**MS (ESI): m/z (%):** 329 (M-H, 100%)

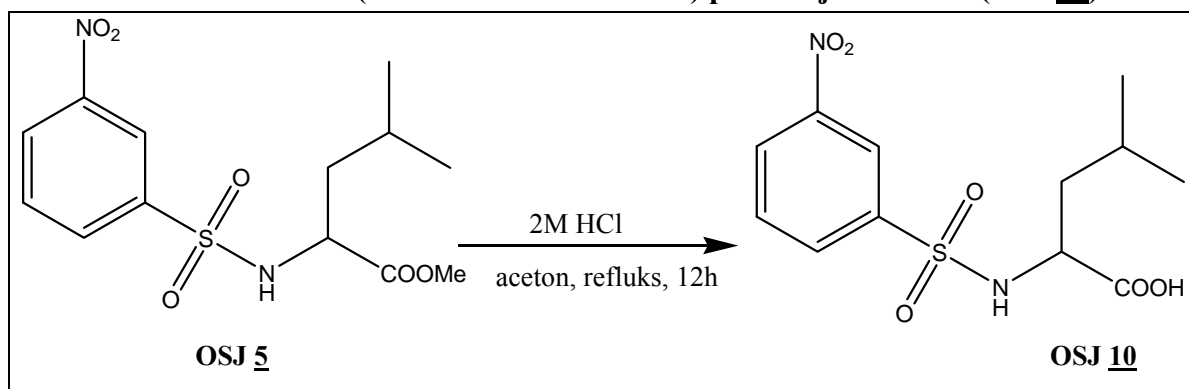
**HR-MS: m/z:** M-H 329, 0813 (izračunano za C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S: 329,0807)

**Elementna analiza za C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S :**

	% C	% H	% N
Izračunano:	47,26	5,49	8,48
Ugotovljeno:	47,46	5,67	8,54

**IR (KBr):** 3271, 3072, 2920, 1735, 1529, 1350, 1205, 1124, 1072, 974, 905, 662, 567 cm<sup>-1</sup>

#### 4.2.3 Sinteza 4-metil-2-(3-nitrofenilsulfonamido) pentanojske kisline (OSJ 10)



2,00 g (6,05 mmol) metil 4-metil-2-(3-nitrofenilsulfonamido)pentanoata (OSJ 5) smo raztopili v 40 ml acetona. Nato smo dodali 100 ml 2M HCl in segrevali pod refluxom 12 ur. Po pretečenem času smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Iz rumene raztopine so sčasoma nastali beli kristali, ki smo jih odfiltrirali s presesavanjem in sprali z majhno količino hladne vode. Masa nastalega produkta je bila 1,83 g (5,79 mmol, 96%).

**Rf:** 0,27 (Mf: EtOAc)

**Izkoristek:** 96%

**Elementna sestava:** C<sub>12</sub>H<sub>16</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S

**M** = 316,33 g/mol

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 118-123°C

**<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.71 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 1.51-1.36 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.69-1.52 (m, 1H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.83-3.68 (m, 1H, CH-NH), 7.88 (t, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.19 (dd, *J* = 7.9, 0.9 Hz, 1H, Ar-H), 8.53-

8.47-8.45 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, Ar-H), 8.49-8.48 (m, 1H, Ar-H), 8.56 (d,  $J = 8.8$  Hz, 1H, NH-SO<sub>2</sub>), 12.66 (s, 1H, COOH) ppm

**MS (ESI): m/z (%):** 315 (M-H, 100)

**HR-MS: m/z:** M-H 315,0653 (izračunano za C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S: 315,0651)

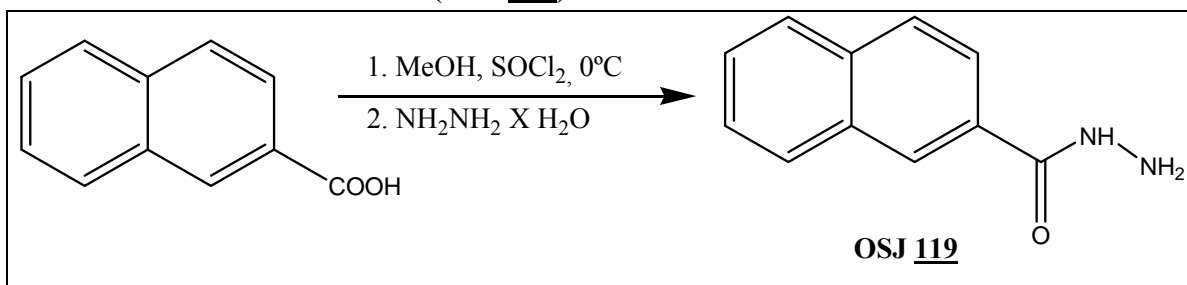
**Elementna analiza za C<sub>13</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>6</sub>S :**

	% C	% H	% N
Izračunano:	45,56	5,10	8,86
Ugotovljeno:	45,74	4,99	8,90

**IR (KBr):** 3300, 2964, 1697, 1535, 1353, 1277, 1175, 1124, 940, 670, 599 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = +23,16^\circ$  (c = 0,215 g/100ml, MeOH)

#### 4.2.4 Sinteza naftohidrazida (OSJ 119)



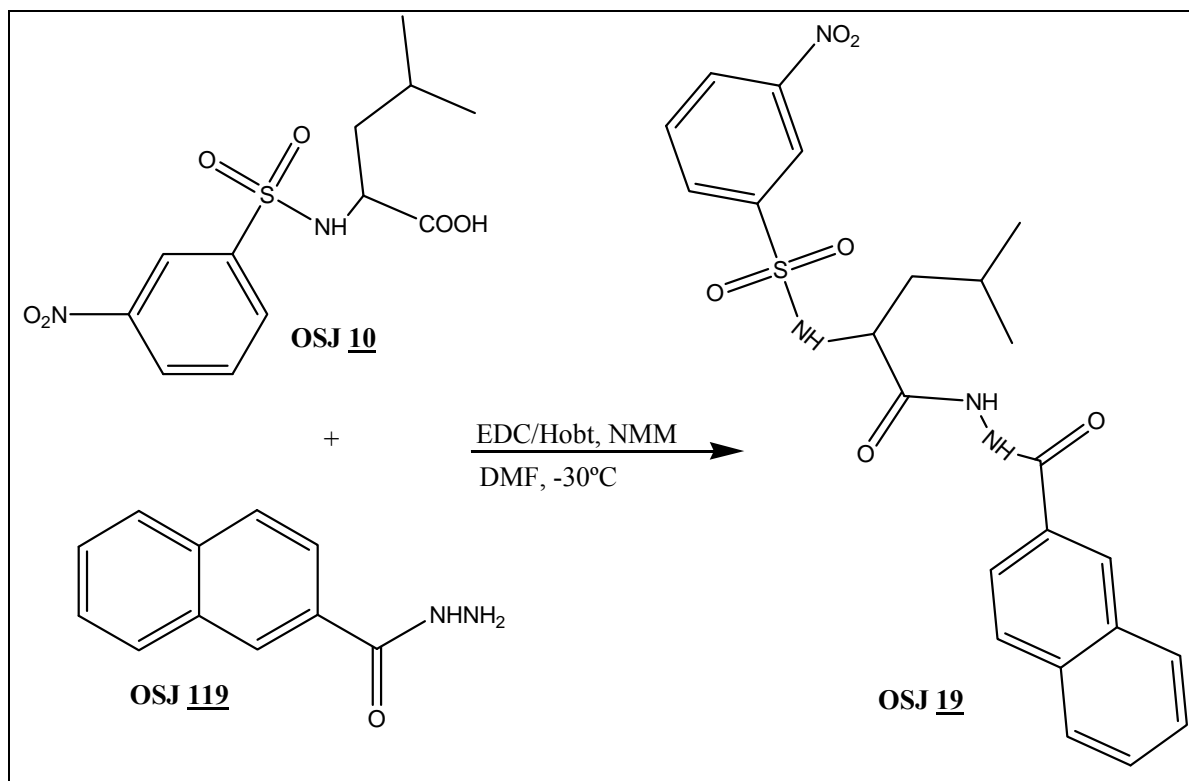
Sinteza spojine **OSJ 119** je potekala v dveh stopnjah. V prvi stopnji smo naftalensko kislino pretvorili v ester po postopku iz članka (**T<sub>tališča</sub> estra:** 74-78°C (v lit: 75-76°C (37))).

Nato smo v drugi stopnji 4g (21,48 mmol) metil 2-naftoata raztopili v 50 ml etanola in mu na ledu dodali 0,67 ml (21,48 mmol) hidrazin hidrata. Reakcijsko zmes smo segrevali pod refluksom 12 ur. Po preteklem času smo pod znižanim tlakom odparili topilo in produkt prekrystalizirali iz vode. Masa nastalega trdnega produkta je znašala 3,65 g (19,6 mmol, 91%).

**T<sub>tališča</sub> hidrazida:** 150-153°C (v lit: 152°C (32))



#### 4.2.5 Sinteza *N*-(1-(2-(2-naftoil)hidrazinil)-4-metil-1-oksopentan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamida (OSJ 19)



200 mg (0,63 mmol) 4-metil-2-(3-nitrofenilsulfonamido) pentanojske kisline (OSJ 10) smo raztopili v 5 ml DMF, ohladili na ledeni kopeli in dodali 141 mg spojine OSJ 119 (0,63 mmol), 0,18 ml (1,89 mmol) NMM, 0,121 mg (0,63 mmol) EDC in 0,086 mg (0,063 mmol) Hobt. Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom, preverili če je pH 8 in 24 ur mešali na sobni temperaturi. Po pretečenem času smo pod znižanim tlakom odparili DMF. Ostanke smo dodali 50 ml etilacetata in spirali dvakrat z 20 ml 10% citronske kisline, dvakrat z 20 ml nasičene vodne raztopine NaHCO<sub>3</sub> in dvakrat s 25 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Združene organske faze smo 15 minut sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Produkt smo prekristalizirali iz etanola in etilacetata. Masa očiščenih bledorumenih kristalov je znašala 58 mg (0,20 mmol, 20%).

**Rf:** 0,20 (MF: DKM:MeOH = 20:1)

**Izkoristek:** 20%

**Elementna sestava:** C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S

**M** = 484,52 g/mol

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 221-229°C

**<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.71 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 1.55-1.33 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.77-1.57 (m, 1H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.09-3.99 (m, 1H, CH-NH), 7.75-7.54 (m, 2H, Ar-H), 7.88 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, CH-NH-SO<sub>2</sub>), 8.14-7.96 (m, 4H, Ar-H), 8.24 (d, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 8.49-8.41 (m, 2H, Ar-H), 8.63-8.49 (m, 2H, Ar-H), 10.27 (s, 1H, NH-NH-CO), 10.45 (s, 1H, NH-NH-CO) ppm

**MS (ESI): m/z (%):** 485 (MH<sup>+</sup>, 77), 312 (100)

**Elementna analiza za C<sub>23</sub>H<sub>24</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S · 0,67 H<sub>2</sub>O:**

% C    % H    % N

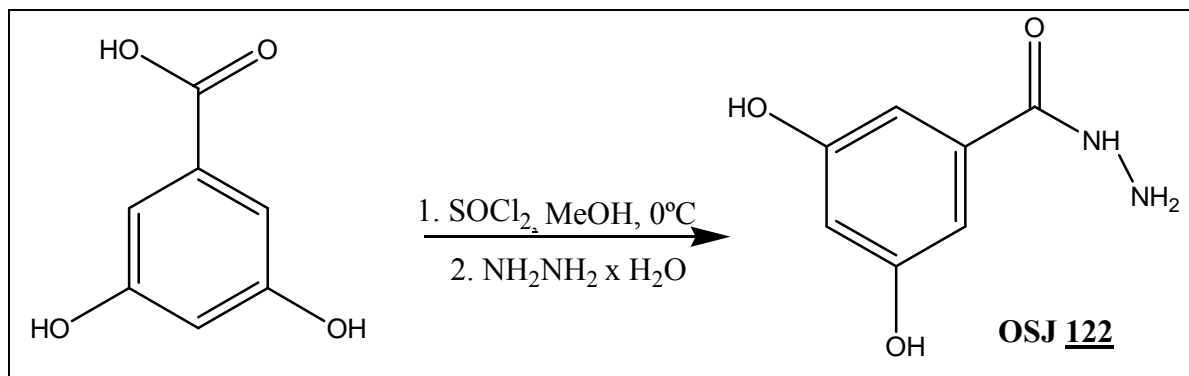
Izračunano: 55,63    5,14    11,28

Ugotovljeno: 55,89    5,00    11,57

**IR (KBr):** 3253, 2957, 1612, 1533, 1478, 1350, 1175, 1125, 1064, 912, 777, 664 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +28,21° (c = 0,195 g/100ml, DMF)

#### 4.2.6 Sinteza 3, 5-dihidroksibenzohidrazida (OSJ 122)



Sinteza spojine **OSJ 122** je potekala v dveh stopnjah. V prvi stopnji smo tvorili ester po postopku iz članka (**T<sub>tališča</sub>**: 159-160°C (v lit: 165-166,5°C (38))).

