

**UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

**BRIGITA KURE**

**SINTEZA SUBSTITUIRANIH  
MALONILAMINOURIDINSKIH INHIBITORJEV LIGAZ  
MUR**

**SYNTHESIS OF MALONYLAMINOURIDINE  
INHIBITORS OF MUR-LIGASES**

**DIPLOMSKA NALOGA**

LJUBLJANA, 2009

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom doc. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorstvom dr. 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.

Mentorju doc. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. in somentorju dr. Roku Frlanu, mag. farm. se zahvaljujem za vso pomoč, nasvete, spodbudo pri delu in novo pridobljeno znanje.

Zahvala naj gre tudi mojim staršem, da so mi omogočili študij in me podpirali ter vzpodbujali.

Zahvaljujem se tudi moji sestri Ireni za pomoč pri oblikovanju diplomske naloge.

Prav posebej se zahvaljujem moji predragi mami, saj je edina verjela vame, zato to delo posvečam njej.

### **Izjava**

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

Ljubljana, maj 2009

Brigita Kure

Predsednik komisije: prof. dr. Aleš Mrhar

Članica komisije: izr. prof. dr. Saša Baumgartner

## VSEBINA

<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. DELOVANJE PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN .....	7
1.2. ODPORNOST BAKTERIJ NA PROTIMIKROBNE UČINKOVINE .....	8
1.3. BAKTERIJSKA CELIČNA STENA IN PEPTIDOGLIKAN .....	9
1.3.1. Zgradba peptidoglikana.....	10
1.3.2. Biosinteza peptidoglikana.....	12
1.4. MUR LIGAZE .....	15
1.4.1. Ligaza MurC.....	15
1.4.2. Ligaza MurD.....	16
1.4.3. Inhibitorji encima MurC.....	17
1.4.4. Inhibitorji encima MurD.....	22
<b>2. NAČRT ZA DELO</b> .....	<b>23</b>
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	<b>26</b>
3.1. MATERIALI .....	26
3.2. METODE .....	26
3.2.1. Kromatografske metode.....	26
3.2.2. Spektroskopske metode.....	26
3.2.3. Temperatura tališča.....	27
3.2.4. Optična sučnost .....	27
3.2.5. Biokemijska testiranja .....	27
3.2.6. Nomenklatura in risanje spojin.....	28
<b>4. EKSPERIMENTALNO DELO</b> .....	<b>29</b>
4.1. Sinteza ((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioksa-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)metil metansulfonata (OBK 1) .....	29
4.2. Sinteza 1-((3aR,6aR)-6-(azidometil)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (OBK 2) .....	30
4.3. Sinteza 1-((3aR,6aR)-6-(aminometil)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (OBK 3) .....	31
4.4. Sinteza metil 3-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioksa-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)metilamino)-3-oksopropanoata (OBK 4) .....	32
4.5. Sinteza 3-(((3aR,6aR)-6-(2,4-dioksa-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)metilamino)-3-oksopropanojske kisline (OBK 5).....	33
4.6. Sinteza 3-((5-(2,4-dioksa-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroksi-tetrahidrofuran-2-il)metilamino)-3-oksopropanojske kisline (OBK 6).....	34
4.7. Sinteza 1-benzil 3-metil 2-(4-(metoksikarbonil)benzil)malonata (OBK 7) .....	35
4.8. Sinteza 3-metoksi-2-(4-(metoksikarbonil)benzil)-3-oksopropanojske kisline (OBK 8) .....	36
4.9. Sinteza metil 4-(3-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioksa-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)metilamino)-2-(metoksikarbonil)-3-oksopropil)benzoata (OBK 9) .....	37
4.10. Sinteza 4-(2-karboksi-3-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioksa-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)metilamino)-3-oksopropil)benzojske kisline (OBK 10). .....	38
4.11. Sinteza 4-(2-karboksi-3-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-dioksa-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroksi-tetrahidrofuran-2-il)metilamino)-3-oksopropil)benzojske kisline (OBK 11) .....	39
4.12. Sinteza 1-benzil 3-metil 2-(3-(metoksikarbonil)benzil)malonata (OBK 12) .....	40
4.13. Sinteza 3-metoksi-2-(3-(metoksikarbonil)benzil)-3-oksopropanojske kisline (OBK 13) .....	42
4.14. Sinteza metil 3-(3-(((3aS,6aS)-6-(2,4-dioksa-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)metilamino)-2-(metoksikarbonil)-3-oksopropil)benzoata (OBK 14).....	43

4.15. Sinteza 3-(2-karboksi-3-(((3 <i>aS</i> ,6 <i>aS</i> )-6-(2,4-diokso-3,4-dihidropirimidin-1(2 <i>H</i> )-il)-2,2-dimetil-tetrahydrofuro[3,4- <i>d</i> ][1,3]dioksol-4-il)metilamino)-3-oksopropil)benzojske kisline (OBK 15).....	44
4.16. Sinteza 3-(2-karboksi-3-(((3 <i>R</i> ,4 <i>S</i> )-5-(2,4-diokso-3,4-dihidropirimidin-1(2 <i>H</i> )-il)-3,4-dihidroksi-tetrahydrofuran-2-il)metilamino)-3-oksopropil)benzojske kisline (OBK 16).....	45
<b>5. REZULTATI IN RAZPRAVA.....</b>	<b>47</b>
5.1. RAZPRAVA O SINTEZAH SPOJIN .....	47
5.2. SEZNAM SINTEZIRANIH KONČNIH SPOJIN .....	52
<b>6. SKLEP .....</b>	<b>54</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>55</b>

## POVZETEK

Pojav bakterijskih sevov, rezistentnih na večji del antibiotikov, ki so trenutno na tržišču, predstavlja velik problem pri zdravljenju mikrobnih infekcij. Zato je nujno iskanje novih protimikrobnih učinkovin, ki bi bile usmerjene na nova tarčna mesta v bakterijski celici. Med najpomembnejšimi razlikami, ki ločijo bakterijsko celico od človeške, je njena toga in mehansko zelo odporna celična stena, katere glavni gradnik je makromolekula peptidoglikana. Večina znanih protibakterijskih učinkovin zavira sintezo peptidoglikana v kasnejših stopnjah. Zgodnejše stopnje njegove biosinteze, kjer med drugim sodelujejo encimi ligaz Mur, pa predstavljajo enega izmed novejših, v veliki meri še neizkoriščenih možnosti zaviranja mikroorganizmov.

Razvoj molekularne biologije in računalniške tehnologije nam omogočata racionalno načrtovanje novih učinkovin. S pomočjo virtualnega rešetanja in umeščanja različnih farmakofornih skupin v aktivnem mestu ligaz Mur smo ugotovili, da bi lahko spojine, ki bi v svoji strukturi vsebovale uridinsko skupino in mimetik sladkornega dela, imele inhibitorno delovanje na omenjenih tarčah. Pri načrtovanju spojin smo uridinski del ohranili nespremenjen, N-acetilglukozaminski del pa smo zamenjali s sintezno enostavnejšimi derivati p-karboksibenzilmalonske kisline.

S sintetiziranimi spojinami smo želeli čimbolje posnemati UDP-N-acetilmuraminsko kislino (UDP-MurNAc), ki je naravni substrat ligaze MurC. Spojine so bile zato sestavljene iz uracilriboznega (uridinskega) dela, ki je prisoten tudi v naravnem substratu, iz malonatnega dela, s katerim smo posnemali pirofosfatni del naravnega substrata, iz rigidnega fenilnega distančnika, s katerim smo želeli zmanjšati entropični prispevek pri vezavi v aktivno mesto encima in iz karboksilne skupine, s katero smo posnemali COOH skupino laktatnega dela naravnega substrata.

Končnim spojinam smo izmerili inhibitorno aktivnost na encima MurC in MurD. Nobena od teh spojin se ni izkazala kot učinkovit inhibitor na ta dva encima.

Diplomska naloga predstavlja pomemben prispevek k širitvi znanja na področju sintezne kemije ter na področju načrtovanja in sinteze novih protimikrobnih učinkovin.

## ABSTRACT

The spreading of resistant bacterial strains 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. One of the most important difference that distinguishes 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. Most of known antibacterial agents inhibit synthesis of peptidoglycan in later steps. The early steps of the biosynthesis of peptidoglycan precursor catalyzed by series of Mur enzymes represents one of the newer, still unexploited targets of new antibiotics.

Development of molecular biology and computer technology have enabled a rational approach in drug design. By the use of screening and setting of different pharmacophoric groups in active place of Mur ligases we have discovered that compounds, having in its structure the uridine group and mimetic of a sugar fragment, might show inhibitory activity on mentioned targets. We retained the unchanged uridine fragment, while N-acetylglucosamine was substituted by synthetically easily obtainable derivatives of para-carboxybenzylmalonic acid.

With synthesized compounds we tried to mimic of UDP-MurNAc, which is natural substrate of MurC ligase. Compounds were therefore synthesised from uracylribose that is also present in natural substrate and malonate fragment, by which we mimicked the pyrofosfate fragment of natural substrate. We also used a rigid fragment for reduction of entropic effect for binding in the active place of enzyme. The carboxylic group we mimicked COOH group of lactate fragment of natural substrate.

The inhibitory activity of the synthesized compounds was measured for the both enzymes MurC and MurD. Neither of compounds showed any inhibitory activity to both enzymes.

Our study contributes to the current knowledge in the field of synthetic chemistry and the design of synthesis of new antimicrobial drugs.

**SEZNAM OKRAJŠAV**

ADP	adenozindifosfat
AMPPNP	nehidrolizirajoči analog ATP
ATP	adenozintrifosfat
CDCl <sub>3</sub>	devteriran kloroform
d	dublet (NMR)
dd	dublet dubleta (NMR)
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ESI	elektronska ionizacija (Electron Spray Ionization) MS
GlcNAc	N-acetilglukozamin
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: mezodiaminopimelinat-ligaza
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

Osnova za preživetje bakterij je integriteta njihove celične stene, kar bakterije dosežejo s sintezo rigidne strukture, zgrajene iz sladkornih in peptidnih molekul, imenovane peptidoglikan. Ta struktura obdaja bakterijsko citoplazemsko membrano in je značilna le za prokariotske celice (1), zato predstavlja pomembno tarčo za razvoj protibakterijskih učinkovin (2).

Za uspešno načrtovanje novih inhibitorjev biosinteze peptidoglikana in študij njihovega delovanja je nujno potrebno dobro poznavanje zgradbe peptidoglikana, mehanizma njegove biosinteze z vsemi vključenimi encimi in kemijske strukture encimskih substratov. Do sedaj so odkrili že veliko antibiotikov (predvsem  $\beta$ -laktamov in glikopeptidov), ki inhibirajo končne stopnje biosinteze peptidoglikana, hkrati pa so se pojavile številne bakterije, ki so rezistentne na večino antibiotikov, zato so prizadevanja farmacevtske stroke usmerjena v odkrivanje vedno novih tarč za razvoj novih antibiotikov in kemoterapevtikov (2).

V zadnjem desetletju se je zanimanje preusmerilo tudi na zgodnejše faze biosinteze peptidoglikana, ki potekajo v citoplazmi, kjer se odpirajo nove, še neizkoriščene možnosti zaviranja mikroorganizmov.

### 1.1. Delovanje protimikrobnih učinkovin

Protimikrobne učinkovine zavirajo rast in razmnoževanje mikroorganizmov ali povzročijo njihovo smrt, hkrati pa ne prizadenejo gostiteljskih celic. Govorimo o selektivni toksičnosti, ki v terapevtskih koncentracijah velja za mnoge protimikrobne učinkovine.

Protimikrobne učinkovine razdelimo glede na izvor v dve skupini: antibiotike in kemoterapevtike. Antibiotiki so protimikrobne učinkovine naravnega izvora in njihovi polysintezni derivati (penicilini, cefalosporini), medtem ko spojine popolnoma sinteznega izvora (kinoloni, sulfonamidi) uvrščamo med kemoterapevtike.

Protimikrobne učinkovine delujejo na bakterije na različne načine (3):

- zavirajo biosintezo celične stene bakterij
- spremenijo permeabilnost celične membrane
- vplivajo na biosintezo proteinov, ki poteka na ribosomih
- inhibirajo biosintezo bakterijskih nukleinskih kislin

## 1.2. Odpornost bakterij na protimikrobne učinkovine

V štiridesetih letih 20. stoletja je z razvojem številnih protibakterijskih učinkovin prišlo do revolucije na področju zdravljenja bakterijskih infekcij, ki je drastično zmanjšala obolevnost in predvsem umrljivost zaradi okužb z mikrobi. Hkrati se je v skladu z načelom evolucije, da se organizmi genetsko prilagajajo na spremembe v okolju, pojavila tudi odpornost mikroorganizmov na protimikrobne učinkovine (4).