Nato smo v drugi stopnji 4,5 g (26,76 mmol) metil 3,5-dihidroksibenzoata raztopili v 50 ml etanola in mu na ledu dodali 0,85 ml (26,76 mmol) hidrazin hidrata. Reakcijsko zmes smo pod reflusom segrevali 12 ur. Po preteklem času smo pod znižanim tlakom odparili topilo in produkt prekristalizirali iz vode. Masa nastalega rjavega praška je znašala 1,78 g (10,59 mmol, 40%).

**Rf:** 0 (MF: DKM:MeOH = 20:1, orositveni reagent: FeCl<sub>3</sub>)

**Elementna sestava:** C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>

**M** = 168, 15 g/mol

**Opis:** rjavi prašek

**T<sub>tališča</sub>:** 254-256°C

**<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 4.81 (m, 3H, NH<sub>2</sub>, OH) 6.35 (d, *J* = 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.64 (d, *J* = 2.4 Hz, 2H, Ar-H), 9.83 (s, 1H, NH-NH<sub>2</sub>) ppm

**MS (ESI): m/z (%):** 168 (MH, 42), 169 (MH<sup>+</sup>, 100)

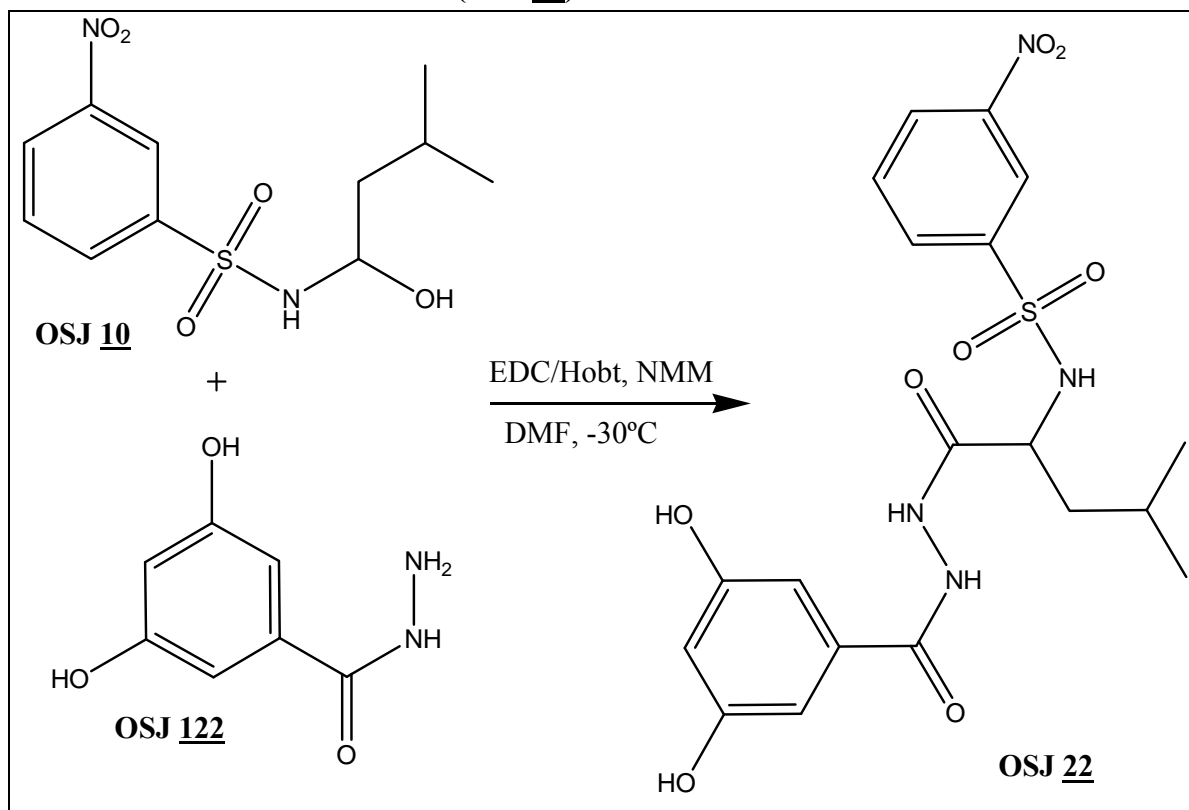
**HR-MS: m/z:** MH<sup>+</sup> 169,0617 (izračunano za C<sub>7</sub>H<sub>9</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>: 169,0613)

**Elementna analiza za C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>:**

	% C	% H	% N
Izračunano:	50,00	4,80	16,66
Ugotovljeno:	49,70	4,96	16,74

**IR (KBr):** 3328, 1611, 1448, 1347, 1243, 1151, 980, 857, 757, 676 cm<sup>-1</sup>

#### 4.2.7 Sinteza *N*-(1-(2-(3,5-dihidroksibenzoil)hidrazinil)-4-metil-1-okso-2-pentanol)-3-nitrobenzensulfonamida (OSJ 22)



300 mg (0,95 mmol) 4-metil-2-(3-nitrofenilsulfonamido) pentanojske kisline (**OSJ 10**) smo raztopili v 5 ml DMF, ohladili na ledeni kopeli in dodali 159 mg (0,95 mmol) 3,5-dihidroksibenzohidrazida (**OSJ 122**), 2,6 ml (25,94 mmol) NMM, 0,182 mg (12,97 mmol) EDC in 0,128 mg (12,97 mmol) Hobt. Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom, preverili če je pH 8 in 24 ur mešali na sobni temperaturi. Po pretečenem času smo pod znižanim tlakom odparili DMF. Ostanke smo dodali 50 ml etilacetata in spirali dvakrat z 20 ml 10% citronske kisline, dvakrat z 20 ml nasičene vodne raztopine NaHCO<sub>3</sub> in dvakrat s 25 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Združene organske faze smo 15 minut sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (SF: silikagel, MF: DKM:MeOH = 14:1). Masa očiščenih bledorumenih kristalov je znašala 278 mg (0,60 mmol, 63%).

**Rf:** 0,38 (MF: DKM:MeOH = 9:1)

**Izkoristek:** 63%

**Elementna sestava:** C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S

**M** = 466,465 g/mol

**Opis:** bledorumeni kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 122-124°C

**<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.71 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 1.47-1.29 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.71-1.56 (m, 1H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 4.04-3.86 (m, 1H, CH-NH), 6.37 (t, *J* = 2.1, 2.1 Hz, 1H, Ar-H), 6.69-6.60 (m, 2H, Ar-H), 7.85 (t, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.23-8.18 (m, 1H, Ar-H), 8.46-8.47 (m, 1H, Ar-H), 8.51-8.42 (m, 1H, SO<sub>2</sub>-NH), 8.55 (t, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 1H, Ar-H), 9.48 (s, 2H, OH, COOH), 10.03 (d, *J* = 14.3 Hz, 2H, CO-NH-NH-CO) ppm

**MS (ESI): m/z (%):** 467 (MH<sup>+</sup>, 100)

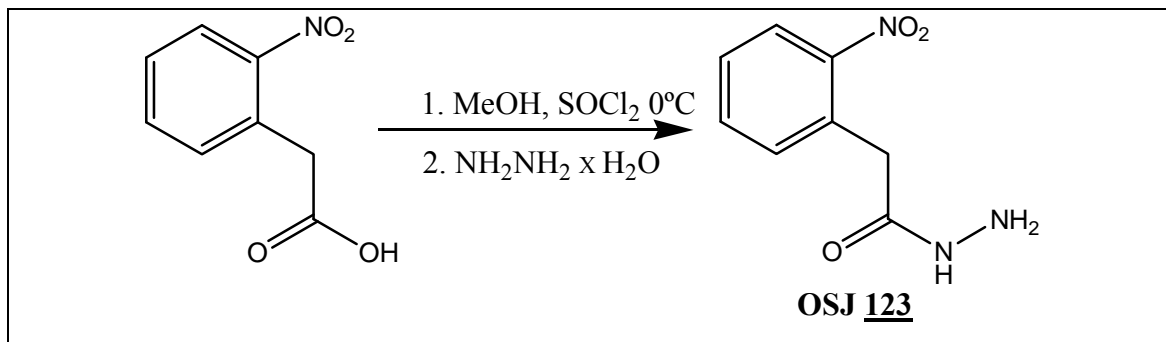
**Elementna analiza za C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S:**

	% C	% H	% N
Izračunano:	48,92	4,75	12,01
Ugotovljeno:	49,01	4,82	11,98

**IR (KBr):** 3491, 3228, 2961, 1650, 1613, 1534, 1351, 1172, 1159, 1125, 1076, 1005, 861, 734, 676 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 18,05° (c = 0,215 g/100ml, MeOH)

## 4.2.8 Sinteza 2-(2-nitrofenil)acetohidrazida (OSJ 123)



Sinteza spojine **OSJ 123** je potekala v dveh stopnjah. V prvi stopnji smo tvorili ester po postopku iz članka ( $T_{\text{tališča estra}}: 74-78^\circ\text{C}$ ) (39).

Nato smo v drugi stopnji 4,3 g (22,03 mmol) metil 2-(1-nitrofenil)acetata raztopili v 50 ml etanola in mu na ledu dodali 0,68 ml (22,03 mmol) hidrazin hidrata. Reakcijsko zmes smo pod reflukso segrevali 12 ur. Po preteklem času smo pod znižanim tlakom odparili topilo in produkt prekristalizirali iz vode. Masa nastalih rumenih kristalov je znašala 2,03 g (10,40 mmol, 47%).

**Rf:** 0, 20 (MF: DKM:MeOH = 20:1)

**Izkoristek:** 47%

**Elementna sestava:**  $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$

**M** = 195 g/mol

**Opis:** rumeni kristali

**$T_{\text{tališča}}$ :** 143-147°C

**$^1\text{HNMR}$  (300MHz, DMSO- $d_6$ ):**  $\delta$  3.80 (s, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.19 (s, 2H,  $\text{NH-NH}_2$ ), 7.48-7.53 (m, 2H,  $\text{Ar-H}$ ), 7.64-7.67 (m, 1H,  $\text{Ar-H}$ ), 7.97-8.01 (m, 1H,  $\text{Ar-H}$ ), 9.18 (s, 1H,  $\text{NH-NH}_2$ ) ppm

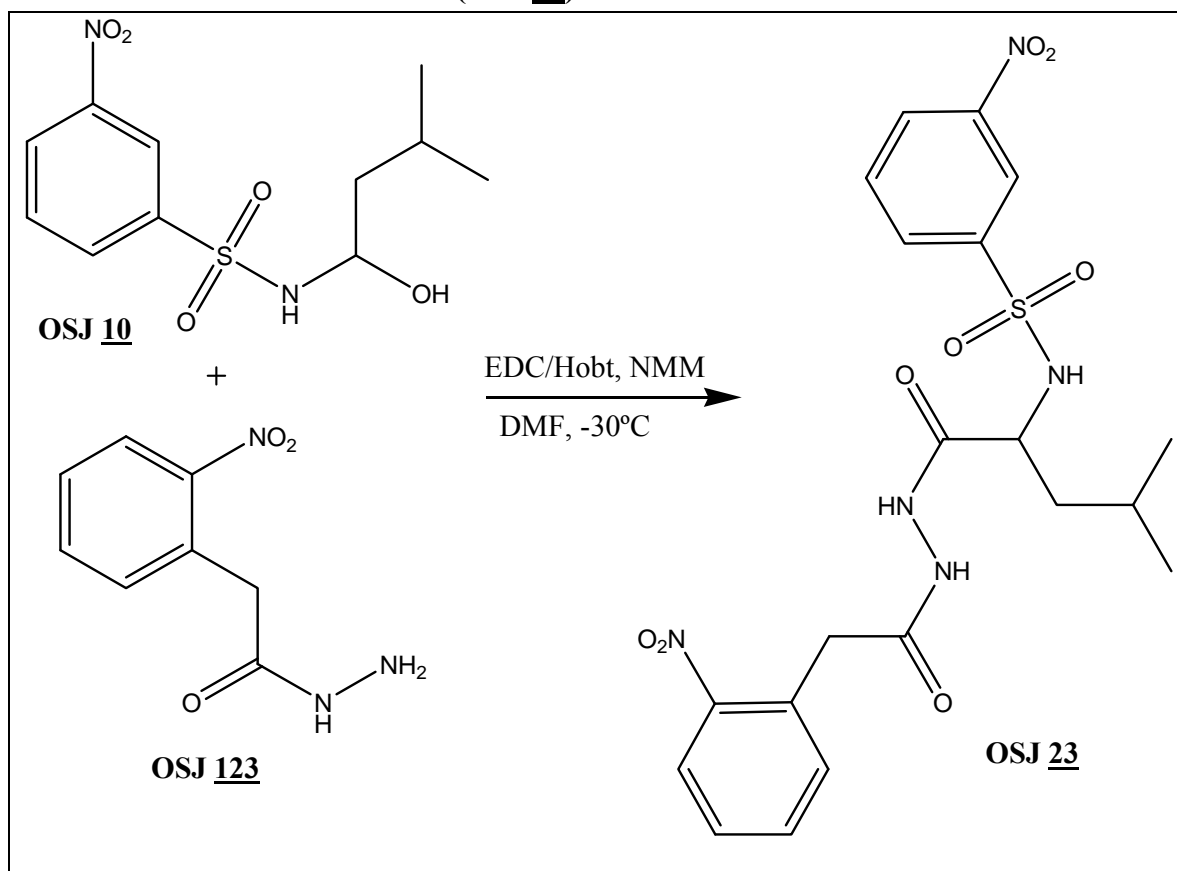
**MS (ESI): m/z (%):** 196 ( $\text{MH}^+$ , 100)

**Elementna analiza za  $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_3$ :**

	% C	% H	% N
Izračunano:	49,23	4,65	21,53
Ugotovljeno:	49,25	4,78	21,63

**IR (KBr):** 3410, 1643, 1526, 1342, 1147, 999, 706, 720, 700  $\text{cm}^{-1}$

#### 4.2.9 Sinteza *N*-(4-metil-1-(2-(2-(2-nitrofenil)acetil)hidrazinil)-1-okso)pentan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamida (**OSJ 23**)



300 mg (0,95 mmol) 4-metil-2-(3-nitrofenilsulfonamido) pentanojske kisline (**OSJ 10**) smo raztopili v 5 ml DMF, ohladili na ledeni kopeli na približno  $-30^{\circ}\text{C}$  in dodali 185 mg (0,95 mmol) spojine **OSJ 123**, 2,6 ml (25,94 mmol) NMM, 0,182 mg (12,97 mmol) EDC in 0,128 mg (12,97 mmol) Hobt. Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom in preverili če je pH 8. Reakcijo smo pustili potekati 24 ur. Nato smo pod znižanim tlakom odparili DMF in ostanku smo dodali 50 ml etilacetata. Raztopino smo spirali dvakrat z 20 ml 10% citronske kisline, dvakrat z 20 ml nasičene vodne raztopine  $\text{NaHCO}_3$  in dvakrat s 25 ml nasičene vodne raztopine  $\text{NaCl}$ . Združene organske faze smo 15 minut sušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (SF:silikagel, MF: DKM:MeOH = 20:1). Dobili smo 222 mg (0,45 mmol, 47%) belih kristalov.

**Rf:** 0,42 (MF: DKM:MeOH = 9:1)

**Izkoristek:** 47%

**Elementna sestava:**  $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{N}_5\text{O}_8\text{S}$

**M** = 493,490 g/mol

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 249-252°C

**<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.71 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 1.33 (t, *J* = 7.2, 7.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.63-1.47 (m, 1H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.96-3.78 (m, 3H, CO-CH<sub>2</sub>, CH-NH), 7.60-7.46 (m, 2H, Ar-H), 7.72-7.63 (m, 1H, Ar-H), 7.79 (t, *J* = 8.1, 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 8.02 (dd, *J* = 8.1, 1.2 Hz, 1H, Ar-H), 8.20-8.12 (m, 1H, Ar-H), 8.47-8.37 (m, 1H, SO<sub>2</sub>-NH), 8.51 (t, *J* = 1.9, 1.9 Hz, 2H, Ar-H), 10.03 (d, *J* = 1.9 Hz, 1H, CO-NH-NH-CO), 10.17 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, CO-NH-NH-CO) ppm

**MS (ESI): m/z (%):** 494 (MH<sup>+</sup>, 100)

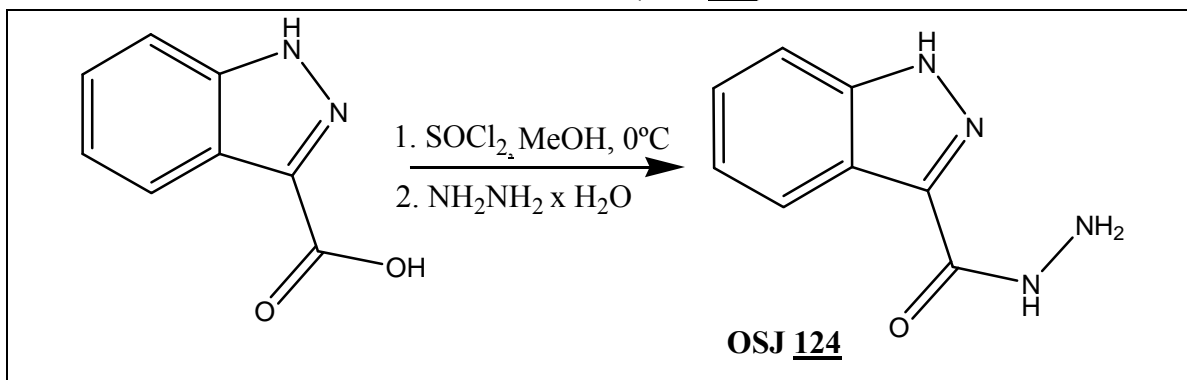
**Elementna analiza za C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S:**

	% C	% H	% N
Izračunano:	48,68	4,70	14,19
Ugotovljeno:	48,57	4,68	14,26

**IR (KBr):** 3244, 2961, 2866, 1616, 1529, 1481, 1350, 1172, 1124, 945, 876, 733, 669 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -10,3° (c = 0,215 g/100ml, MeOH)

#### 4.2.10 Sinteza 1H-indazol-3-karbohidrazida (OSJ 124)



Sinteza spojine **OSJ 124** je potekala v dveh stopnjah. Najprej smo tvorili ester po postopku iz članka (**T<sub>tališča</sub> estra**: 160-162°C (v lit: 162-163°C (40))).

Nato smo v drugi stopnji 990 mg (5,62 mmol) metil 1H-indazol-3-karboksilata raztopili v 50 ml etanola in mu na ledu dodali 0,17 ml (5,62 mmol) hidrazin hidrata. Reakcijsko zmes smo segrevali pod refluksom 12 ur. Po preteklem času smo pod nižanim

tlakom odparili topilo in produkt prekrystalizirali iz vode. Masa nastalih bledorjavih kristalov je znašala 770 mg (4,73 mmol, 78%).

**Rf:** 0,22 (MF: DKM:MeOH = 9:1)

**Izkoristek:** 78%

**Elementna sestava:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O

**M** = 176, 175 g/mol

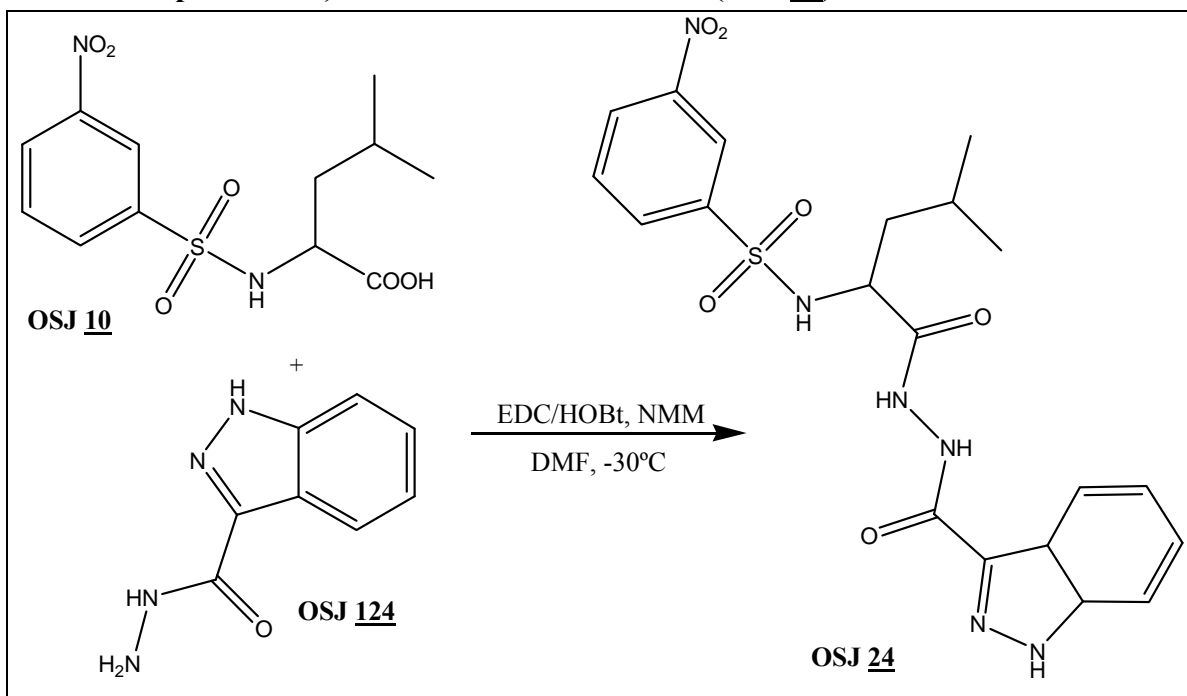
**Opis:** blede rjavi kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 191-200°C

**<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 4.49 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.21-7.26 (m, 1H, Ar-H), 7.38-7.44 (m, 1H, Ar-H), 7.61(d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 8.16 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 9.55 (s, 1H, NH-NH<sub>2</sub>), 13.5 (s, 1H, C=N-NH) ppm

**IR (KBr):** 3367, 3108, 2821, 2668, 2363, 1686, 1407, 1321, 1164, 920, 753, 675, 546 cm<sup>-1</sup>

#### 4.2.11 Sinteza *N*-(1-(2-(3a,7a-dihidro-1H-indazol-3-karbonil)hidrazinil)-4-metil-1-okso-pentan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamida (**OSJ 24**)



300 mg (0,95 mmol) 4-metil-2-(3-nitrofenilsulfonamido) pentanojske kisline (**OSJ 10**) smo raztopili v 5 ml DMF, ohladili na ledeni kopeli in dodali 167 mg (0,95 mmol) spojine **OSJ 124**, 2,6 ml (25,94 mmol) NMM, 0,182 mg (12,97 mmol) EDC in 0,128 mg



(12,97 mmol) Hobt. Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom, preverili če je pH 8 in 24 ur mešali na sobni temperaturi. Nato smo pod znižanim tlakom odparili DMF in ostanku smo dodali 50 ml etilacetata. Raztopino smo spirali dvakrat z 20 ml 10% citronske kisline, dvakrat z 20 ml nasičene vodne raztopine NaHCO<sub>3</sub> in dvakrat s 25 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Združene organske faze smo 15 minut sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (SF:silikagel, MF: DKM:MeOH = 20:1). Masa nastalih rjavih kristalov je znašala 206 mg (0,43 mmol, 46%).

**Rf:** 0,13 (MF: DKM:MeOH = 20:1,)

**Izkoristek:** 46%

**Elementna sestava:** C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S

**M** =474,490 g/mol

**Opis:** rjavi kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 125-128°C

**<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.71 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 1.55-1.33 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-CH), 1.79-1.61 (m, 1H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 3.88-4.14 (m, 1H, CH-NH), 7.33-7.14 (m, 1H, Ar-H), 7.36 (s, 1H, SO<sub>2</sub>-NH), 7.47-7.40 (m, 1H Ar-H), 7.63 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.85 (t, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.09 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-NH), 8.22 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-NH), 8.47-8.39 (m, 1H, Ar-H), 8.61-8.52 (m, 1H, Ar-H), 10.21-9.67 (m, 2H, CO-NH-NH-CO), 13.79-13.50 (m, 1H, C=N-NH) ppm

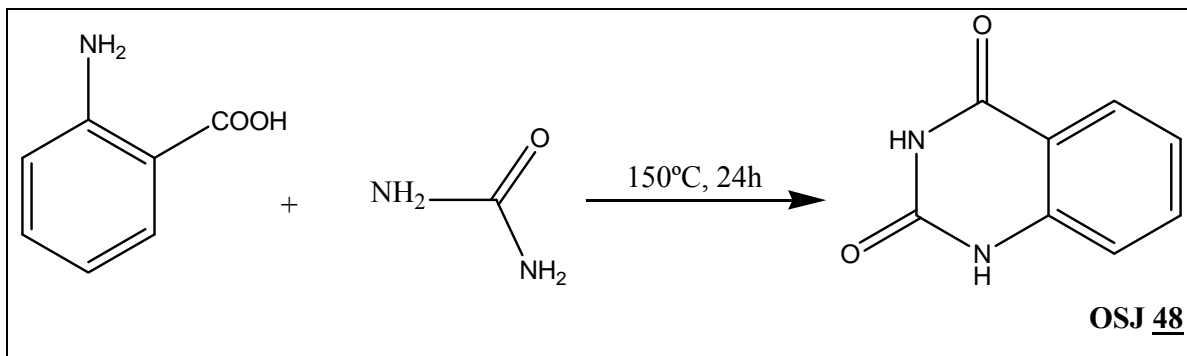
**MS (ESI): m/z (%):** 475 (MH<sup>+</sup>, 100)

**HR-MS: m/z:** 475.1391 (izračunano za C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>6</sub>O<sub>6</sub>S: 475.1400)

**IR(KBr):** 3351, 2959, 2872, 2370, 1664, 1534, 1352, 1171, 1126, 878, 751, 662, 592 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +39,62° (c = 0,26 g/100ml, DMF)

#### 4.2.12 Sinteza kinazolin-2,4(1H,3H)-diona (OSJ 48)

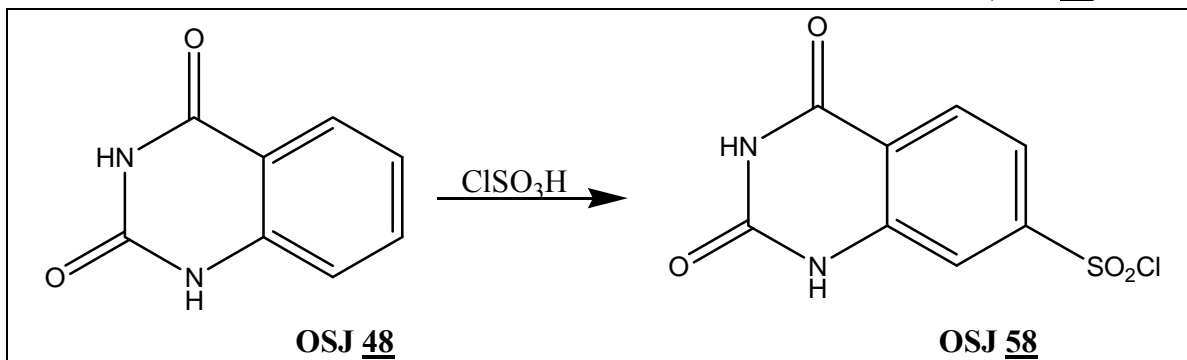


Spojino **OSJ 48** smo sintetizirali po postopku iz članka (33).