Odpornost ali rezistenca je stanje neobčutljivosti oz. zmanjšane občutljivosti bakterij na zdravilne učinkovine, ki zaustavijo celično rast ali povzročijo njihovo smrt. Glede na izvor lahko bakterijsko odpornost razdelimo na genetsko in negenetsko. Genetsko pogojena rezistenca je ekstrakromosomska (prenaša se s pomočjo plazmidov oz. ekstrakromosomskih delov DNA) ali pa je kromosomska (nastane zaradi mutacije na kromosomu, zaradi česar se spremeni struktura receptorja, na katerega se protimikrobna učinkovina veže). Bakterije se zaradi naravne selekcije in mutacij izredno hitro prilagajajo in postanejo neodzivne na številne antibiotike. Zaradi selekcijskih procesov so bakterije razvile različne biokemijske mehanizme odpornosti:

- produkcijo encimov, ki inaktivirajo protimikrobne učinkovine ( $\beta$ -laktamaze, acetiltransferaze, kinaze ...),
- spremembo vezavnega mesta za protimikrobne učinkovine (zmanjšana afiniteta ali število receptorjev),
- zmanjšan privzem učinkovine v bakterijo (sprememba prepustnosti celične membrane),
- spremembo metaboličnih poti (zmanjšan obseg pretvorbe predzdravila v zdravilno učinkovino, večja koncentracija metabolitov, ki nasprotujejo učinku zdravila) (4, 5).

Razumevanje mehanizmov rezistence na protimikrobne učinkovine je pomembno za racionalno uporabo le-teh v klinični praksi in za razvoj novih protimikrobnih učinkovin, pri katerih bi upočasnili razvoj odpornosti. Zaradi tega dejstva je potrebno s pomočjo sodobnih metod farmacevtske kemije iskati nove potencialne tarče za protimikrobne učinkovine. Mednje sodijo tudi Mur encimi, ki so bistvenega pomena za biosintezo celične stene po Gramu pozitivnih in po Gramu negativnih bakterij (6).

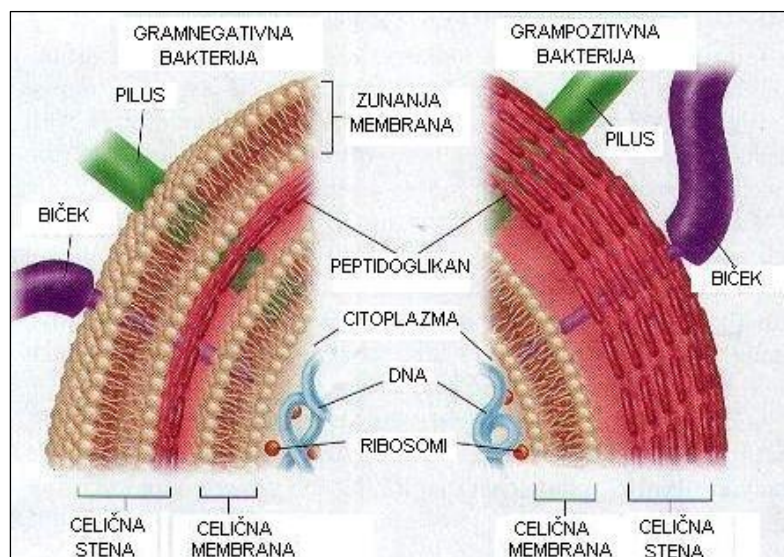
### 1.3. Bakterijska celična stena in peptidoglikan

Bakterijska celična stena je toga, visoko strukturirana in mehansko zelo močna makromolekularna struktura, ki obdaja celično membrano bakterij in opravlja številne funkcije:

- vzdržuje karakteristično obliko celice,
- ščiti bakterijo pred vplivi okolja,
- kot semipermeabilna bariera omogoča prehod le nekaterim snovem,
- sodeluje pri rasti in delitvi celice in
- preprečuje prebavo z gostiteljevimi encimi (7).

Pri večini bakterij daje celični steni trdnost peptidoglikan ali murein, ki bakteriji zagotavlja preživetje v močno hipotoničnem mediju, saj bi v nasprotnem primeru prišlo do nabrekanja in lize celice (8).

Celične stene bakterij se med sabo razlikujejo in glede na razlike v kemijski zgradbi ločimo dve skupini bakterij: grampozitivne in gramnegativne bakterije (6) (slika 1).



**Slika 1:** Razlika v zgradbi bakterijske celične stene med grampozitivnimi in gramnegativnim bakterijami (9)

### Grampozitivne bakterije

Celična stena grampozitivnih bakterij je po svoji strukturi preprostejša kot pri gramnegativnih bakterijah. Grampozitivne bakterije imajo samo eno plazemsko membrano, ki je obdana s celično steno. Ta je sestavljena iz peptidoglikanskih plasti, ki jih je lahko tudi do 40. Peptidoglikan po celi površini prebadajo anionski polimeri kot sta teihojska in teihuronska kislina. Teihojsko kislino kemijsko sestavljajo enote glicerolfosfata ali ribitolfosfata in je na eni strani povezana s peptidoglikanom, na drugi pa s plazemsko membrano. Teihuronsko kislino pa sestavljajo enote heksuronske kisline. Anionski polimeri so zaradi fosfatnih,aminskih in hidroksilnih skupin vgrajeni v ionsko izmenjevalni sistem, ki skrbi za uravnavanje koncentracije magnezijevih ionov v celicah, magnezijev ioni so namreč pomembni za pravilno delovanje določenih encimov, ki so vključeni v biosintezo peptidoglikana. Peptidoglikan in anionski polimeri niso ločene strukture ampak skupaj sestavljajo kompleksne makromolekule (6).

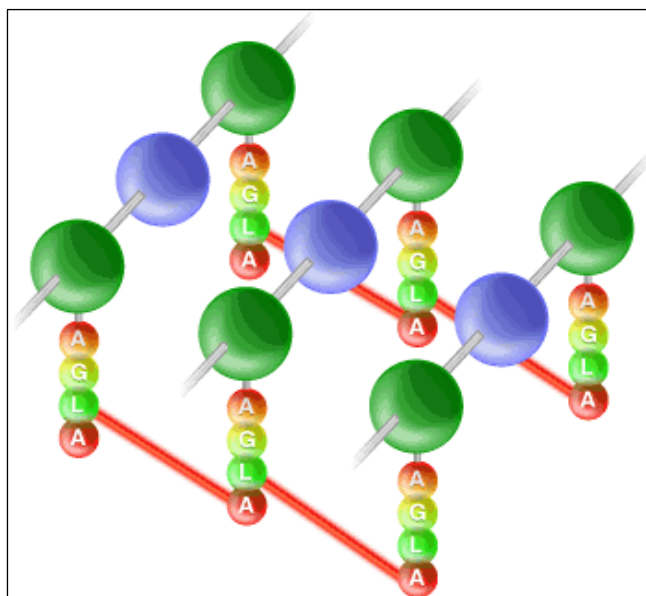
### Gramnegativne bakterije

Pri gramnegativnih bakterijah je zgradba celične stene bolj kompleksna. V celični steni gramnegativnih bakterij najdemo le eno plast peptidoglikana, ki jo obdaja čvrsta zunanja membrana, sestavljena iz lipopolisaharidov, fosfolipidov in proteinov. Zaradi zunanje membrane je v primerjavi z grampozitivnimi bakterijami prepustnost celične stene gramnegativnih bakterij zelo zmanjšana. Če lahko celično steno grampozitivnih bakterij prehajajo spojine z molekulsko maso 70000 in več, pa pri gramnegativnih bakterijah zunanje membrane ne morejo prehajati ionizirane, hidrofilne molekule z molekulsko maso od 600 do 900 in zelo lipofilne spojine (barvila, maščobne kisline, detergenti, nekatere promikrobne učinkovine) (6).

#### **1.3.1. Zgradba peptidoglikana**

Peptidoglikan je linearni glikanski polimer, sestavljen iz alternirajočih enot *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc), ki so med seboj povezane z 1,4- $\beta$  glikozidno vezjo. *N*-acetilmuraminska kislina je derivat *N*-acetilglukozamina, ki ima na C-3 atomu z etrsko vezjo pripeto mlečno kislino. Karboksilne

skupine vseh ostankov *N*-acetilmuraminske kisline so substituirane s tetrapeptidi, ki prečno povezujejo glikanska vlakna v rigidno makromolekularno mrežo (2) (slika 2).



**Slika 2:** Struktura bakterijskega peptidoglikana; sladkorno ogrodje je sestavljeno iz izmenjajočih se enot *N*-acetilglukozamina (modro) *N*-acetilmuraminske kisline (zeleno)

Aminokislina, ki sestavljajo tetrapeptide, imajo L in D konfiguracijo (D-aminokislina so v naravi redke, najdemo jih le v mikroorganizmih), njihovo zaporedje pa je: L-alanin, D-glutaminska kislina, mezo-diaminopimelinska kislina, D-alanin. Tudi mezo-diaminopimelinska kislina, ki je simetrična molekula z dvema kiralnima centroma s konfiguracijo D in L, se v naravi nahaja le v peptidoglikanu (1). Čeprav je daleč najbolj zastopana aminokislina na tretjem mestu, se pri številnih bakterijah (*S. aureus*, *M. luteis* ...) na tem mestu nahaja L-lizin pri nekaterih pa tudi L-ornitin, L-diaminobutanojska kislina ali L-homoserin. Razlike med bakterijami se lahko pojavijo tudi v D-glutaminskem fragmentu muramil tetrapeptida, ki ima lahko karboksilno skupino prosto ali v obliki amida, in v strukturi same muraminske kisline (mesto 6 je lahko O-acetilirano, kar povzroči neobčutljivost peptidoglikana na razgradnjo z lizocimi) (6).

Tetrapeptidne verige na sosednjih glikanskih vlaknih so medsebojno povezane v prečno povezan polimer, število verig, ki sodelujejo pri tej povezavi, pa je lahko različno. Pri gramnegativnih mikroorganizmih jih je samo 20%, pri grampozitivnih pa lahko tudi več kot 90%. Pri večini gramnegativnih bakterij so prečne povezave sestavljene iz direktne

peptidne vezi med karboksilno skupino četrte aminokislina (D-alanina) ene glikanske verige in prosto amino skupino tretje aminokislina sosednje glikanske verige. V primeru grampozitivnih bakterij pa terminalno karboksilno skupino D-alanina ene verige in prosto amino skupino tretje aminokislina v drugi verigi povezuje most iz petih glicinskih ostankov (2).

### 1.3.2. Biosinteza peptidoglikana

Biosinteza peptidoglikana je kompleksen proces, sestavljen iz treh stopenj:

- sinteza prekurzorjev v citoplazmi,
- vezava prekurzorjev na lipidni nosilec, ki jih prenese čez celično membrano,
- prehod prekurzorjev v celično steno in vgraditev v že obstoječi peptidoglikan. (6)

V prvi stopnji biosinteze se v citoplazmi sintetizirata UDP-*N*-acetilglukozamin in UDP-*N*-acetilmuramilpentapeptid. Bakterije iz primarnega metabolita fruktoze-6-fosfata v štirih stopnjah sintetizirajo aminokislinski nukleotid UDP-*N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc), iz le-tega pa v naslednjih dveh stopnjah nastane *N*-acetilmuraminska kislina (UNAM). Prvo stopnjo, pri kateri pride do prenosa fosfoenolpiruvata, katalizira encim MurA, sledi pa ji redukcija enola do laktoilne skupine, ki jo katalizira encim MurB (2).

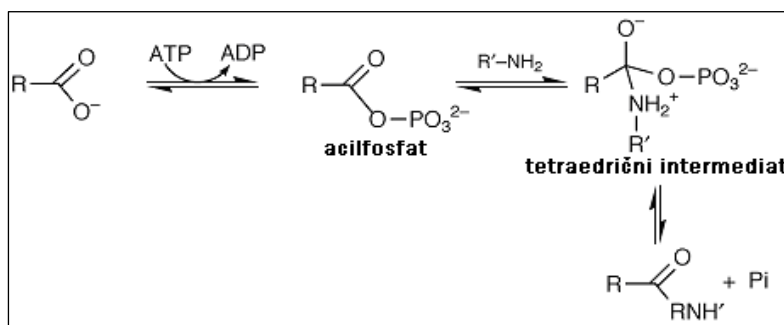
Istočasno poteka sinteza D-aminokislina, ki jih najdemo le v prokariontih. Bakterije sintetizirajo D-aminokislina po dveh biosintezni poteh: pri prvi pride do racemizacije na  $\alpha$ -ogljikovem atomu L-aminokislina, pod vplivom ustrezne aminokislinske racemaze, druga pot pa gre preko stereoselektivne redukcije  $\beta$ -keto kisline (6).

Končni citoplazemski prekurzor biosinteze peptidoglikana je UDP-MurNAc-pentapeptid, nastane pa tako, da se na prosto karboksilno skupino UDP-*N*-acetilmuraminske kisline preko amidne vezi postopoma vežejo L-alanin (reakcijo katalizira MurC), D-glutaminska kislina (s pomočjo encima MurD) in mezo-diaminopimelinska kislina (katalizator reakcije je encim MurE). Encimi MurC, MurD in MurE so specifične sintetaze prekurzorjev peptidoglikana, ki kot vir energije uporabljajo ATP. Preostala dva aminokislinska ostanka (D-Ala-D-Ala) se s pomočjo encima MurF pripneta kot že prej tvorjen dipeptid D-alanil-D-alanin. Ta dipeptid nastane iz L-alanina s pomočjo alaninske racemaze, ki L-alanin pretvori v D-alanin, nato pa D-alanil-D-alanin ligaza katalizira nastanek dipeptida D-Ala-D-Ala (2) (slika 3).

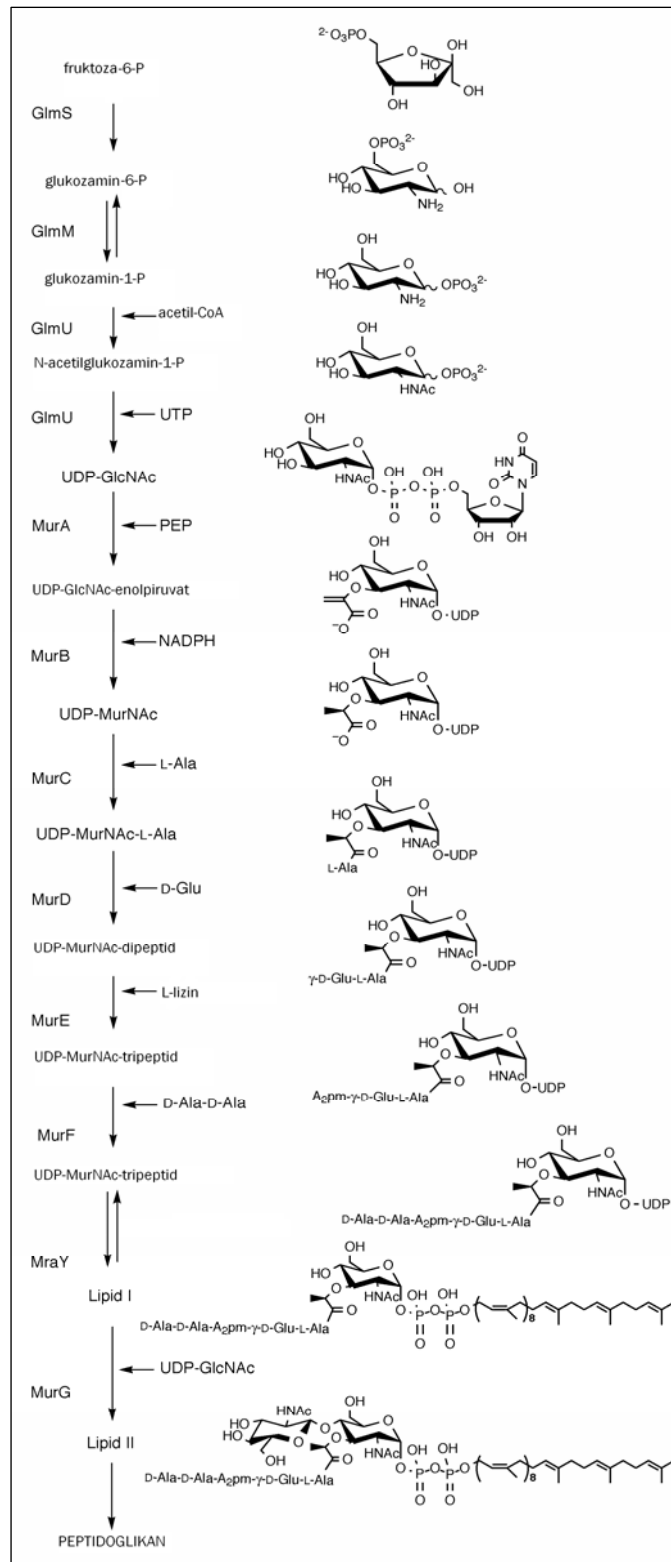
Mur encimi spadajo v skupino od ATP odvisnih ligaz, ki s pomočjo adenzintrifosfata (ATP) aktivirajo karboksilno skupino substrata. Od ATP odvisne ligaze lahko izvedejo hidrolizo ATP na dva različna načina:

- ATP hidrolizira do adenzindifosfata (ADP) in anorganskega fosfata (Pi);
- ATP hidrolizira do AMP in anorganskega pirofosfata (PPi) (10).

Mur sintetaze so tipični predstavniki prve skupine ligaz, ki z  $\gamma$ -fosfatno skupino ATP aktivirajo karboksilno skupino substrata, pri čemer nastaneta acil-fosfatni intermediat in ADP. Nato amino skupina pripenjajoče se aminokislina, nukleofilno napade acil-fosfatni intermediat in nastane tetraedrično prehodno stanje. Sledi eliminacija fosfata in nastanek peptidne vezi (10) (slika 4).



**Slika 4:** Mehanizem nastanka peptidne vezi preko tetraedričnega intermediata



**Slika 3:** Shematski prikaz posameznih stopenj biosinteze peptidoglikana



V nadaljevanju biosinteze se sintetizirani UDP-MurNAc-pentapeptid pod vplivom *MraY* veže na lipidni nosilec, pri čemer nastane lipid I. Nato glikoziltransferaza (*MurG*) na lipid I pripne GlcNAc in tvori se lipid II. Ta se translocira na zunanjo stran membrane in vgradi v peptidoglikan. Sladkorne enote povežejo med sabo glikoziltransferaze, transpeptidaze pa katalizirajo povezovanje pentapeptidnih delov oz. transpeptidacijo, pri kateri se peptidna vez med D-alaninskima ostankoma pretrga in odcepi se terminalni D-alanin. Energija, ki se pri tem sprosti, se porabi za tvorbo nove prečne povezave. Poleg monofunkcionalnih glikoziltransferaz in transpeptidaz najdemo v praktično vseh bakterijah tudi bifunkcionalne polimeraze oz. visokomolekularne PBP (Penicilin-vezoče proteine), ki so sposobne katalizirati glikozilacijo, kot tudi transaminacijo (2, 6).

Stopnja prečne premreženosti peptidoglikana je pri grampozitivnih in gramnegativnih bakterijah različna in jo uravnavajo encimi karboksipeptidaze, ki katalizirajo odcep terminalnega D-alanina, odcepi pa se lahko tudi predzadnji D-alanin. Tako encimi preprečijo prečno povezavo, saj transpeptidaza za svoje delovanje zahteva D-alanil-D-alanin na koncu pentapeptidne verige (6).

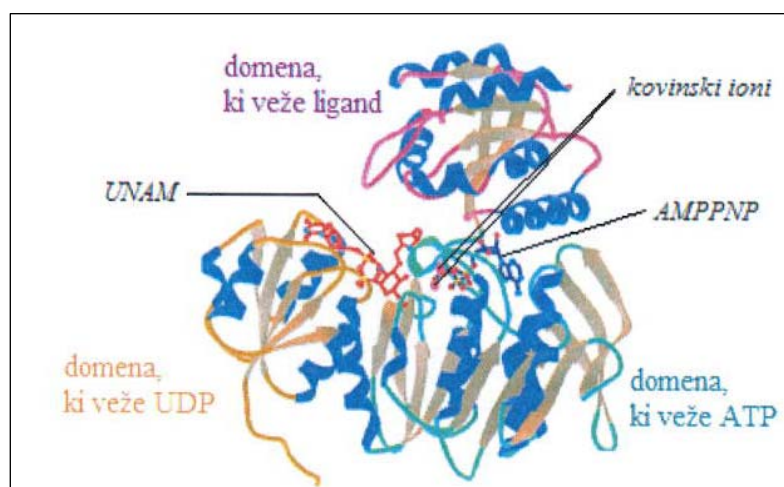
#### 1.4. Mur ligaze

Mur ligaze ali Mur encimi so nujno potrebni za sintezo bakterijske celične stene. Z zaviranjem njihovega delovanja odločilno vplivamo na biosintezo peptidoglikana s tem pa tudi na preživetje bakterije. Mur ligaze sodijo v isto naddružino encimov, delujejo po enakem encimskem mehanizmu in so sestavljene iz treh domen. N-terminalna domena je odgovorna za vezavo UDP-prekurzorja, centralna za vezavo ATP in C-terminalna za vezavo aminokislina ali dipeptida. Obstajajo v odprti ali zaprti konformaciji in imajo podobno 3D kristalno strukturo (11).

##### 1.4.1. 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 (11). Kristalna struktura ligaze MurC je znana in so jo določili pri bakterijah *Haemophilus influenzae*, *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli* (slika 5) (11). 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 zavoje, 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 (1).



**Slika 5:** Prostorska struktura encima MurC v kompleksu z UNAM, AMPPNP in kovinskimi ioni

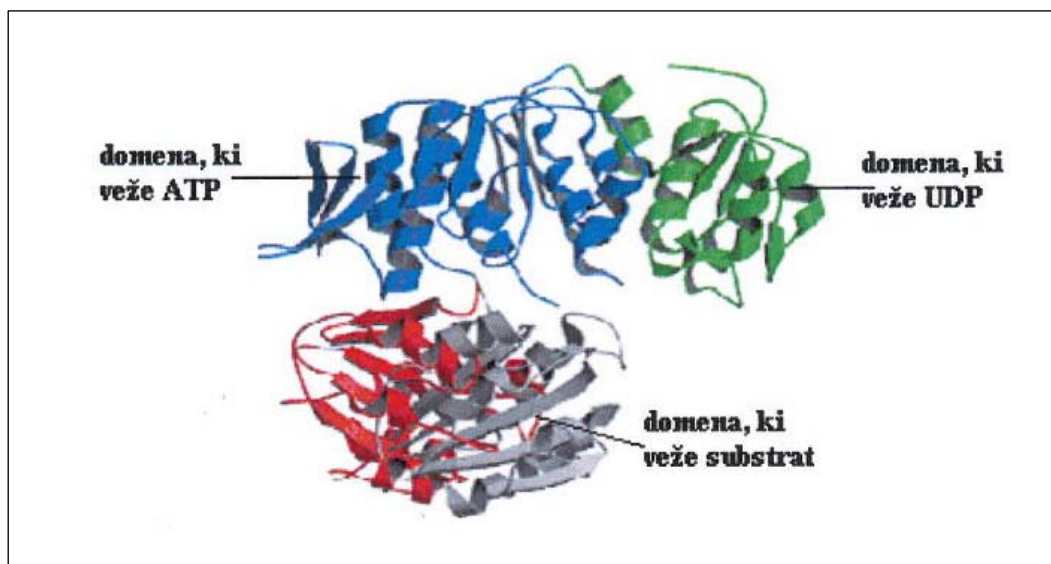
#### 1.4.2. Ligaza MurD

MurD je 47 kDaltonov velik protein, ki pripenja D-glutaminsko kislino na novo nastajajoči citoplazemski prekursor peptidoglikana (1).

Kristalna struktura MurD (slika 6) 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 mononukleotidno vezavno področje. 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.

MurD ligaza za svoje delovanje potrebuje dva magnezijeva iona, pri tem je eden pomemben za vezavo ATP, drugi pa za nastanek acilfosfatnega intermedata (1).