10 g (72,9 mmol) 2-aminobenzojske kisline smo natehtali v suho bučko, dodali 43,78 g (729 mmol) sečnine in segrevali na 150°C čez noč. Zmes smo nato ohladili na 100°C in dodali volumsko enak ekvivalent vode. Po 10 minutah smo spojino odfiltrirali, jo resuspendirali v 150 ml NaOH. Nato smo dodali 1M HCl, pri čemer je izpadla svetlorjava oborina. Masa nastalega produkta je znašala 7,77 g (47,48 mmol, 65%).

**T<sub>tališčca</sub>**: nad 300°C (v lit: nad 300°C (34))

#### 4.2.13 Sinteza 2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidrokinazolin-7-sulfonilklorida (OSJ 58)



7,86 ml (108 mmol) klorsulfonske kisline smo ohladili na ledeni kopeli in počasi med mešanjem na ledu dodali 3,5 g (21,6 mmol) spojine **OSJ 48**. Po vsem dodatku smo bučko z reakcijsko zmesjo opremili z vodnim povratnim hladilnikom in jo s klorkalcijevo cevko zaščitili pred atmosfersko vlago. Reakcijo smo pustili potekati čez noč. Nato smo reakcijsko zmes ohladili in vsebino bučke počasi, med stalnim mešanjem zlili na led. Pri tem je izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem. Masa nastalega produkta je znašala 3,964 g (15,21 mmol, 70%).

**Rf:** 0,51 (MF: DKM:MeOH = 20:1)

**Izkoristek:** 53%

**Elementna sestava:** C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>N<sub>2</sub>O<sub>4</sub>SCl

**M** = 260,652 g/mol

**Opis:** svetlo rjavi prašek

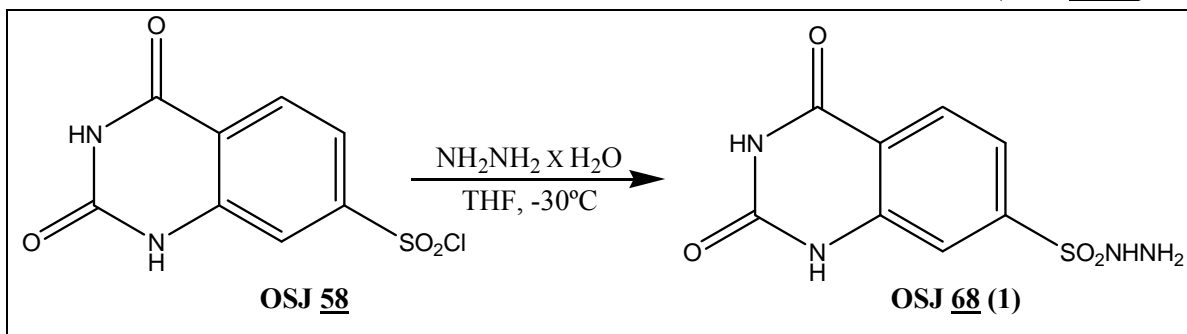
**T<sub>tališča</sub>:** 228-233°C

**<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.82 (dd, *J* = 8.4, 1.9 Hz, 1H, Ar-H), 8.10 (d, *J* = 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 11.23-11.20 (m, 1H, Ar-NH-CO), 11.31-11.26 (m, 1H, Ar-CO-NH) ppm

**MS (ESI): m/z (%):** 259 (M-H<sup>+</sup>, 100)

**IR (KBr):** 3245, 3036, 2840, 1716, 1616, 1438, 1368, 1293, 1175, 1070, 834, 762, 620, 497 cm<sup>-1</sup>

#### 4.2.14 Sinteza 2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidrokinazolin-7-sulfonohidrazida (OSJ 68(1))



300 mg (1,15 mmol) spojine **OSJ 58** smo raztopili v 30 ml THF in raztopino ohladili na ledu, kateremu je bil dodan NaCl in CaCl<sub>2</sub> (do približno -30°C). V drugi bučki smo raztopili 0,36 ml (11,5 mmol) hidrazin monohidrata v 20 ml THF in to raztopino nato počasi po kapljicah s kapalnikom dodajali v raztopino 2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidrokinazolin-7-sulfonilklorida. Reakcijsko zmes smo nato 24 ur mešali na sobni temperaturi. Po končani reakciji smo odparili topilo in nastali produkt čistili s kolonsko kromatografijo (SF: silikagel, MF: DKM:MeOH = 20:1). Masa nastalih belih kristalov je znašala 204 mg (0,80 mmol, 69%).

**Rf:** 0,19 (MF: DKM:MeOH = 20:1)

**Izkoristek:** 69%

**Elementna sestava:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O<sub>4</sub>S

$M = 256,239$  g/mol

**Opis:** beli kristali

$T_{\text{tališča}}: 182-192^{\circ}\text{C}$

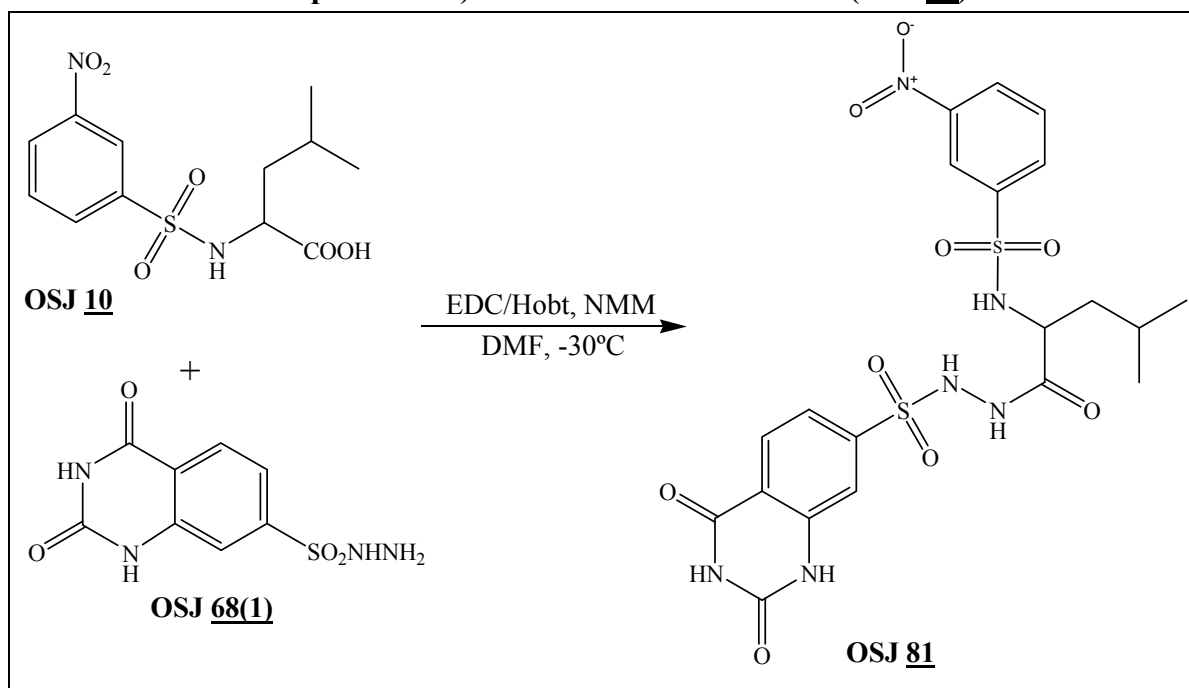
$^1\text{HNMR}$  (300MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  4.21-4.05 (m, 2H,  $\text{NH-NH}_2$ ), 7.31 (d,  $J = 8.6$  z, 1H  $\text{NH-NH}_2$ ), 7.98 (dd,  $J = 8.6, 2.1$  Hz, 1H, Ar-H), 8.28 (d,  $J = 2.1$  Hz, 1H, Ar-H), 8.40 (s, 1H, Ar-H), 11.81-11.31 (s, 2H, Ar-CO-NH, Ar-NH-CO) ppm

**MS (ESI):**  $m/z$  (%): 257 ( $\text{MH}^+$ , 25), 227 (100)

**HR-MS:**  $m/z$ :  $\text{MH}^+$  257,0350 (izračunano za  $\text{C}_8\text{H}_9\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$ : 257,0345)

**IR (KBr):** 3600, 3336, 3211, 3034, 2818, 1740, 1681, 1624, 1441, 1287, 1169, 1118, 1074, 1002, 832, 756, 585, 509  $\text{cm}^{-1}$

#### 4.2.15 Sinteza *N*-(1-(2-(2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidrokinazolin-7-ilsulfonil)hidrazinil)-4-metil-1-okso-2-pentanol)-3-nitrobenzensulfonamida (**OSJ 81**)



200 mg (0,632 mmol) spojine **OSJ 10** smo raztopili v 5 ml DMF, ohladili na ledeni kopeli in dodali 185 mg (0,72 mmol) spojine **OSJ 68(1)**, 2,6 ml (25,94 mmol) NMM, 0,182 mg (12,97 mmol) EDC in 0,128 mg (12,97 mmol) Hobt. Reakcijsko zmes smo nato odstavili iz ledu, prepihali z argonom in z NMM uravnali pH na 8. Reakcijo smo na sobni temperaturi pustili potekati čez noč. Po pretečenem času smo pod znižanim tlakom odparili DMF in produkt očistili s kolonsko kromatografijo (SF: silikagel, MF: DKM:MeOH =

20:1) in nato še dodatno s prekrystalizacijo iz vode. Masa očiščenih svetlozelenih kristalov je znašala 30 mg (0,054 mmol, 9%).

**Rf:** 0,34 (MF: DKM:MeOH = 20:1)

**Izkoristek:** 9%

**Elementna sestava:** C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>

**M** = 554,55 g/mol

**Opis:** svetlozeleni kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 182-186°C

**<sup>1</sup>HNMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 0.71 (d, *J* = 6.5 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 0.80 (d, *J* = 6.6 Hz, 3H, CH-CH<sub>3</sub>), 1.50-1.37 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 1.77-1.60 (m, 1H, CH-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>), 1.78-1.57 (m, 1H, CH-NH), 5.86 (s, 1H, CH-NH-CO), 7.18 (d, *J* = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.60 (t, *J* = 8.0, 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.7 (s, 1H, SO<sub>2</sub>-NH), 8.02-7.93 (m, 1H, Ar-H), 8.12 (dd, *J* = 8.1, 1.4 Hz, 1H, Ar-H), 8.34-8.26 (m, 2H, Ar-H), 8.57-8.42 (m, 1H, Ar-H), 11.61 (s, 2H, s, 2H, Ar-CO-NH, Ar-NH-CO) ppm

**MS (ESI): m/z (%):** 555 (MH<sup>+</sup>, 45), 271 (100)

**HR-MS: m/z:** MH<sup>+</sup> 555,0944 (izračunano za C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>N<sub>6</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>: 555,0968)

**IR (KBr):** 3411, 2926, 2362, 1706, 1617, 1534, 1353, 1174, 1121, 1073, 1018, 833, 607, 498 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -20,1° (c = 0,2 g/100ml, MeOH)

## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo uspešno sintetizirali 10 končnih spojin, ki naj bi bili nizkomolekularni inhibitorji MurC ali MurD encimov. Po končanih analiznih postopkih, s katerimi smo dokazali identiteto in čistoto naših spojin, smo spojine še biokemijsko testirali.