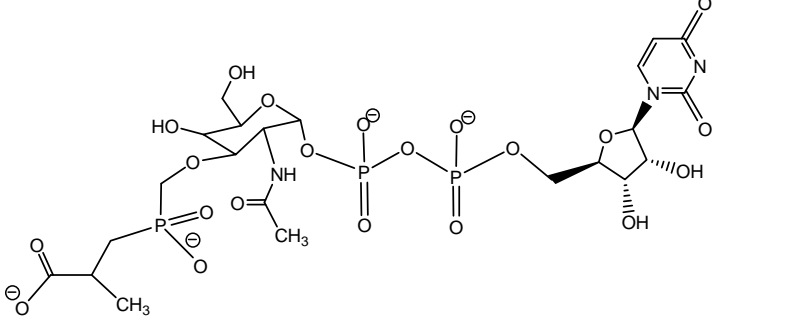
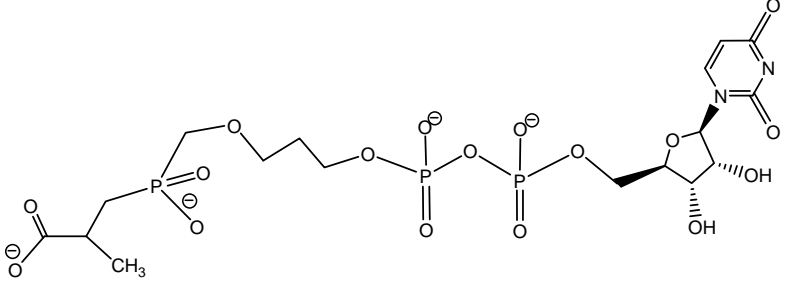
**Slika 6:** Prostorska struktura encima MurD

### 1.4.3. 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 fosforilfosfinatna struktura, ki zelo dobro oponaša tetraedrično prehodno stanje, ki nastane pri normalnem procesu tvorbe peptidne vezi (14).

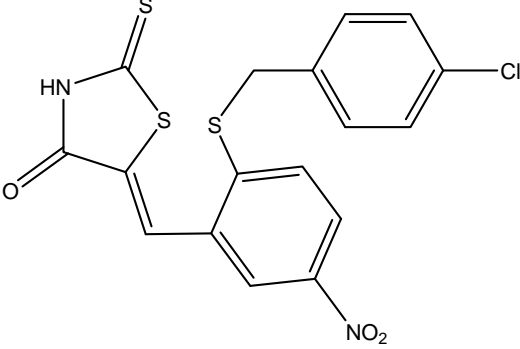
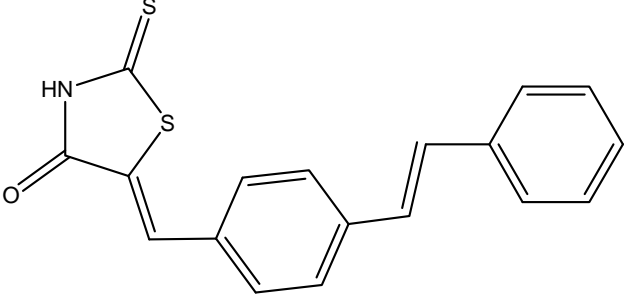
Prvi izredno učinkovit objavljen inhibitor encima MurC (*E.coli*) je fosfinatni analog prehodnega stanja z  $IC_{50} = 49$  nM, ki je bil tudi biološko ovrednoten (spojina **A**), (preglednica I) (15). Ugotovili so, da kakršnakoli strukturna modifikacija tega inhibitorja značilno zmanjša inhibitorno aktivnost. Tako zamenjava sladkornega dela s fleksibilnim 1,3-propandiolnim vmesnikom zmanjša inhibitorno aktivnost za več kot 1000 krat (spojina **B**) (preglednica I) (16).

**Preglednica I:** Fosfinatna inhibitorja encima Mur C

<b>A</b>		<b>IC<sub>50</sub> = 49 nM (MurC)</b>
<b>B</b>		<b>IC<sub>50</sub> = 60 μM (MurC)</b>

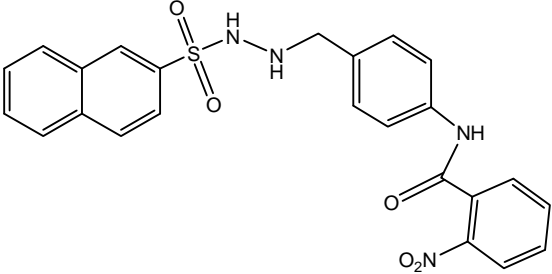
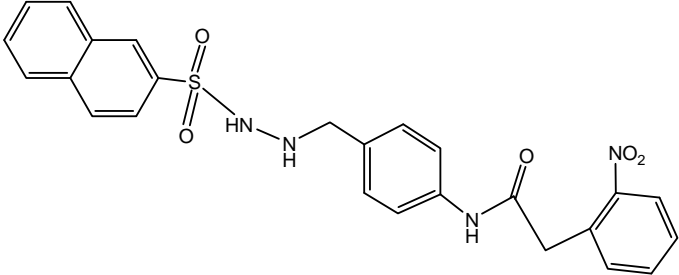
Benziliden rodanini so nizkomolekularne nepeptidne spojine, ki prav tako inhibirajo MurC (spojini **C** in **D**) (preglednica II). Na podlagi sinteze več analogov so ugotovili, da je za inhibitorno delovanje nujno potrebna prosta NH skupina, ki tvori vodikove vezi v aktivnem mestu MurC. Analoge so testirali 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 (17).

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

<b><u>C</u></b>		<b>IC<sub>50</sub> = 27 μM</b> <b>(MurC)</b>
<b><u>D</u></b>		<b>IC<sub>50</sub> = 18 μM</b> <b>(MurC)</b>

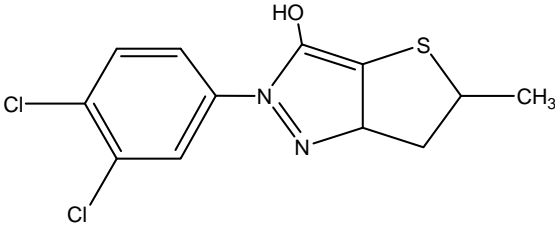
Benziliden rodanina **C** in **D**, ki izkazujeta dobro inhibitorno aktivnost, sta služila kot spojini vodnici za nadaljnje kemijske modifikacije in sintezo spojin z N-benzilidensulfonhidrazidnim fragmentom. Najprej so osnovni rodaninski obroč (2-oksotiazolidin-4-on) zamenjali z acikličnim arilnim substituentom, 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 **E** in **F**) (preglednica III) in karbociklične estre, ki so se izkazali kot dobri inhibitorji MurC in MurD (18).

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

<b><u>E</u></b>		<b>IC<sub>50</sub> = 51 μM (MurC)</b>
<b><u>F</u></b>		<b>IC<sub>50</sub> = 27 μM (MurC)</b>

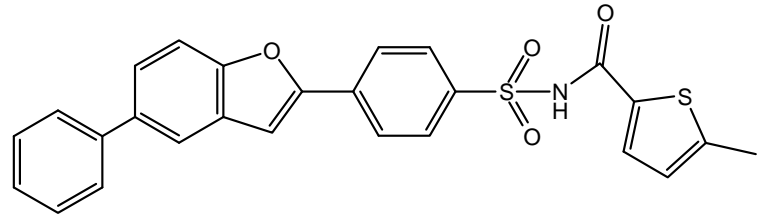
Derivati 2-fenil-5,6-dihidro-2H-tienol[3,2-c]pirazol-3-ola kažejo dobro inhibitorno aktivnost proti *S. aureus* MurB, MurC (spojina **G**) (preglednica IV) in MurD ter dobro protimikrobno aktivnost proti grampozitivnim bakterijam, vključno z na meticilin rezistentni *S. aureus* (MRSA), na vankomicin rezistentnim enterokokom (VRE) in na penicilin rezistentnim *S. pneumoniae* (PRSP). Nobeden pa ni bil aktiven proti gramnegativnim bakterijam pri MIC < 32 μg/mL (19).

**Preglednica IV:** Derivat 2-fenil-5,6-dihidro-2H-tienol[3,2-c]pirazol-3-ola kot inhibitor MurC

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

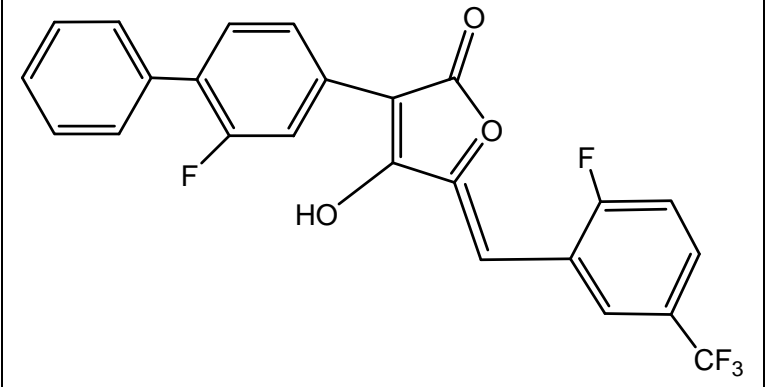
Tudi derivati benzofuran acil-sulfonamidov kompetitivno tekmujejo za ATP in UDP-MurNAc in kažejo dobro inhibitorno aktivnost na MurC. Spojina **H** ima IC<sub>50</sub> = 2,3 μM, ampak na žalost ima visoko afiniteto do vezave na plazemske proteine (preglednica V) (20).

**Preglednica V: Benzofuran acilsulfonamidna struktura inhibitorja MurC**

<b><u>H</u></b>		<b>IC<sub>50</sub> = 2,3 μM (MurC)</b>
-----------------	------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------

Sintetiziranih je bilo več kot 180 pulvinonov, ki so pokazali dobro inhibitorno aktivnost proti encimom MurA, MurB, MurC in MurD. Spojina **I** z IC<sub>50</sub> = 4,5 μM je dober inhibitor MurC, prav tako je aktivna proti grampozitivnim bakterijam, vključno z rezistentnimi sevi (preglednica VI) (21).

**Preglednica VI: Pulvionski inhibitor encima MurC**

<b><u>I</u></b>		<b>IC<sub>50</sub> = 4,5 μM (MurC)</b>
-----------------	-------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------

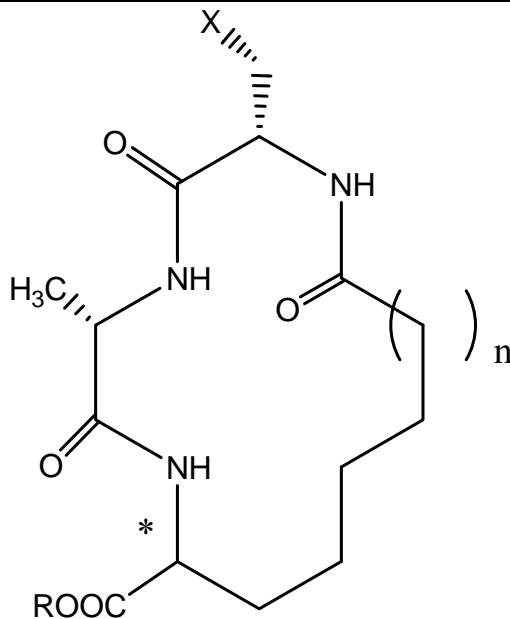
#### 1.4.4. Inhibitorji encima MurD

MurD je prvi encim za katerega so pripravili fosfinatne inhibitorje (2). Prvi učinkovit inhibitor je bil poenostavljen mimetik tetraedičnega prehodnega stanja z  $IC_{50} = 680$  nM. Po vgraditvi N-muraminske kisline namesto hidrofobnega distančnika in omejitvi stereokemije konfiguracije  $\alpha$ -amino fosfinata se je znatno povečala učinkovitost mimetikov prehodnega stanja.

Prisotnost terminalne fosfatne skupine na anomerni OH skupini še poveča inhibitorno aktivnost učinkovine. Kljub dobri inhibitorni aktivnosti, pa fosfinatni inhibitorji ne izkazujejo protibakterijskega delovanja (22).

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 **J**) (preglednica VII) (23).