### 5.1 Razprava o sintezah spojin

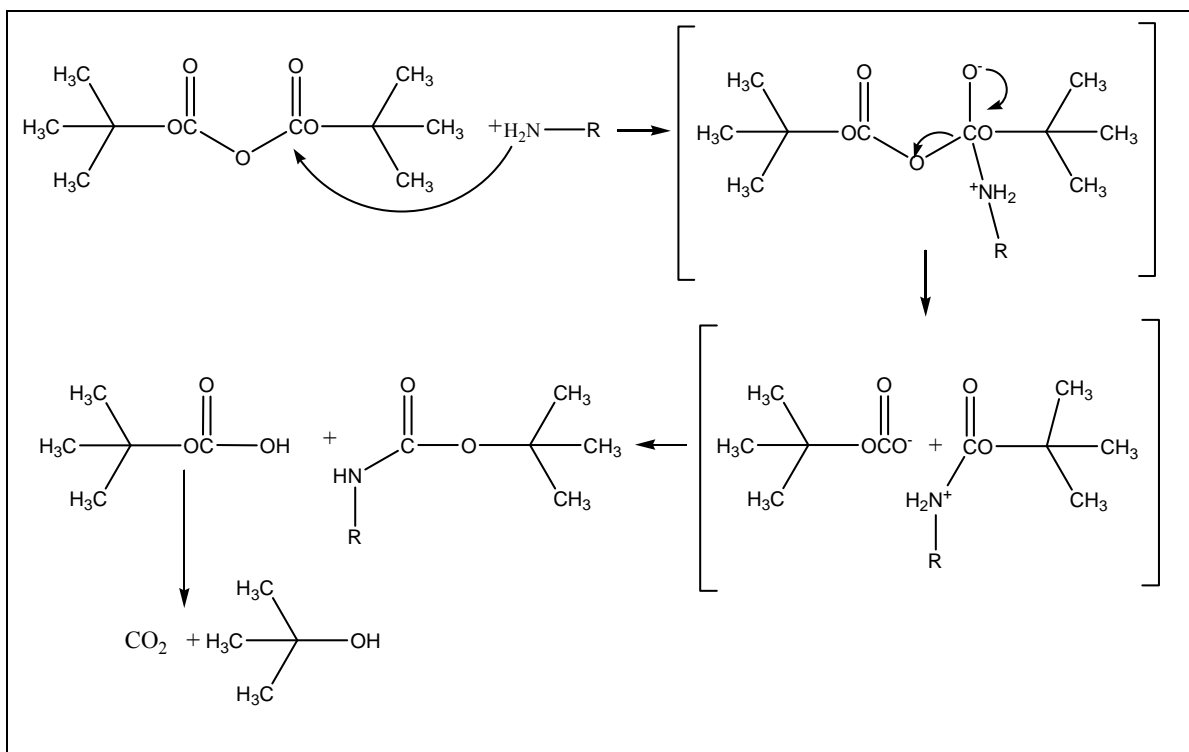
#### 5.1.1 Zaščita amino skupine L-levcina (OSJ 6)

Aminska skupina L-levcina je boljši nukleofil kot njegova karboksilna skupina in bi lahko motila nadaljnji potek reakcij. Z reagentom di-*tert*-butildikarbonatom (BOC)<sub>2</sub> smo jo zaščitili v obliki karbamata, pri čemer je potekla nukleofilna adicija s sledečo eliminacijo, oz. N-aciliranje. Aminska skupina je kot nukleofil reagirala s karbonilnim ogljikom (BOC)<sub>2</sub>O, pri čemer so kot končni produkti nastali N-(*tert*-butiloksikarbonil)L-levcin (OSJ 6), CO<sub>2</sub> in *tert*-butilni alkohol (slika 13).

V molekuli L-levcina smo imeli dve nukleofilni skupini (NH<sub>2</sub>, COOH), ki bi lahko reagirali z (BOC)<sub>2</sub>O. Z izbiro ustreznih reakcijskih pogojev (kontrolirana nižja temperatura, voda/dioksan kot topilo) smo usmerili reakcijo pretežno v nastajanje N-aciliranega produkta. Aminska skupina je nasploh močnejši nukleofil kot karboksilna skupina, z nižjo temperaturo pa smo še dodatno zmanjšali možnost nastanka O-aciliranega produkta. S tem ko smo (BOC)<sub>2</sub>O dokapavali na ledeni kopeli, smo se izognili njegovi morebitni hidrolizi. Dioksan smo kot topilo izbrali zato, ker se dobro meša z nepolarnimi in polarnimi topili. Tako smo izboljšali topnost reagenta ((BOC)<sub>2</sub>O) kot tudi topnost našega produkta. Pričakovali smo, da je naš produkt v dioksanu topen, v vodi pa netopen. Z dodatkom NaOH smo aminske skupine ohranili v nukleofilni neionizirani obliki.

Po poteku reakcije smo pod znižanim tlakom odparili dioksan, preostanku v bučki dodali hladno vodo ter vodno raztopino nakisali z 1M HCl do pH 2. S tem smo produkt pretvorili v neionizirano obliko in ga nato iz vode ekstrahirali z etilacetatom. S tem smo se znebili prebitnega L-levcina, ki se je pri nakisanju protoniral in tako ostal v vodni fazi.

Preostalo vodo iz organske faze smo odstranili s sušilnim sredstvom  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , nato pa odparili etilacetat pod znižanim tlakom in produkt dobili v obliki belih kristalov.



*Slika 13: Mehanizem zaščite  $\text{NH}_2$  skupine z di-terc-butildikarbonatom*

### 5.1.2 Zaščita karboksilne skupine L-levcina (**OSJ 3**) in njena odstranitev (**OSJ 10**)

Pri drugi sintezni poti smo v obliki metilnega estra zaščitili karboksilno skupino L-levcina. Pri reakciji nastali HCl je  $\text{NH}_2$  skupino L-levcina pretvoril v deaktivirano  $\text{NH}_3^+$  skupino, hkrati pa je potekla nukleofilna substitucija med aktivirano karboksilno skupino in metanolom, pri čemer je nastal metilni ester L-levcina. Produkt je po prekrizaciji iz dietiletra z visokim 98% izkoristkom izpadel v obliki belih kristalov.

V naslednji stopnji smo tvorili sulfonamidno vez med aaminsko skupino spojine **OSJ 3** in 3-nitrobenzen-1-sulfonilkloridom. Dobili smo spojino **OSJ 5**, ki smo ji v nadaljnjem odstranili zaščitno estersko skupino. Zaščitne estre ponavadi odstranjujemo v alkalnih pogojih, mi pa smo se odločili za odstranitev v kislem. V prvem poskusu smo spojini **OSJ 5** dodali 1M HCl in reakcijsko zmes pod refluxom segrevali 1 uro. TLC je pokazal, da po eni uri ni nastalo še nič zelenega produkta, zato smo reakcijo pustili potekati čez noč. Naslednji dan smo s TLC analizo ugotovili, da je v reakcijski zmesi še

vedno, skoraj izključno prisotna nezreagirana izhodna spojina. V drugem poskusu smo postopek odstranitve malo spremenili. Spojino **OSJ 5** smo raztopili v metanolu, ji dodali 2M HCl in vse skupaj segrevali pod refluxom. Tudi ta reakcija se je po TLC analizi izkazala za neuspešno. Reakcijo smo nato izvedli v acetonu, dodali 2M HCl in segrevali pod refluxom 12 ur. Postopek je bil uspešen, saj je reakcija potekla z visokim 96% izkoristkom.

### 5.1.3 Sinteza hidrazidov

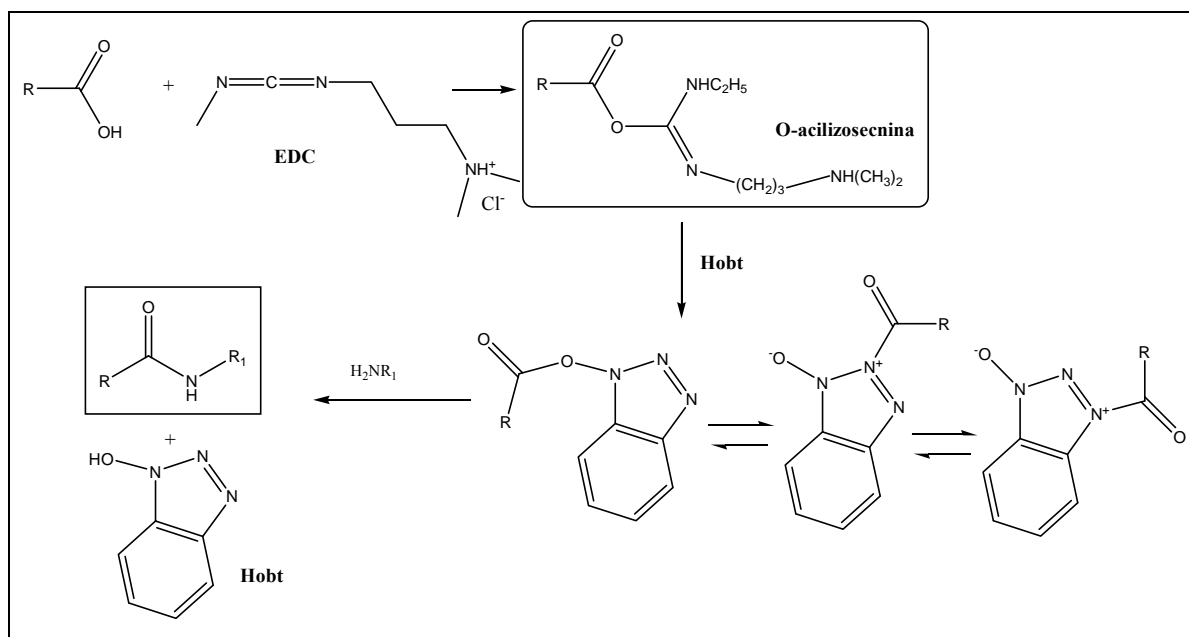
Hidrazin monohidrat ( $\text{NH}_2\text{NH}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ), ki smo ga uporabili pri sintezi hidrazidov, je 64% raztopina brezvodnega hidrazina v vodi. Hidrazin monohidrat je zelo reaktiven in hitro eksotermno reagira z dobrimi elektrofilni. V našem primeru sulfonilkloridi, pri čemer smo dobili spojini **OSJ 26** in **OSJ 68(1)**. Z njim smo tvorili tudi karbohidrazidno vez med metilnimi estri aromatskih spojin in prosto amino skupino hidrazin monohidrata. Na ta način smo sintetizirali 4 pomembne vmesne spojine: **OSJ 119**, **OSJ 122**, **OSJ 123** in **OSJ 124**. Reakcije smo izvajali zelo previdno in pod kontroliranimi pogoji, to je pri zelo nizki temperaturi.

### 5.1.4 Tvorba amidne vezi z reagentoma EDC in Hobt

Amidno vez smo tvorili s karbodiimidno metodo, to je s pomočjo Hobt in EDC (slika 14). Ker karboksilna skupina kisline ni dovolj reaktivna, jo moramo aktivirati. Vloga EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid) je aktivacija kislinske karboksilne skupine, s katero tvori aktiviran ester in s tem poveča elektrofilnost karbonilnega C-atoma. Primarna aminska skupina substituiranega hidrazida deluje kot nukleofil, napade elektrofilen C-atom karbonilne skupine karboksilne skupine, nato pa pride do izstopa sečninskega derivata. Princip reakcije je nukleofilna substitucija na karbonilnem C-atomu. Karboksilatni anion se veže na protoniran karbodiimid, pri čemer nastane zelo reaktivna O-acilizosečnina. Ta reagira z aminsko skupino, nastane peptid in vodotopen derivat sečnine, ki ga pri ekstrakciji z vodo enostavno odstranimo. O-acilizosečnina lahko napade drug karboksilat, nastane simetrični anhidrid, ki prav tako lahko reagira z aminsko skupino in pride do nastanke amidne vezi. Premestitev acilne skupine iz O na N pri O-acilizosečnini je neželen stranski produkt, ki lahko poteče pri tej



metodi. Nastanek N-acilsečnine in še mnogo drugih stranskih produktov (ciklizacij, racemizacij, premestitev, tvorbo simetričnih anhidridov) smo preprečili z dodatkom Hobt (1-hidroksibenzotriazola) v reakcijsko zmes. Hobt tvori z O-acilizosečnino aktivirane benzotriazolne estre, pri katerih aminoliza poteka veliko hitreje. V reakcijsko zmes smo dodali tudi NMM (N-metilmorfolin), bazo, s katero smo pH vrednost uravnali na 8. Takšen pH prepreči odcepitev protona iz amidne vezi pri nizkem pH in posledično nastanek racemizacije. Odgovoren pa je tudi za ionizacijo karboksilne kisline, ki tako lažje napade ogljikov atom karbodiimida EDC.



*Slika 14: Sinteza amidne vezi z uporabo EDC in Hobt*

Opisano metodo smo uporabili pri sintezi obeh tipov spojin.

Pri prvi sintezni poti smo na ta način sintetizirali vmesno spojino **OSJ 17(1)**, ki smo ji v nadaljnji reakciji odstranili zaščitno aminske skupine. Produkt smo izolirali z ekstrakcijo. Najprej smo organsko fazo spirali z 10% vodno raztopino citronske kisline in na ta način odstranili bazične spojine (prebitni NMM, EDC in Hobt ter nezreagirane izhodne spojine). S spiranjem z nasičeno vodno raztopino NaHCO<sub>3</sub> smo nevtralizirali pri reakcijski zmesi prisotne spojine. Na koncu smo organsko fazo sprali še z nasičeno raztopino NaCl in z njo vezali odvečno vodo prisotno v organski fazi. Vodo smo nato odstranili še kvantitativno, tako da smo organsko fazo sušili s sušilnim sredstvom Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Končni produkt smo očistili s flash kromatografijo. Reakcija je potekla s 40% izkoristkom.

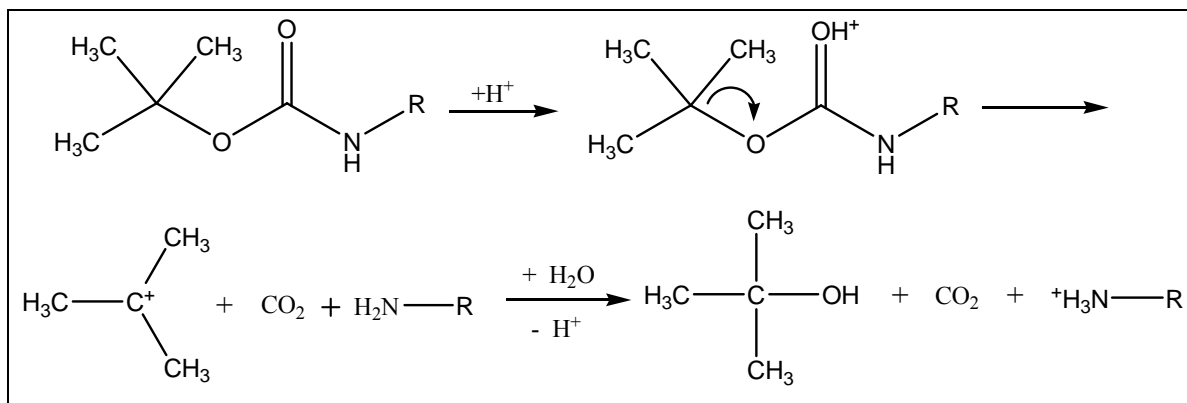
Po drugi sintezni poti je sinteza vseh končnih spojin potekala po enakem postopku. Spojino **OSJ 10** smo raztopili v DMF, jo ohladili na ledeni kopeli do približno  $-30^{\circ}\text{C}$  in dodali ustrezen hidrazin. Z NMM smo pH raztopine uravnali na 8 in dodali enako množino EDC in Hobt. Na ta način smo sintetizirali pet končnih spojin: **OSJ 19**, **OSJ 22**, **OSJ 23**, **OSJ 24** in **OSJ 81**. Spojine **OSJ 19**, **OSJ 22**, **OSJ 23** in **OSJ 24** smo izolirali z ekstrakcijami po enakem postopku kot pri spojini **OSJ 17(1)**. Glavni problem je predstavljalo čiščenje reakcijske zmesi. Reakcije so potekale v DMF, ki ga ni mogoče povsem odpariti pod znižanim tlakom, ker ima vrelišče pri  $180^{\circ}\text{C}$ . Odstranili smo ga z ekstrakcijo z 10% raztopino citronske kisline. Spojino **OSJ 19** smo prekristalizirali iz etanola, ostale pa smo očistili s kolonsko kromatografijo. Reakcije so potekale z nizkimi izkoristki, največji je bil pri spojini **OSJ 22** in sicer 63%. Sklepali smo, da so slabi izkoristki reakcij posledica velikih izgub pri ekstrakciji, zato smo pri spojini **OSJ 81** postopek ekstrakcije izpustili in produkt poskušali izolirati direktno iz reakcijske zmesi s kolonsko kromatografijo. Postopek ni bil uspešen, saj smo po razvitju kromatograma videli, da imata spojina **OSJ 81** in reagent Hobt podoben retencijski faktor, zato teh dveh spojin nismo uspeli ločiti. Končni produkt smo nato prekristalizirali iz vode in pri tem izkoristili dejstvo, da je reagent Hobt topen v vodi, medtem ko naša spojina ni. Tekom čiščenja so se nabirale izgube, posledično smo tudi v tem primeru dobili nizek izkoristek.

### 5.1.5 Odstranitev *tert*-butiloksikarbonilne (BOC) zaščite (**OSJ 34**)

*Tert*-butiloksikarbonilno (BOC) zaščitno skupino smo odstranili tako, da smo spojino **OSJ 17(1)** raztopili v dietiletru, nato pa smo raztopino spojine na ledu 30 minut prepihovali s plinastim HCl v brezvodnih pogojih. V kislem je pri BOC zaščitni skupini prišlo do heterolitičnega razcepa C-O vezi, pri čemer nastane karbokation  $^+\text{C}(\text{CH}_3)_3$ , ki je stabiliziran zaradi pozitivnega induktivnega efekta metilnih skupin (slika 15).

BOC zaščitno skupino, ki jo odstranjujemo v kislem, smo uspeli odstraniti tudi z dodajanjem trifluoroocetne kisline. Spojino **OSJ 17(1)** smo raztopili v dietiletru, jo ohladili na ledu in počasi dodali trifluoroocetno kislino. Reakcijo smo pustili potekati čez noč. Po poteku reakcije smo prebitno trifluoroocetno kislino in pri reakciji nastali *tert*-butanol odstranili z odparevanjem pod znižanim tlakom. Ko smo preostanku ponovno dodali dietileter, je izpadla bela oborina, saj je bil amin v obliki soli s trifluoroocetno kislino in tako

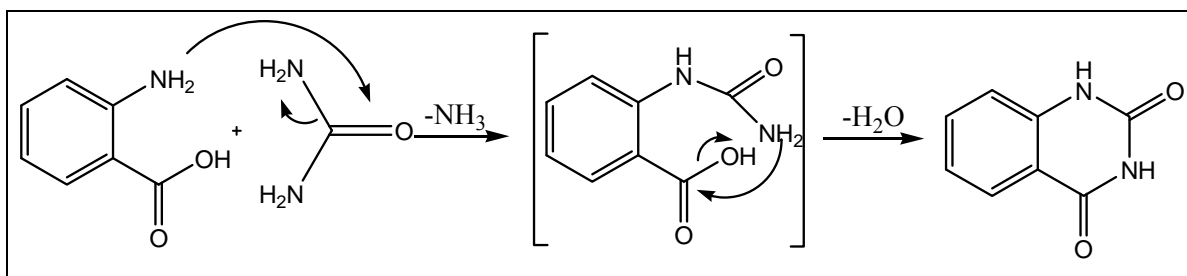
netopen v nepolarnem topilu. Tudi pri tej reakciji smo dobili visok izkoristek, vendar smo zaradi dolgotrajnejšega postopka *tert*-butiloksikarbonilno raje odstranjevali z uvajanjem plinastega HCl.



Slika 15: Mehanizem cepitve BOC zaščite v kislem

### 5.1.6 Sinteza kinazolin-2,4(1H, 3H)-diona (OSJ 48)

Kondenzacija (adicija s sledečo eliminacijo) kinazolin-2,4(1H, 3H)-diona iz 2-aminobenzojske kisline in sečnine poteka pri povišani temperaturi. Pri tem  $\text{NH}_2$  skupina 2-aminobenzojske kisline kot nukleofil tekmuje s sečninskima  $\text{NH}_2$  skupinama in napade elektrofilen C-atom sečnine, temu sledi izstop  $\text{NH}_2$  skupine. Prosta  $\text{NH}_2$  skupina acikličnega ureida nato napade karbonilni C-atom, poteče intermolekularna ciklizacija z izstopom dobro izstopajoče hidroksilne skupine (slika 16).



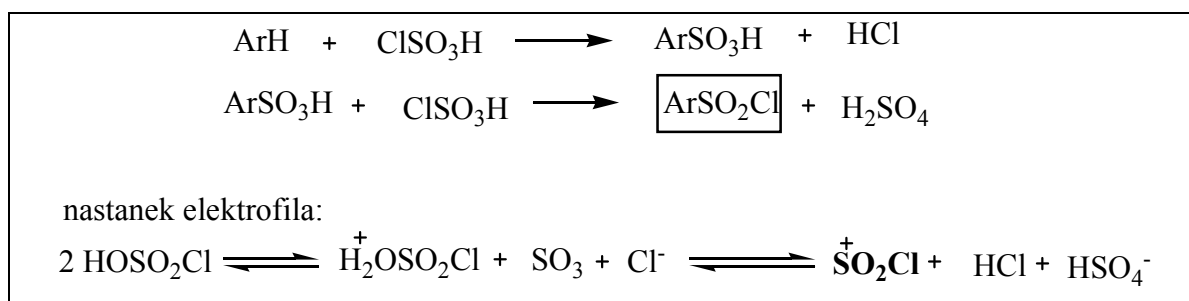
Slika 16: Mehanizem nastanka kinazolin-2,4(1H, 3H)-diona

Po potekli reakciji smo zmesi dodali vodo. Pri tem se je nezreagirana sečnina raztopila, našo spojino pa smo filtrirali in jo izolirali preko tvorbe soli z NaOH. Po

nakisanju z 1M HCl je izpadel svetlorjav prašek, ki smo ga prekrystalizirali iz metanola in vode.

### 5.1.7 Priprava aromatskih sulfonilkloridov (OSJ 46 in OSJ 58)

Spojini OSJ 46 in OSJ 58 smo pripravili tako, da smo klorsulfonsko kislino najprej ohladili na ledu in ji nato med mešanjem počasi dodali ustrezen aromat. Pri tem smo vzeli petkratni prebitek klorsulfonske kisline in tako reakcijo usmerili v nastajanje sulfonilklorida. Reakcija poteče po mehanizmu elektrofilne aromatske substitucije in poteka v dveh stopnjah. V prvi stopnji najprej nastane sulfonski derivat, šele v drugi stopnji pa dobimo ustrezen sulfonilklorid (slika 17).



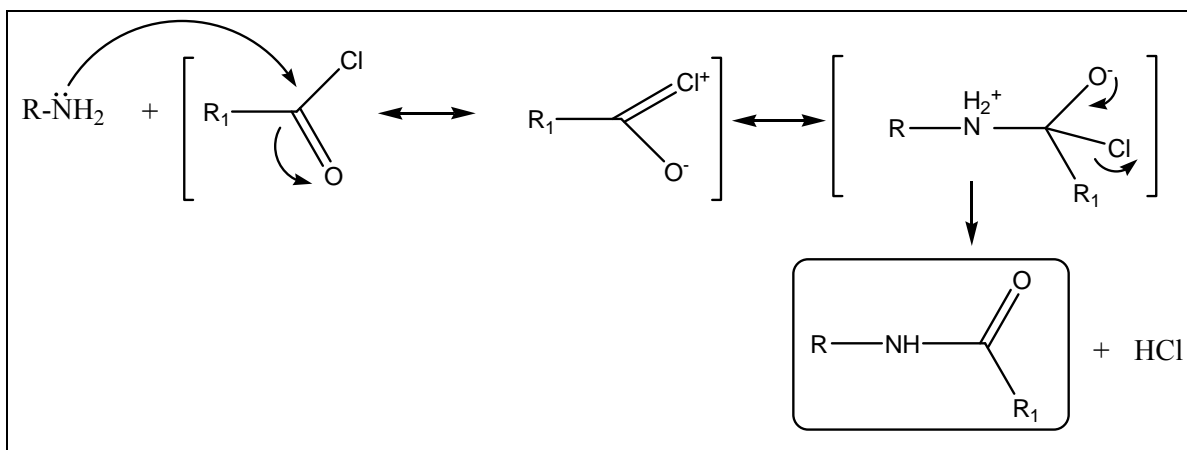
*Slika 17: Klorosulfoniranje aromatskega obroča in nastanek elektrofila*

Da se reakcija ne ustavi na prvi stopnji, je odločilen prebitek klorsulfonske kisline in ustrezna temperatura. Klorsulfonska kislina je zelo agresivna kislina, ki ima vrelišče pri 152°C, zato smo bili pri delu z njo izredno previdni. Reakcijsko zmes smo segrevali pod refluxom in jo s klorkalcijevo cevko zaščitili pred atmosfersko vlago. Klorsulfonska kislina namreč močno eksotermno reagira z vodo, pri tem se sproščata plinasti HCl in žveplova (VI) kislina.