**Preglednica VII:** Makrociklični inhibitor MurD

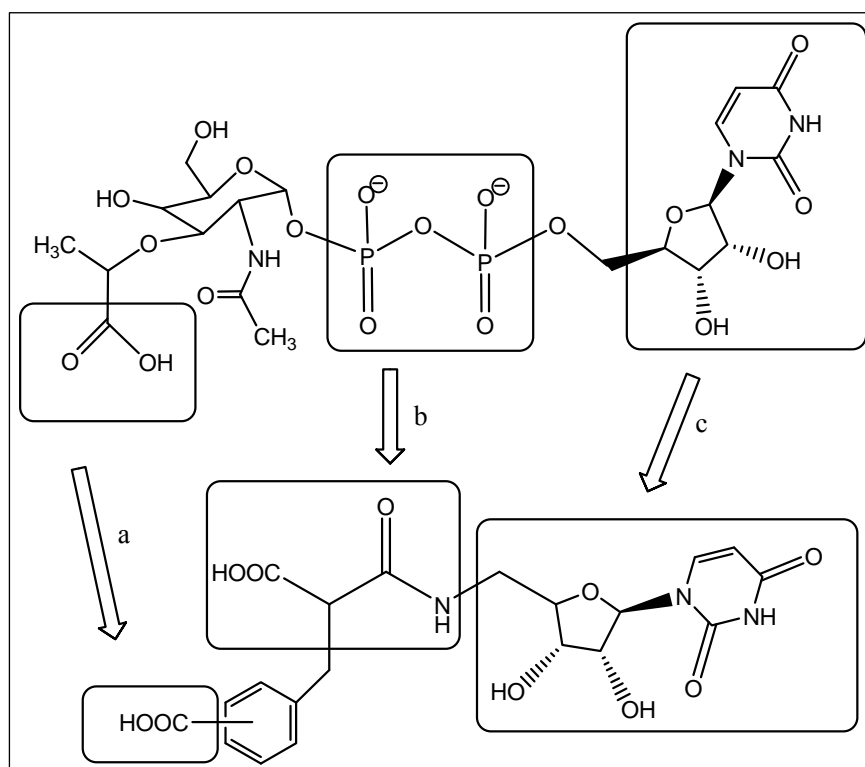
<b>J</b>	 <p style="text-align: center;"> <math>n = 2</math>  <math>* = R</math>  <math>X = OH</math> </p>	$IC_{50} = 0,7 \mu M$ <b>(MurC)</b>
----------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------------------



## 2. NAČRT ZA DELO

V okviru diplomske naloge bomo poskušali razviti potencialne inhibitorje encimov iz družine ligaz Mur (inhibitorje MurC, MurD), ki so pomembni pri zgodnejših stopnjah sinteze monomernih gradnikov peptidoglikana. S posnemanjem naravnega substrata encimsko katalizirane reakcije, bomo načrtovali in sintetizirali potencialne inhibitorje MurC in MurD. Kot osnovni fragment bomo uporabili uridin, ki je prisoten tudi v naravnem substratu in ga bomo substituirali z različnimi derivati malonske kisline. Izbrali bomo take derivate malonske kisline, ki nam bodo omogočili najbolj optimalno tvorbo interakcij z vezavnim mestom.

Za boljše razumevanje povezave med strukturo in delovanjem, bomo sintetizirali različne analoge (slika 7) in jim določili *in vitro* inhibitorno aktivnost na encima MurC in MurD.



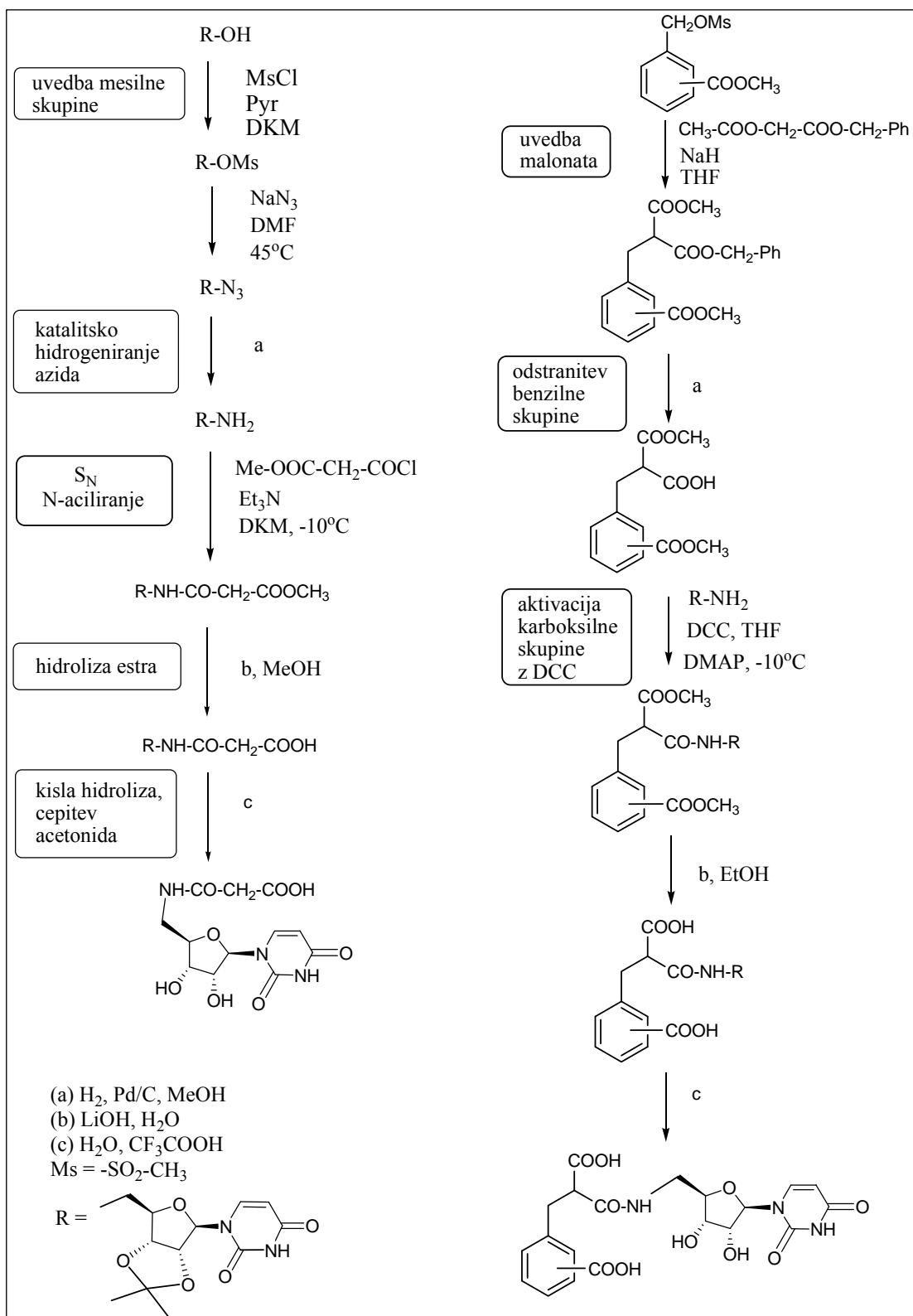
**Slika 7:** Načrtovanje naših spojin na osnovi molekule UDP-N-acetilmuraminske kisline:

- a: COOH laktoilnega dela na sladkorju se zamenja s COOH na fenilnem obroču
- b: namesto pirofosfata je monoamid malonske kisline
- c: uridinski fragment ostane nespremenjen

Kot mimetik N-acetilglukozaminskega dela bomo uvedli rigidno benzilno skupino, ki bo imela na meta oz. para mesto pripeto karboksilno kislino. Izhodna spojina pri naših sintezah bo zaščiteni uridin, ki ga bomo v treh sinteznih stopnjah pretvorili v aaminski derivat.

Najprej bomo uvedli mesilno skupino, ki jo bomo nato zamenjali z azidom. Nastali azid bomo katalitsko hidrogenirali s Pd/C v atmosferi vodika. V nadaljevanju bomo amin uporabili za sintezo treh različnih spojin. Za sintezo prve spojine bomo amino skupino substituirali z metilmalonilno skupino ter jo v dveh stopnjah - s hidrolizo estra in nadaljnjo kislno hidrolizo (odstranitev acetonidne zaščitne skupine), pretvorili v končno spojino s prisotnostjo ene karboksilne skupine (slika 8). Za sintezo drugih dveh spojin pa bomo izhajali iz metil 3-((metilsulfoniloksi)metil)benzoata in para oz. metil 4-((metilsulfoniloksi)metil)benzoata. Pri obeh spojinah bomo po nukleofilni substituciji z benzilmetilnim estrom malonske kisline odstranili benzilno zaščitno skupino s katalitskim hidrogeniranjem. Obema strukturama bomo z DCC aktivirali karboksilno skupino in uvedli amin na COOH. Zadnji dve stopnji do končnih spojin s para in meta fragmentoma pa bosta enaka kot pri prvi končni spojini.

Končne spojine bomo biološko ovrednotili. Določili jim bomo inhibitorno aktivnost na encima MurC in MurD z *in vitro* encimsko metodo. Rezultati encimskih testiranj bodo razširili znanje o inhibitorjih ligaz Mur in pripomogli k razumevanju strukturnih zahtev za učinkovanje na omenjene encime in bakterije ter usmerjali nadaljnje raziskave na tem področju.



**Slika 8:** Sintezne poti vseh treh spojin – potencialnih inhibitorjev MurC in MurD

### 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.

###### Kolonska in flash kromatografija

Za kolonsko kromatografijo smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel z velikostjo 0,063-0,200 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

###### Jedrsko magnetna resonanca (NMR)

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 in obdelani 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 ESI tehniko na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Za 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 Univerze 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 s 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 encima MurC in MurD s kolorimetrično metodo z uporabo testa, kjer smo nastali produkt določali spektrofotometrično. 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 zelenim. Kompleks lahko

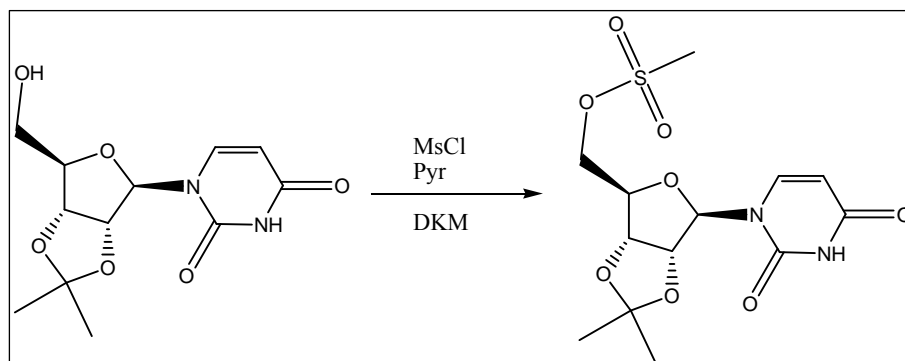
kvantificiramo spektrofotometrično pri 650 nm. Katalitično aktivnost encimov MurC in MurD ovrednotimo na podlagi množine fosfata, ki nastane pri reakciji. Ob dodatku encimskega inhibitorja se katalitična aktivnost encima zniža, zato je množina nastalega fosfata manjša v primerjavi s kontrolo brez inhibitorja. Teste smo izvajali na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo v okviru projekta INTAFAR.

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

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

## 4. EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1. Sinteza ((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-diokso-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)metil metansulfonata (OBK 1)



**OBK 1** smo sintetizirali iz uridinskega derivata po modificiranem postopku (24, 25). V osušeno in z argonom preprihano bučko smo natehtali 2,5 g (8,8 mmol) zaščenega uridina in dodali 35 mL DKM. Zmes smo ohladili na  $-10^{\circ}\text{C}$ , dodali 7,3 mL piridina, 1,1 mL MsCl in mešali na ledu 24 ur. Po končani reakciji smo zmes raztopili v 100 mL kloroforma, ekstrahirali s  $5 \times 25$  mL 1M HCl,  $2 \times 10$  mL nasičene vodne raztopine  $\text{NaHCO}_3$ ,  $1 \times 25$  mL nasičene vodne raztopine NaCl, sušili z brezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in uparili  $\text{CHCl}_3$ . Masa snovi je bila 3,88 g.