Vsebino bučke smo nato zlili na led in tako izolirali spojini OSJ 46 in OSJ 58. Pri tem smo prebitno klorsulfonsko kislino hidrolizirali z vodo v žveplovo (VI) kislino in HCl, sproščena toplota pa se je porabila za taljenje ledu. Če bi se zmesi temperaturi dvignila, bi sulfonilklorid hidroliziral do sulfonske kisline.

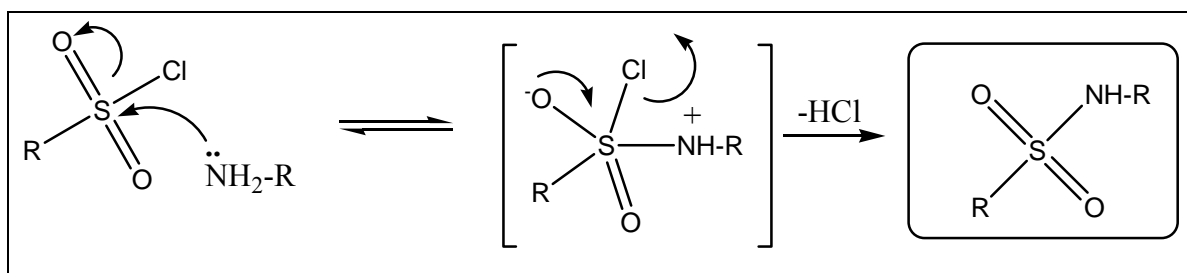
### 5.1.8 Pripenjanje različnih substituentov na prosto aminske skupino

Benzoilklorid, ki smo ga pripeli na prosto aminske skupino, spada med kislinske kloride, ki so najbolj reaktivni derivati karboksilnih kislin. Z njim smo tvorili amidno vez in tako dobili eno izmed končnih spojin. Reakcijo poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije. Nukleofilna  $\text{NH}_2$  skupina s prostim elektronskim parom napade elektrofilen C-atom. Nakar sledi izstop dobro izstopajoče skupine, v našem primeru klora (slika 18).



*Slika 18: Mehanizem nastanka amidne vezi med aminom in kislinskim kloridom*

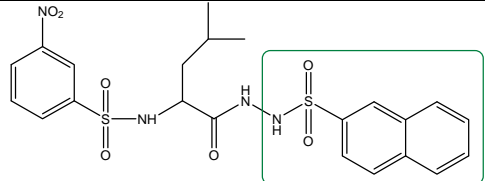
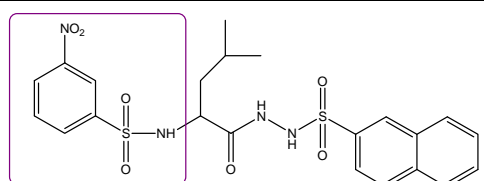
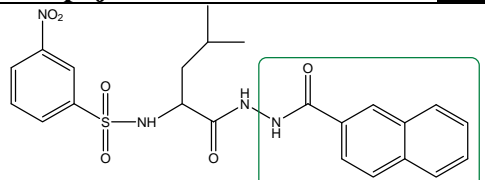
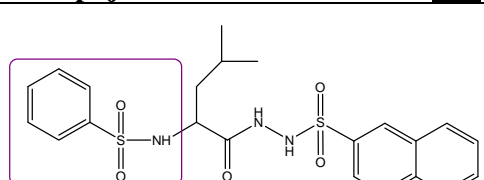
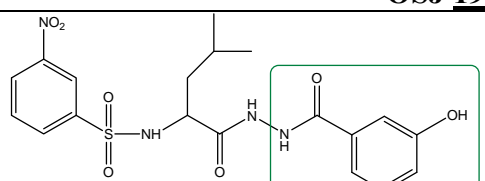
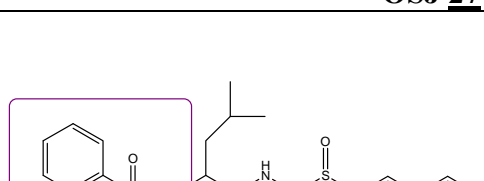
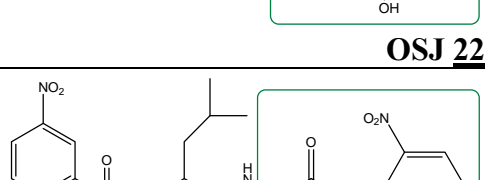
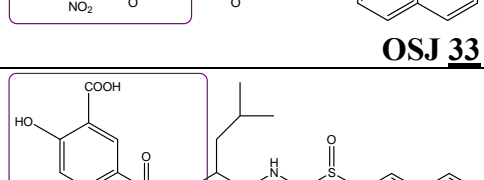
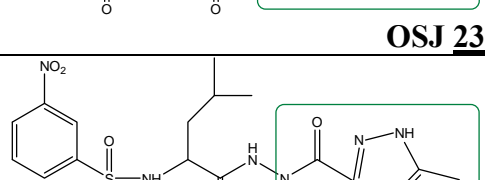
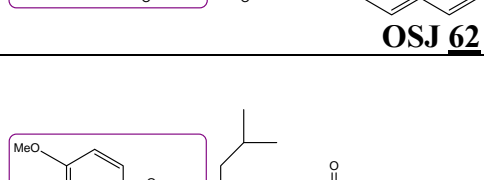
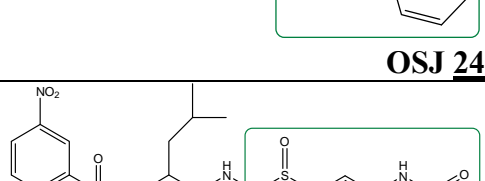
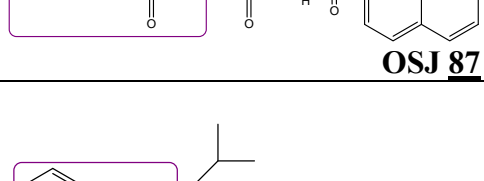
Pripenjanje sulfonilkloridov prav tako poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije (slika 19).



*Slika 19: Mehanizem nastanka sulfonamidne vezi med aminom in sulfonilkloridom*

## 5.2 Pregled sintetiziranih končnih spojin

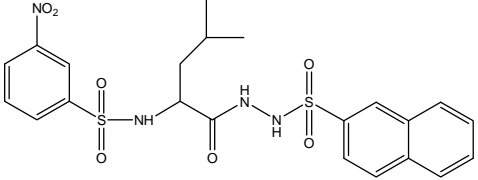
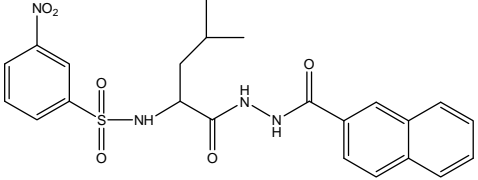
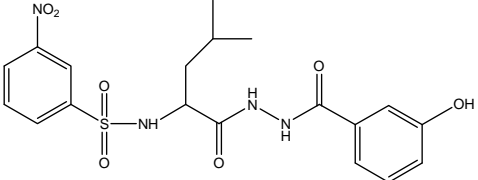
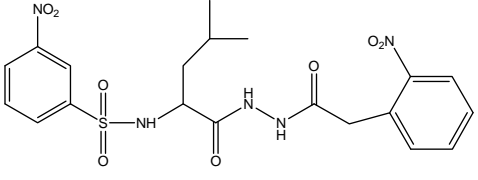
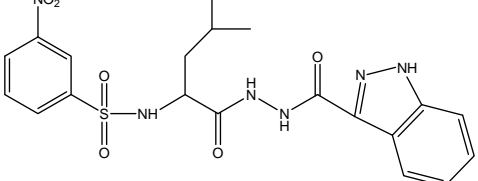
Za boljšo predstavo in primerjavo substituent spojin so v preglednici IX predstavljene strukture vseh končnih spojin.

str. sint.	Strukturna formula in oznaka spojine	str. sint.	Strukturna formula in oznaka spojine
-	 <p><b>spojina vodnica ORF 311</b></p>	-	 <p><b>spojina vodnica ORF 311</b></p>
48	 <p><b>OSJ 19</b></p>	37	 <p><b>OSJ 27</b></p>
50	 <p><b>OSJ 22</b></p>	38	 <p><b>OSJ 33</b></p>
53	 <p><b>OSJ 23</b></p>	40	 <p><b>OSJ 62</b></p>
55	 <p><b>OSJ 24</b></p>	42	 <p><b>OSJ 87</b></p>
59	 <p><b>OSJ 81</b></p>	43	 <p><b>OSJ 97</b></p>

**Preglednica IX:** Pregled sintetiziranih končnih spojin v primerjavi s strukturo spojine vodnice (str.sint = stran sinteze)

### 5.3 Rezultati biokemijskega testiranja spojin

Sintetizirane končne spojine, ki so levcinhidrazidni derivati, smo biokemijsko testirali na encimih MurC in MurD. Na žalost pa štirim končnim spojinam inhibitorna aktivnost na MurC ni bila določena, saj je ravno v času izdelave naše diplomske naloge zmanjkalo tega encima. Rezultati testiranja so podani v preglednici X.

Oznaka spojine	Struktura	M (g mol <sup>-1</sup> )	Konc. (μM)	RA%	
				MurC	MurD
<b>ORF <u>311</u></b> <b><u>Spojina</u></b> <b><u>vodnica</u></b>		520,579	250	<b>43</b>	<b>100</b>
<b>OSJ <u>19</u></b>		484,52	100	<b>precipitacija</b>	
<b>OSJ <u>22</u></b>		466,465	250	<b>103</b>	<b>94</b>
<b>OSJ <u>23</u></b>		493,490	100	<b>100</b>	<b>98</b>
<b>OSJ <u>24</u></b>		474,490	100	<b>77</b>	<b>92</b>

<b>OSJ <u>81</u></b>		554,553	500	-	<b>56</b>
<b>OSJ <u>27</u></b>		475,581	250	<b>75</b>	<b>90</b>
<b>OSJ <u>33</u></b>		520,579	100	<b>70</b>	<b>100</b>
<b>OSJ <u>62</u></b>		535,59	500	-	<b>97</b>
<b>OSJ <u>87</u></b>		505,607	250	-	<b>96</b>
<b>OSJ <u>97</u></b>		439,527	500	-	<b>96</b>

**Preglednica X:** Rezultati testiranja inhibitorne aktivnosti na encima *MurC* in *MurD*

Rezidualna aktivnost encima (RA) predstavlja razmerje katalitičnih aktivnosti encima ob prisotnosti inhibitorja in aktivnost encima brez inhibitorja. Izrazimo jo v odstotkih in je merilo za učinkovitost inhibitorja. S primerjavo RA spojin dobimo podatke o učinkovitosti ter o odnosu med strukturo in delovanjem spojin. Metoda z malhitnim zelenim poteka z določevanjem fosfata, ki nastane pri reakciji katalizirani z encimoma. Manjša kot je RA, v večji meri inhibitor pri dani koncentraciji upočasni encimsko katalizirano reakcijo. Vrednosti RA med 80-100% so v mejah eksperimentalne napake, zato spojine s takšno aktivnostjo opredelimo kot neaktivne. Tudi vrednosti nad 100% so verjetno posledica eksperimentalnih napak.



Spojina **OSJ 19**, ki smo ji v primerjavi s spojino vodnico naftalensko sulfonsko skupino zamenjali z karboksi skupino, niso mogli določiti RA zaradi interakcij s testom med njegovim izvajanjem. Zaradi tega ne moremo sklepati, če je za inhibitorno aktivnost nujna sulfonska skupina ali je primerna tudi karboksi skupina. Pri rezultatih je potrebno omeniti, da so bile v vseh primerih spojine testirane v prisotnosti 0,005% koncentracije Tritona X-114. Ta ima vlogo solubilizatorja ki prepreči tvorbo agregatov inhibitorja in s tem možnost inhibicije.

Encim MurC je najbolje inhibirala spojina **OSJ 33**. RA zanjo za encim MurC znaša 70% pri 100  $\mu\text{M}$  koncentraciji. Po primerjavi s spojino vodnico lahko sklepamo, da zamenjava meta-nitro skupine na benzenovem obroču z orto-nitro skupino zmanjša inhibitorno aktivnost spojine. Tako lahko le majhna sprememba lege nitro skupine na benzenovem obroču spremeni učinkovitost inhibicije na encimu.

Spojina **OSJ 27**, ki je v primerjavi s spojino vodnico brez substitucije benzenovega obroča prav tako kaže šibko inhibitorno aktivnost, ki pa je slabša kot pri spojini vodnici. Iz tega lahko potrdimo, da je substitucija benzenovega obroča ugodnejša za inhibitorno aktivnost. Šibko aktivni spojini **OSJ 27** in **OSJ 33**, prav tako kot spojina vodnica, vsebujeta v svoji strukturi naftalenski del, zato lahko sklepamo, da je ta pomemben za inhibitorno delovanje na encimu MurC. To lahko potrdimo tudi pri spojini **OSJ 24**, kjer je naftalensulfonski del molekule zamenjan z indazolnim delom. Spojina sicer izkazuje šibko inhibitorno aktivnost, je pa ta najmanjša od spojin, ki izkazujejo aktivnost. Bistvenega pomena za nadaljne zaključke bodo zato podatki o inhibiciji spojin **OSJ 62**, **OSJ 87** in **OSJ 97**, ki prav tako vsebujejo naftalenski obroč in jih za sedaj še nimamo.