**Rf:** 0,61 (MF: EtOAc)

**Izkoristek:** 98 %

**Elementna sestava:**  $\text{C}_{13}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_8\text{S}$

**M** = 362,08 g/mol

**Opis:** rumeni kristali

**T<sub>tališča</sub>** :  $65^{\circ}\text{C}$

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  1.36 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.57 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.04 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 4.35-4.45 (m, 1H,  $\text{H}_2\text{C-CH}$ ), 4.46 (m, 2H,  $\text{CH}_2$ ), 4.89 (dd,  $J = 3.4$  Hz,  $J = 6.4$  Hz, 1H,  $\text{HC-CH-O}$ ), 5.07 (dd,  $J = 6.4$  Hz,  $J = 1.8$  Hz, 1H,  $\text{HC-CH-O}$ ), 5.62 (d,  $J = 1.5$  Hz, 1H,  $\text{HC-CH-O}$ ), 5.76 (dd,  $J = 8.0$  Hz,  $J = 1.2$  Hz, 1H, Ar-H), 7.28 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, Ar-H), 9.65 (s, 1H, NH) ppm.

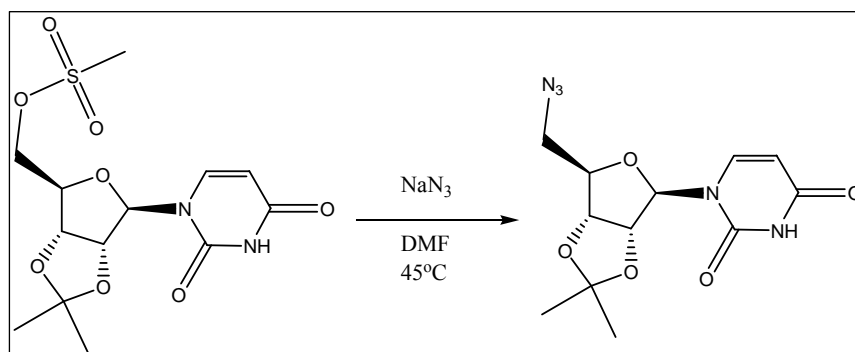
**MS (ESI): m/z (%):** 361 (M-H<sup>-</sup>, 5), 95 (16)

**HR-MS: m/z:** 361,0701 (izračunano za C<sub>13</sub>H<sub>17</sub>N<sub>2</sub>O<sub>8</sub>: 361,0706)

**IR (KBr):** 3419, 1684, 1350, 1272, 1174, 1105, 967, 812 cm<sup>-1</sup>.

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = +7,9^\circ$  (c = 0,293 g /100ml, MeOH)

#### 4.2. Sinteza 1-((3aR,6aR)-6-(azidometil)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (OBK 2)



**OBK 2** smo sintetizirali po postopku povzetem po članku (24, 25). V 24,2 mL (9,9 mmol) brezvodnega DMF smo raztopili 3,6 g (9,9 mmol) **OBK 1**. Dodali smo 3,2 g (48 mmol) NaN<sub>3</sub>, segreli na 45°C, bučko opremili z vodnim hladilnikom in segrevali 24 ur v atmosferi argona. Potek reakcije smo spremljali s TLC in odparili DMF pod znižanim tlakom pri 50°C. Zaostanek z maso 6,0 g smo čistili s kolonsko kromatografijo in dobili 5,2 g produkta.

**Rf:** 0,27 (MF:heksan/EtOAc = 2/3)

**Izkoristek:** 81 %

**Elementna sestava:** C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>5</sub>O<sub>5</sub>

**M** = 309,11 g/mol

**Opis :** viskozna tekočina

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 1.36 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.63 (d, J = 5.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.29-4.20 (dd, J = 9.6 Hz, J = 5.2 Hz, 1H, H<sub>2</sub>C-CH), 4.83 (dd, J = 6.5 Hz, J = 4.2 Hz, 1H, HC-CH), 5.02 (dd, J = 6.5 Hz, J = 2.1 Hz, 1H, HC-CH), 5.67 (d, J = 2.1 Hz,



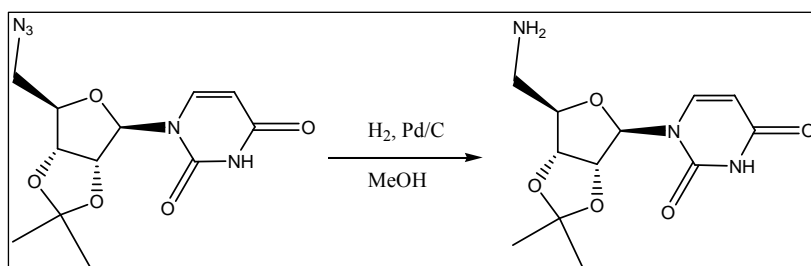
1H, N-CH-O), 5.77 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, Ar-H), 7.31 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, Ar-H), 9.91 (s, 1H, NH) ppm.

**MS (ESI): m/z (%):** 308 (M-H<sup>-</sup>, 100)

**IR (KBr):** 3419, 1684, 1350, 1272, 1174, 1105, 967, 812 cm<sup>-1</sup>.

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = +39,6^\circ$  (c = 0,306 g /100ml, MeOH)

#### 4.3. Sinteza 1-((3aR,6aR)-6-(aminometil)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)pirimidin-2,4(1H,3H)-diona (OBK 3)



**OBK 3** smo sintetizirali po postopku povzetem po članku (26). 2,7 g (2 mmol) izhodne spojine azida (**OBK 2**) smo raztopili v 650 mL MeOH, prepihali z Ar, dodali 10% Pd/C (208 mg) in prepihovali z H<sub>2</sub> 1,5 ure. Nato smo odfiltrirali Pd/C in uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 2,37 g končne spojine.

**Rf:** 0 (MF: heksan/EtOAc = 2/3)

**Izkoristek:** 96 %

**Elementna sestava:** C<sub>12</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

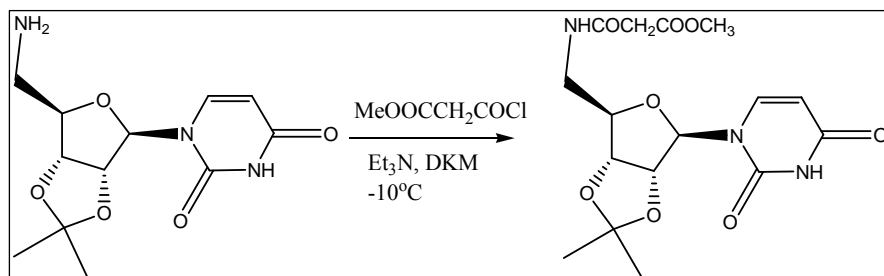
**M** = 283,12 g/mol

**Opis:** bel prašek

**T<sub>tališča</sub>** : 134°C

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 1.35 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.57 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 4.07 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH), 4.83 (dd,  $J = 4.2$  Hz,  $J = 4.2$  Hz, 1H, HC-CH-O), 4.96 (dd,  $J = 2.4$  Hz,  $J = 2.4$  Hz, 1H, HC-CH-O), 5.68 (d,  $J = 2.4$  Hz, 1H, Ar-H), 5.72 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, HC-CH-O), 7.36 (d,  $J = 7.8$  Hz, 1H, Ar-H) ppm.

4.4. Sinteza metil 3-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-dioksa-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)metilamino)-3-oksopropanoata (**OBK 4**)



800 mg (2,6 mmol) **OBK 3** smo raztopili v 80 mL brezvodnega DKM, raztopino ohladili na  $-10^{\circ}\text{C}$ , dodali 1,4 mL (2,6 mmol)  $\text{Et}_3\text{N}$  in preverili pH (pH=10). Po kapljicah smo dodali 388 mg (2,6 mmol) metilmalonilklorida in mešali 24 ur. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc) in izolirali 389 mg čiste spojine (**OBK 4**).

**Rf:** 0,17 (MF: EtOAc)

**Izkoristek:** 33 %

**Elementna sestava:**  $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_8$

**M** = 383,13 g/mol

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>** :  $77^{\circ}\text{C}$

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  1.34 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.55 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 3.36 (s, 2H,  $\text{OC-CH}_2\text{-CO}$ ), 3.50-3.80 (m, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.74 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 4.24 (dd,  $J = 8.8$  Hz,  $J = 4.3$  Hz, 1H,  $\text{CH}_2\text{-CH}$ ), 4.8 (dd,  $J = 6.6$  Hz,  $J = 4.3$  Hz, 1H,  $\text{HC-CH-O}$ ), 5.1 (dd,  $J = 6.6$  Hz,  $J = 2.7$  Hz, 1H,  $\text{HC-CH-O}$ ), 5.48 (d,  $J = 2.7$  Hz, 1H,  $\text{HC-CH-O}$ ), 5.75 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, Ar-H), 7.26 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H, Ar-H), 7.38 (s, 1H, NH), 8.87 (s, 1H,  $\text{CO-NH-CO}$ ) ppm.

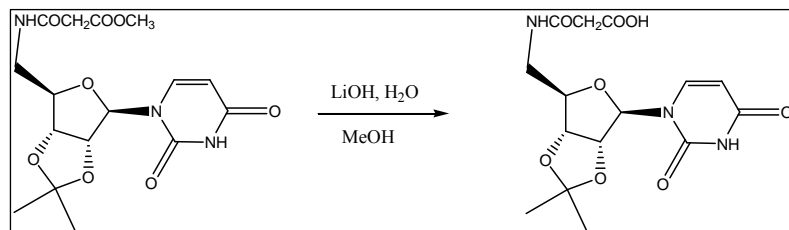
**MS (ESI): m/z (%):** 384 ( $\text{MH}^+$ , 40), 272 (100)

**HR-MS: m/z:**  $\text{MH}^+$  384,1410 (izračunano za  $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{N}_3\text{O}_8$ : 384,1407)

**IR (KBr):** 3838, 3736, 3310, 3074, 2351, 1735, 1550, 1447, 1264, 1216, 1169, 1085  $\text{cm}^{-1}$ .

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -7,7^{\circ}$  ( $c = 0,332$  g/100ml, MeOH)

**4.5. Sinteza 3-(((3aR,6aR)-6-(2,4-diokso-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)metilamino)-3-oksopropanojske kisline (OBK 5)**



337 mg (0,88 mmol) **OBK 4** in 52,6 mg (2,2 mmol) LiOH smo raztopili v 20 mL MeOH. Dodali smo 180 mg vode in mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Raztopino smo nakisali z 1M HCl iz začetnega pH 11 na pH 8. Pri 40°C smo delno uparili topilo, dodali 30 mL vode in sprali z 2×10 mL DKM. Pod znižanim tlakom smo uparili vodno fazo in izolirali 411 mg rjave viskozne tekočine. Surovi produkt smo nato kristalizirali iz EtOH in dietiletra. Dobili smo belo trdno snov (**OBK 5**).

**Rf:** 0 (MF: EtOAc)

**Izkoristek:** 96 %

**Elementna sestava:** C<sub>15</sub>H<sub>19</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>

**M** = 369,12 g/mol

**Opis:** bela trdna snov

**T<sub>tališča</sub>** : 195°C

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 1.27 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.47 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.79 (s, 2H, CH<sub>2</sub>-COOH), 3.30-3.50 (m, 2H, CH<sub>2</sub>), 4.00 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH), 4.68 (m, 1H, HC-CH-O), 4.96 (m, 1H, HC-CH-O), 5.62 (m, 1H, Ar-H), 5.79 (d, *J* = 2.7 Hz, 1H, HC-CH-O), 7.78 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 9.33 (s, 1H, CO-NH-CH<sub>2</sub>), 11.39 (s, 1H, CO-NH-CO) ppm.

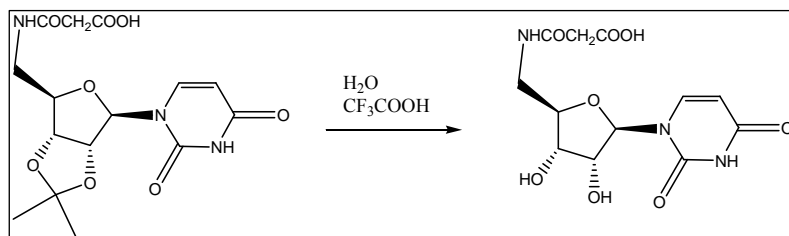
**MS (ESI): m/z (%):** 370 (MH<sup>+</sup>, 100)

**HR-MS: m/z:** MH<sup>+</sup> 370,1248 (izračunano za C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>: 370,1250)

**IR (KBr):** 2989, 2808, 2345, 1685, 1458, 1387, 1272, 1213, 1158, 1092, 970, 860 cm<sup>-1</sup>.

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = - 22,5° (c = 0,278 g /100ml, MeOH)

#### 4.6. Sinteza 3-((5-(2,4-diokso-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroksi-tetrahidrofuran-2-il)metilamino)-3-oksopropanojske kisline (OBK 6)



**OBK 6** smo sintetizirali po postopku povzetem po članku (26). 172 mg (0,5 mmol) spojine **OBK 5** smo suspendirali v 8,4 mL vode in ohladili na ledu. Prav tako smo na ledu ohladili 25,4 mL  $\text{CF}_3\text{COOH}$ , ki smo jo po kapljicah dodali suspenziji in mešali na sobni temperaturi 1 uro. Potem smo odparili vodo (17 mbar,  $T = 40^\circ\text{C}$ ), pri čemer smo dobili rjavo viskozno tekočino, ki smo jo kristalizirali iz EtOH in dietiletra.

**Izkoristek:** 46 %

**Elementna sestava:**  $\text{C}_{12}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_8$

**M** = 329,09 g/mol

**Opis:** bel prašek

**T tališča:** 160 - 163°C

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):**  $\delta$  3.12 (s, 2H,  $\text{CH}_2\text{-COOH}$ ), 3.30-3.52 (m, 2H,  $\text{NH-CH}_2$ ), 3.80-3.90 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-CH-O+HC-CH-CH}$ ), 4.11 (t,  $J = 5.35$  Hz, 1H,  $\text{CH-CH-CH}$ ), 5.69 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H,  $\text{HC=CH-CO}$ ), 5.80 (d,  $J = 5.7$  Hz, 1H,  $\text{O-CH-CH}$ ), 7.76 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H,  $\text{N-CH=CH}$ ), 8.54 (s, 1H,  $\text{CO-NH-CH}_2$ ), 11.40 (s, 1H,  $\text{CO-NH-CO}$ ) ppm.

**$^{13}\text{C-NMR}$ :** 40.5, 43.1, 70.5, 72.4, 82.5, 87.8, 101.9, 141.2 ppm.

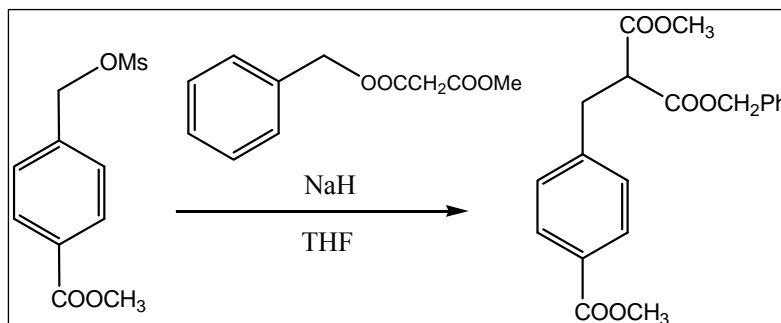
**MS (ESI): m/z (%):** 330 ( $\text{MH}^+$ , 100)

**HR-MS: m/z:**  $\text{MH}^+$  330,0932 (izračunano za  $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{N}_3\text{O}_8$ : 330,0937)

**IR (KBr):** 3939, 3889, 3776, 3330, 2943, 1697, 1564, 1504, 1469, 1338, 1266  $\text{cm}^{-1}$ .

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -33,3^\circ$  ( $c = 0,306$  g /100ml, MeOH)

## 4.7. Sinteza 1-benzil 3-metil 2-(4-(metoksikarbonil)benzil)malonata (OBK 7)



V bučko smo previdno natehtali 1,2 g 60% (29 mmol) NaH in dodali 100 mL brezvodnega THF. Nato smo bučko ohladili na ledu in s kapalnikom dodali 5,2 mL (29 mmol) 1-benzil 3-metilmalonata ter nastalo suspenzijo mešali 30 min na sobni temperaturi. Vsebino bučke smo nato ponovno ohladili na ledu, počasi dodali 3,6 g mesilata in mešali na sobni temperaturi 24 ur. Raztopino smo nevtralizirali z 1M HCl, dodali 200 mL dietiletra in sprali z 2×25 mL nasičene vodne raztopine NaHCO<sub>3</sub>, s 25 mL nasičene vodne raztopine NaCl in sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po filtriraciji sušilnega sredstva smo organsko fazo uparili in nastali surovi produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF:heksan/EtOAc= 4/1) (OBK 7).

**Rf:** 0,26 (MF:heksan/EtOAc = 4/1)

**Izkoristek:** 79 %

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

**M** = 356,13 g/mol

**Opis:** beli kristali

**T** tališča: 67°C

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 3.28 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH), 3.69 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.75 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH), 3.92 (s, 3H, Ar-COOCH<sub>3</sub>), 5.15 (s, 2H, O-CH<sub>2</sub>-Ar), 7.19-7.26 (m, 4H, Ar-H), 7.28-7.36 (m, 3H, Ar-H), 7.94 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H) ppm.

**MS (ESI):** *m/z* (%): 379 (MNa<sup>+</sup>, 3), 77 (4)

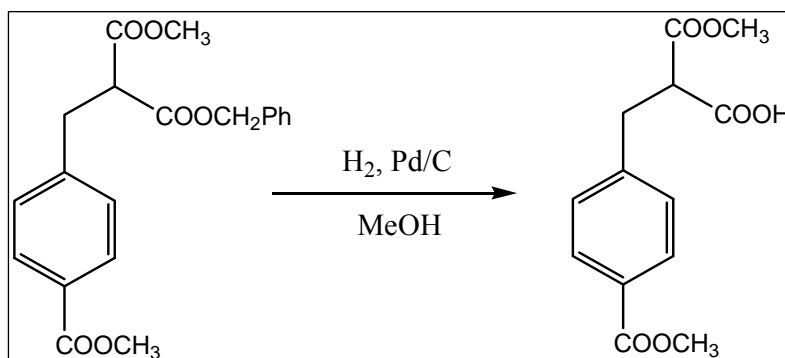
**Elementna analiza za C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>:**

	%C	%H	%N
<b>Izračunano:</b>	67,41	5,66	0
<b>Ugotovljeno:</b>	67,60	5,63	0

**IR (KBr):** 3903, 3854, 3690, 1708, 1654, 1560, 1296, 1228, 1201, 1146, 764  $\text{cm}^{-1}$ .

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +2,4^{\circ}$  ( $c = 0,302 \text{ g}/100\text{ml}$ , MeOH)

#### 4.8. Sinteza 3-metoksi-2-(4-(metoksikarbonil)benzil)-3-oksopropanojske kisline (OBK 8)



1,2 g **OBK 7** (4,4 mmol) smo raztopili v 70 mL MeOH in preprihovali z Ar 30 min. Dodali smo 10% Pd/C (113 mg), mešali 24 ur v atmosferi  $\text{H}_2$  nato odfiltrirali katalizator in topilo odparili pod znižanim tlakom.

**Rf:** 0,19 (MF:heksan/ EtOAc = 1/1)

**Izkoristek:** 94 %

**Elementna sestava:**  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_6$

**M** = 266,08 g/mol

**Opis:** beli kristali

**T tališča:**  $82^{\circ}\text{C}$

**$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):**  $\delta$  3.23 (d,  $J = 7.7 \text{ Hz}$ , 2H, Ar- $\text{CH}_2$ -CH), 3.61 (s, 3H,  $\text{COOCH}_3$ ), 3.69 (dd,  $J = 9.4 \text{ Hz}$ ,  $J = 6.0 \text{ Hz}$ , 1H, Ar- $\text{CH}_2$ -CH), 3.88 (s, 3H, Ar- $\text{COOCH}_3$ ), 7.24 (d,  $J = 8.2 \text{ Hz}$ , 1H, Ar-H), 7.91 (d,  $J = 8.2 \text{ Hz}$ , 1H, Ar-H) ppm.

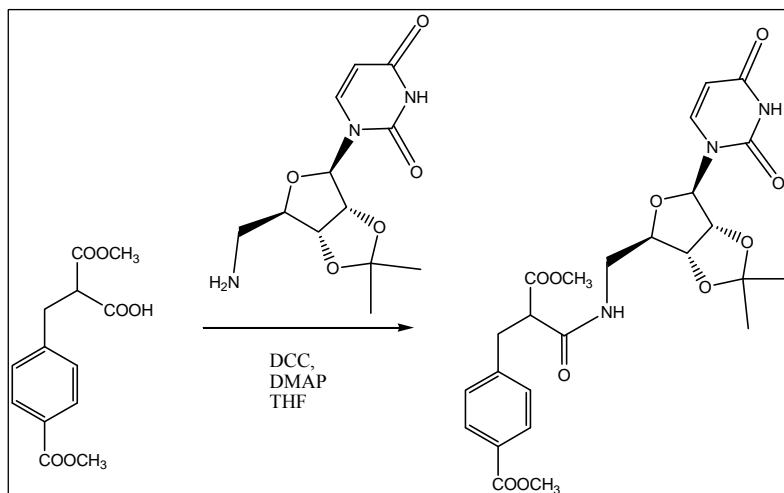
**MS (ESI): m/z (%):** 289 ( $\text{MNa}^+$ , 80), 276 (100)

**HR-MS: m/z:**  $\text{MNa}^+$  289,0688 (izračunano za  $\text{C}_{13}\text{H}_{14}\text{O}_6$  23Na: 289,0688)

**IR (KBr):** 3893, 3691, 3416, 2954, 1722, 1611, 1511, 1438, 1384, 1314, 1283, 1113  $\text{cm}^{-1}$ .

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +1,2^{\circ}$  ( $c = 0,300 \text{ g}/100\text{ml}$ , MeOH)

**4.9. Sinteza metil 4-(3-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-diokso-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)metilamino)-2-(metoksikarbonil)-3-oksopropil)benzoata (OBK 9)**



1,1 g (3,9 mmol) spojine **OBK 8** smo raztopili v 50 mL brezvodnega THF. Raztopino smo ohladili na ledu, dodali 801 mg (3,9 mmol) DCC, 1,1 g (3,9 mmol) **OBK 3**, 474 mg (3,9 mmol) DMAP in mešali 48 ur. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF:heksan/EtOAc = 1/4).

**Rf:** 0,23 (MF:heksan/EtOAc = 1/4)

**Izkoristek:** 40 %

**Elementna sestava:** C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>

**M** = 531,19 g/mol

**Opis:** bel prašek

**T** tališča: 90-95°C

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 1.24, 1.25 (s, 1.5H, CH<sub>3</sub>), 1.44, 1.45 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.23-3.00 (m, 4H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH + CO-NH-CH<sub>2</sub>), 3.45-3.21 (m, 1H, CO-NH-CH<sub>2</sub>), 3.68 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.65-3.85 (m, 4.5H, NH-CH<sub>2</sub>-CH + CH<sub>2</sub>-CH-COOCH<sub>3</sub> + Ar-COOCH<sub>3</sub>), 3.89 (q, *J* = 5.9 Hz, 0.5H, NH-CH<sub>2</sub>-CH), 4.59, 4.39 (dd, *J* = 6.5 Hz, *J* = 4.4 Hz, 1H, O-CH-CH-O), 4.79, 4.97 (dd, *J* = 6.5 Hz, *J* = 2.2 Hz, 1H, O-CH-CH-CH), 5.62, 5.63 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, N-CH=CH), 5.69, 5.70 (d, *J* = 1.80 Hz, 1H, O-CH-CH), 7.34 (AABB, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.63, 7.65 (d, *J* = 8.40 Hz, 1H, CH=CH-CO), 7.83 (2xd AABB, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar-H), 8.38-8.27 (m, 1H, CO-NH-CH), 11.41 (s, 1H, CO-NH-CO) ppm.