Spojina **OSJ 62**, bi lahko bila potencialno dober inhibitor encima MurC. Benzenski obroč ima namreč substituiran z dvema polarnima skupinama (-OH in -COOH), ki bi lahko tvorile H-vezi z aminokislinskimi preostanki na encimu. Ali sta ti dve spojini res pomembni za vezavo na aktivno mesto, bomo lahko sklepali šele, ko bodo na voljo rezultati biokemijskega testiranja.

Medtem ko so encim MurC do določene mere inhibirale tri spojine, je encim MurD inhibirala samo spojina **OSJ 81**. Na ta encim so bile potestirane vse spojine, a so vrednosti za ostale spojine v mejah eksperimentalne napake. Spojini **OSJ 81** so pri koncentraciji 500  $\mu\text{M}$  določili RA za inhibicijo encima MurD 56%. Poleg vrednosti rezidualne aktivnosti predstavlja pomemben podatek tudi koncentracija spojine, pri kateri spojina inhibira določen

encim. 500  $\mu\text{M}$  koncentracija je prevelika, zato ta spojina ni zanimiva za nadaljne raziskave.

## 6 SKLEP

V okviru diplomskega dela smo načrtovali in sintetizirali serijo novih levcinhidrazidnih inhibitorjev Mur-ligaz. Pri tem smo kot spojino vodnico uporabili *N*-(4-metil-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksopentan-2il)-3-nitrobenzensulfonamid (**ORF 311**), ki je z RA 43% dokaj dober inhibitor encima MurC, predvsem pa ima izraženo protibakterijsko delovanje (MIC = 128  $\mu\text{g/ml}$ ).

Z modifikacijo spojine vodnice smo po dveh različnih sinteznih poteh pripravili serijo dveh tipov spojin. Pri prvi sintezni poti smo z različnimi substituenti zamenjali 3-nitrofenilsulfonilni del, pri drugi sintezni poti pa naftalen-2-sulfonilni del spojine vodnice. Sintetizirali smo deset končnih spojin (**OSJ 19**, **OSJ 22**, **OSJ 23**, **OSJ 24**, **OSJ 27**, **OSJ 33**, **OSJ 62**, **OSJ 81**, **OSJ 87**, **OSJ 97**), katerim je vsem skupen levcinhidrazidni osnovni skelet.

Z ustreznimi analiznimi postopki smo nato dokazali strukturno ustreznost in čistost spojin in jim z encimsko metodo določili inhibitorno aktivnost na encima MurC in MurD. Na encim MurD je bilo testiranih vseh deset končnih spojin, na encim MurC pa samo šest. Ugotovili smo, da tri spojine (**OSJ 24**, **OSJ 27**, **OSJ 33**) kažejo šibko inhibitorno aktivnost na encim MurC. Nobena od sintetiziranih spojin pa se ni izkazala kot učinkovit inhibitor encima MurD. Inhibitorne aktivnosti nismo mogli določiti spojini **OSJ 19**, ki je interagirala s testom.

Da bi bolje razumeli odnos med strukturo in delovanjem bi bilo v prihodnje potrebno spojini **OSJ 19** določiti rezidualno aktivnost na encima MurC in MurD, spojinam **OSJ 62**, **OSJ 81**, **OSJ 87**, **OSJ 97** pa na encim MurC. Prav tako bi bilo treba vsem levcinhidrazidnim derivatom določiti protibakterijsko učinkovitost.

## 7 LITERATURA

1. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5<sup>th</sup> Ed., Lippincott Williams&Wilkins, Baaltimore, 2002: 759-802
2. Auterhoff H, Knabe J, Höltje D: Lehrbuch der Pharmazeutischen Chemie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1999: 671-709
3. Yoneyama H, Katsumata R: Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development, Biosci Biotechol Biochem 2006; 70: 1060-1075
4. Vila J, Sanchez- Cespedes J, Giralt E: Old and New S trategies for the Discovery of Antibacterial Agents, Curr Med Chem 2005; 4: 337-353
5. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: Pharmacology, 5<sup>th</sup> Ed, Chuchill Livingstone, 2003: 620-52
6. Silver LL: Does the cell wall of bacteria remain a viable source of targets for novel antibiotics?, Biochem Pharmacol 2006; 71: 996-1005
7. Walsh F, Amyes S: Microbiology and drug resistance mechanisms of fully resistant pathogens, Cur Op Microbiol 2004; 7: 439-444
8. Thomson C, Power E, Ruebsamen-Waigmann H, Labischinski H: Antibacterial research and development in the 21<sup>st</sup> Century – an industry perspective of the challenges, Cur Op Microbiol 2004; 7: 445-450
9. Mol D, Brooun A, Dougan R, Hilgers T, Tari W, Wijnands A, Knuth W, McRee, Swanson V: Crystal Structures of Active Fully Assembled Substrate - and Product-Bound Complexes of UDP-N-Acetylmuramic Acid: L-Alanine Ligase (MurC) from *Haemophilus influenzae*, J Bacterio 2003; 185: 4152-4162
10. Smith CA: Structure, Function and Dynamics in the mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases, J Mol Biol 2006; 362: 640-655
11. Scheffers DJ, Pinho GM: Bacterial Cell Wall Synthesis: New insights from Localization Studies, Microbiol Mol Biol Rev 2005; 69: 585-607

12. Gobec S, Urleb U: Inhibitorji sinteze peptidoglikana. *Farm. vestn.* 1999; 50: 183-193
13. Volmer W, Blanot D, De Pedro M: Peptidoglycan structure and architecture, *FEMS Microbiol Rev* II 2007: 1-19
14. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis, *FEMS Microbiol Rev* II 2008:1-40
15. Katz AH, Caufield CE: Structure-Based Design Approaches to Cell Wall Biosynthesis Inhibitors, *Current Pharmaceutical Design* 2003; 9: 857-66
16. Heijenoort J: Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit, *Nat Prod Rep* 2001; 18: 503-19
17. Bertrand JA, Fanchon E, Martin L, Chantalat L, Auger G, Blanot D, Heijenoort J, Dideberg O: »Open« Structures of MurD: Domain Movements and Structural Similarities with Folylpolyglutamate Synthetase, *J Mol Biol* 2000; 301: 1257-1266
18. Bertrand JA, Auger G, Martin L, Fanchon E, Blanot D, Le Beller D, Heijenoort J, Dideberg O: Determination of the MurD Mechanism Through Crystallographic Analysis of Enzyme Complexes, *J Mol Biol* 1999; 289: 579-590
19. 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
20. Zoeiby EI, Sanschagrín F, Levesque RC: Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors, *Mol Microbiol* 2003; 47: 1-12
21. Sim MM, Bee NS, Buss AD, Crasta SC, Goh KL, Lee SK: Benzylidene Rhodanines as Novel Inhibitors of UDP-N-Acetylmuramate/L-Alanine Ligase, *Bioorg Med Chem Lett* 2002; 12: 697-9
22. Frlan R, Kovač A, Blanot D, Gobec S, Pečar S, Obreza A: Design and Synthesis of Novel N-Benzylidenesulfonohydrazide Inhibitors of MurC and Mur D as Potential Antibacterial Agents, *Molecules* 2008; 13: 11-30
23. Li Z, Francisco D, Hu W, Labthavikul P, Petersen J, Severin A, Singh G, Yang Y, Rasmussen A, Lin Y, Skotnicki S, Mansour S: 2-Phenyl-5,6-dihydro-2H-thieno[3,2-c]pyrazol-3-ol Derivates as New Inhibitors of Bacterial Cell Wall Biosynthesis, *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13: 2591-2594
24. Ehmman DE, Demeritt JE, Hull KG, Fisher SL: Biochemical characterization of an inhibitor of *Escherichia Coli* UDP-N-acetylmuramil-L-alanin ligase, *Biochim et Biophys Acta* 2004; 1698: 167-174

25. Schuyler A, Caufield CE, Hu W, Keeney D, Labthavikul P, Morris K, Nauhton SM, Petersen PJ, Rasmussen BA, Singh G, Yang Y: Pulvinones as bacterial cell wall biosynthesis inhibitors, *Bioorg Med Chem Lett* 2005
26. Gegnas LD, Waddell ST, Chabin RM, Reddy S, Wong KK: Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurD, *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8: 1643-1648
27. Horton JR, Bostock JM, Chopra I, Hesse L, Phillips SEV, Adams DJ, Johnson AP, Fishwick CWG: Macrocyclic inhibitors of the Bacterial Cell Wall Biosynthesis Enzyme MurD, *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13: 1557-1560
28. Sutherland A, Willis CL: Chemoenzymic synthesis of 4-amino-2-hydroxy acids: A comparison of mutant and wild-type oxidoreductases, *J Org Chem* 1998; 63(22): 7764-7769
29. Islam AM, Abdel-Halim AM, Salama MA: Synthesis of some naphthalene sulfonohydrazides and related compounds of potential biological activity, *Egyptian J Chem* 1987; 29(4): 405-31
30. Clark MT, Coburn RA, Evans RT, Genco RJ: 5-(Alkylsulfonyl)salicylanilides as Potential Dental Antiplaque Agents, *J Med Chem* 1986; 29: 25-29
31. [http://www.acros.com/DesktopModules/Acros\\_Search\\_Results/Acros\\_Search\\_Results.aspx?search\\_type=Specifications&SearchString=12513](http://www.acros.com/DesktopModules/Acros_Search_Results/Acros_Search_Results.aspx?search_type=Specifications&SearchString=12513), marec 2008
32. Khan, Khalid M, Rasheed M, Ulah ZH, Safdar, Kaukab, Farhana, Choudhary, Iqbal M, Atta-ur-Rahman, Perveen, Shahnaz: Synthesis and in vitro leishmanicidal activity of some hydrazides and their analogues, *Bioorg Med Chem* 2003; 11(17): 1381-1387
33. Lee HF, Kool ET: Novel Benzopyrimidines as Widened Analogues of DNA Bases, *J Med Chem* 2005; 70: 132-140
34. Feng L, Yiging L, Qingting M, Wenhua L, Zhiming L, Quanrui W, Fengang T: An efficient construction of 4(3H)-quinazolines under microwave irradiation, *ARKIVOC* 2007; 1: 40-50
35. Scott E, Regens, Christopher S: Total Synthesis of Papulacandin, *J American Chem Soc* 2007; 129(10): 2774-2776
36. Woods, Keith W: Synthesis and SAR of indazole-pyridine based protein kinase B/Akt inhibitors, *Bioorg Med Chem* 2006; 14(20): 6832-6846

37. Mohacsi, Erno: A convenient preparation of methyl esters from carboxylic acids, Chem. Res. Dep 1982; 12(6): 453-456
38. Kaptein B, Barf G, Kellogg RM; Van Bolhuis: Synthesis and coordinating properties of ligands designed for modeling of the active site zinc of liver alcohol dehydrogenase, J Org Chem 1990; 55(6): 1890-901
39. Nakamura S, Kozuka M, Bastow KF, Tokuda H, Nishino H, Suzuki M, Tatsuzaki J, Morris N, Susan L, Kuo S, Lee K: Cancer preventive agents, Part 2: Synthesis and evaluation of 2-phenyl-4-quinolone and 9-oxo-9,10-dihydroacridine derivatives as novel antitumor promoters, Bioorg Med Chem 2005; 13(14): 4396-4401
40. Liu Z, Shi F, Martinez PD, Raminelli C, Larock RC: Synthesis of Indazoles by the [3+2] Cycloaddition of Diazo Compounds with Arynes and Subsequent Acyl Migration, J Org Chem 2008; 73(1): 219-226

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SONJA JUS  
**DIPLOMSKA NALOGA**

Univerzitetni program farmacije

Ljubljana, 2008

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

SONJA JUS

**NOVI LEVCINHDRAZIDNI INHIBITORJI LIGAZ MUR**  
**NEW LEUCINHYDRAZIDE INHIBITORS OF MUR-LIGASES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2008



Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom doc. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorstvom Roka Frlana, mag.farm. NMR spektri so bili posneti v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani. Masni spektri so bili posneti na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. IR spektri so bili posneti na Fakulteti za farmacijo.

Za vso pomoč, izkušnje in vzpodbudo pri delu se mentorju doc. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. in somentorju Roku Frlanu iskreno zahvaljujem. Najlepša hvala tudi vsem ostalim, ki so mi tekom študija stali ob strani.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala samostojno pod mentorstvom doc. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorstvom Roka Frlana, mag. farm.

Sonja Jus

Ljubljana, maj 2008

Predsednik komisije: prof. dr. Borut Štrukelj, mag. farm

Članica komisije: izr. prof. dr. Mirjana Gašperlin, mag.farm.