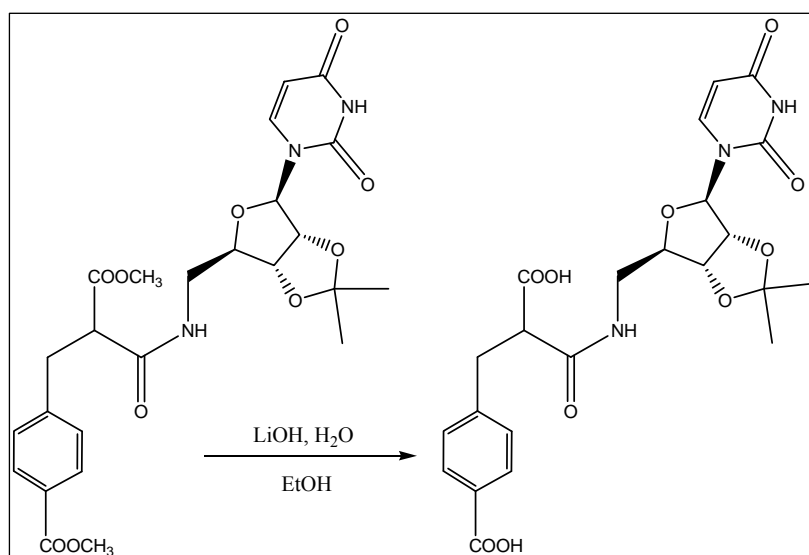
**MS (ESI): m/z (%):** 532 (MH<sup>+</sup>, 50), 365 (100)

**HR-MS: m/z:** MH<sup>+</sup> 532,1926 (izračunano za C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>: 532,1931)

**IR (KBr):** 3851, 3330, 3070, 2990, 1719, 1612, 1437, 1383, 1280, 1091 cm<sup>-1</sup>.

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = - 25,5° (c = 0,300 g /100ml, MeOH)

**4.10. Sinteza 4-(2-karboksi-3-(((3aR,4R,6R,6aR)-6-(2,4-diokso-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)metilamino)-3-oksopropil)benzojske kisline (OBK 10)**



821 mg (1,6 mmol) **OBK 9** smo raztopili v 50 mL 96% EtOH, dodali 185 mg (7,7 mmol) LiOH in 1 mL (46 mmol) H<sub>2</sub>O. Intenzivno rumeno obarvano raztopino smo mešali 24 ur. Nato smo raztopino nakisali z 1M HCl iz pH 12 na 8, pod znižanim tlakom uparili EtOH, dodali 20 mL vode, postavili na ledeno kopel in nakisali z 1M HCl do pH 3. Izpadla je bela kosmičasta oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in posušili na vodni črpalki.

**Rf:** 0 (MF: EtOAc)

**Izkoristek:** 41 %

**Elementna sestava:** C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>

**M** = 503,15 g/mol

**Opis:** bel prašek



$T_{\text{taljšča}}$  : 139-142°C

$^1\text{H-NMR}$  (300 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  1.24, 1.26 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.44, 1.45 (s, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.95-3.15 (m, 2H, Ar- $\text{CH}_2$ ), 3.16-3.50 (m, 2H, CO-NH- $\text{CH}_2$ ), 3.54-3.68 (m, 1H, Ar- $\text{CH}_2$ -CH), 3.75-3.95 (m, 1H, NH- $\text{CH}_2$ -CH), 4.30, 4.60 (dd,  $J = 6.6$  Hz,  $J = 4.1$  Hz, 1H, NH- $\text{CH}_2$ -CH-CH), 4.71, 4.93, (dd,  $J = 6.4$  Hz,  $J = 2.6$  Hz, 1H, CH-CH-CH), 5.50-6.60 (m, 1H, CH=CH), 5.68 -5.73 (m, 1H, O-CH-CH), 7.32 (AABB,  $J = 7.30$  Hz, 2H, Ar-H), 7.58, 7.65 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, CH=CH-N), 7.76-7.87 (m, 2H, Ar-H), 8.20-8.33 (m, 1H, CO-NH- $\text{CH}_2$ ), 11.41 (s, 1H, Ar-NH), 12,63 (s, 1H, COOH) ppm.

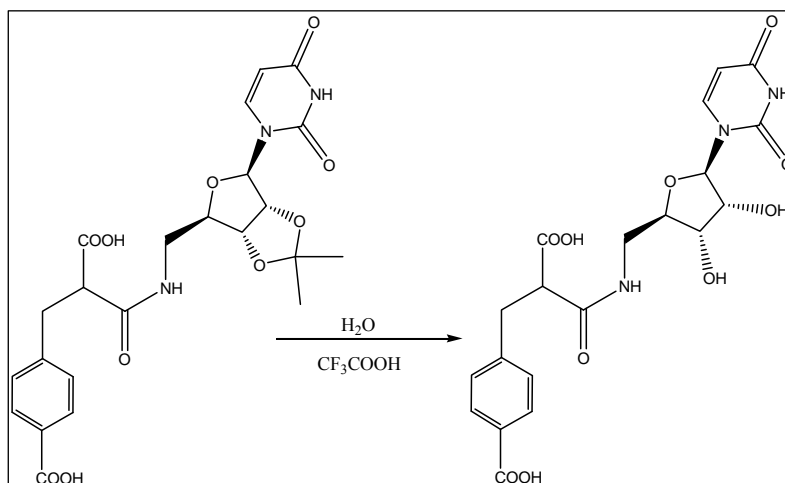
MS (ESI): m/z (%): 225 (50), 504 ( $\text{MH}^+$ , 5)

HR-MS: m/z :  $\text{MH}^+$  504,1626 (izračunano za  $\text{C}_{23}\text{H}_{26}\text{N}_3\text{O}_{10}$ : 504,1618)

IR (KBr): 3327, 2929, 2850, 1699, 1574, 1460, 1384, 1276, 1215, 1182  $\text{cm}^{-1}$ .

Optična sučnost:  $[\alpha]_D^{20} = -14,6^\circ$  ( $c = 0,294$  g /100ml, MeOH)

#### 4.11. Sinteza 4-(2-karboksi-3-(((2R,3S,4R,5R)-5-(2,4-diokso-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroksi-tetrahidrofuran-2-il)metilamino)-3-oksopropil)benzojske kisline (OBK 11)



**OBK 11** smo sintetizirali po postopku iz članka (26). 315 mg (0,7 mmol) **OBK 10** smo suspendirali v 8,4 mL vode in ohladili na ledu. Suspenziji smo nato po kapljicah dodali 25,4 mL ohlajene  $\text{CF}_3\text{COOH}$  in mešali 1 uro na sobni temperaturi. Pod znižanim tlakom smo odparili vodo, preostanek raztopili v EtOH in oborili z zmesjo etanola in dietiletra.

**Rf:** 0 (MF: EtOAc)

**Izkoristek:** 18 %

**Elementna sestava:** C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>

**M** = 463,12 g/mol

**Opis:** bel prašek

**T<sub>tališča</sub>** : 142-145°C

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.92-3.11 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 3.12-3.50 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>), 3.60 (t, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH), 3.68-3.80 (m, 1.5 H, NH-CH<sub>2</sub>-CH + CH<sub>2</sub>-CH-CH-OH), 3.84 (dd, *J* = 8.6 Hz, *J* = 4.1 Hz, 0.5H, CH<sub>2</sub>-CH-CH-OH), 5.32 (s, 2H, OH), 5.60 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH=CH), 5.69, 5.71 (t, *J* = 5.7, 1H, CH-CH-CH), 7.38-7.27 (m, 2H, Ar-H), 7.53, 7.62 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH=CH), 7.77-7.89 (m, 2H, Ar-H), 8.20-8.30 (m, 1H, CO-NH-CH<sub>2</sub>), 11.32 (s, 1H, CO-NH-CO), 12.5 (br, 2H, COOH) ppm.

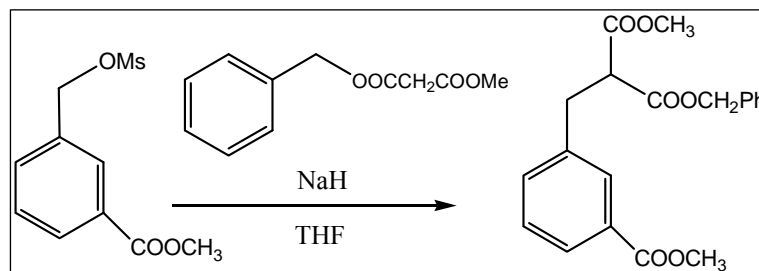
**MS (ESI): m/z (%):** 462 (M-H<sup>-</sup>, 20), 512 (100)

**HR-MS: m/z :** MH<sup>+</sup> 464,1327 (izračunano za C<sub>20</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>: 464,1305)

**IR (KBr):** 3904, 3891, 3770, 3373, 1699, 1559, 1498, 1281, 1250, 1202, 1181, 1109 cm<sup>-1</sup>.

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = - 27,1° (c = 0,285 g /100ml, MeOH)

#### 4.12. Sinteza 1-benzil 3-metil 2-(3-(metoksikarbonil)benzil)malonata (OBK 12)



V bučko smo previdno natehtali 1,4 g 60% (34 mmol) NaH in dodali 40 mL brezvodnega THF. Nato smo bučko ohladili na ledu in s kapalnikom dodali 6,2 mL (34 mmol) 1-benzil 3-metilmalonata ter nastalo suspenzijo mešali 30 min na sobni temperaturi. Vsebino bučke smo nato ponovno ohladili na ledu, počasi dodali 4,3 g (17 mmol) mesilata in mešali na sobni temperaturi 24 ur. Raztopino smo nevtralizirali z 1M HCl, dodali 200 mL dietiletra in sprali z 2×25 mL nasičene vodne raztopine NaHCO<sub>3</sub>, s 25 mL nasičene vodne raztopine

NaCl in sušili z brezvodnim Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Po filtraciji sušilnega sredstva smo organsko fazo uparili in nastali surovi produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF:heksan/EtOAc = 4/1).

**Rf:** 0,24 (MF:heksan/ EtOAc = 4/1)

**Izkoristek:** 36 %

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

**M** = 356,13 g/mol

**Opis:** prozorna viskozna tekočina

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 3.28 (d, *J* = 7.8 Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH), 3.68 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.74 (t, *J* = 7.8 Hz, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH), 3.90 (s, 3H, Ar-COOCH<sub>3</sub>), 5.13 (s, 2H, COOCH<sub>2</sub>-Ar), 7.20-7.29 (m, 2H, Ar-H), 7.30-7.42 (m, 5H, Ar-H), 7.83-7.94 (m, 2H, Ar-H) ppm.

**MS (ESI): m/z (%):** 379 (MNa<sup>+</sup>, 100)

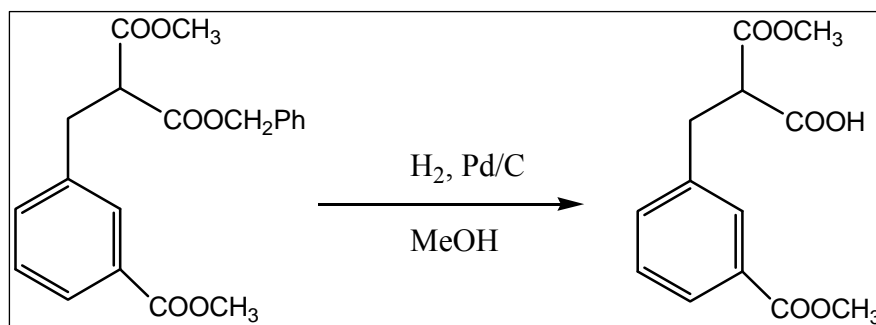
**Elementna analiza za C<sub>40</sub>H<sub>42</sub>O<sub>13</sub> × H<sub>2</sub>O:**

	%C	%H	%N
<b>Izračunano:</b>	65,74	5,79	0
<b>Ugotovljeno:</b>	66,07	5,59	0

**IR (KBr):** 3032, 2952, 1725, 1606, 1434, 1286, 1149, 751 cm<sup>-1</sup>.

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 1,2° (c = 0,303 g /100ml, MeOH)

#### 4.13. Sinteza 3-metoksi-2-(3-(metoksikarbonil)benzil)-3-oksopropanojske kisline (OBK 13)



1,2 g ( 3,3 mmol) **OBK 12** smo raztopili v 100 mL MeOH in preprihovali z Ar 30min. Dodali smo 10% (190 mg) Pd/C in mešali 24 ur v atmosferi H<sub>2</sub>. Nato smo odfiltrirali katalizator in uparili topilo pod znižanim tlakom.

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

**Izkoristek:** 95 %

**Elementna sestava:** C<sub>13</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>

**M** = 266,08 g/mol

**Opis:** viskozna tekočina

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, CDCl<sub>3</sub>):** δ 3.20 (d, *J* = 3.90 Hz, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 3.50 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.64 (d, *J* = 2.4 Hz, 1H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH), 3.84 (s, 3H, Ar-COOCH<sub>3</sub>), 7.23, 7.34 (dd, *J* = 7.8 Hz, *J* = 7.8 Hz, 2H, Ar-H), 7.80 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H) ppm.

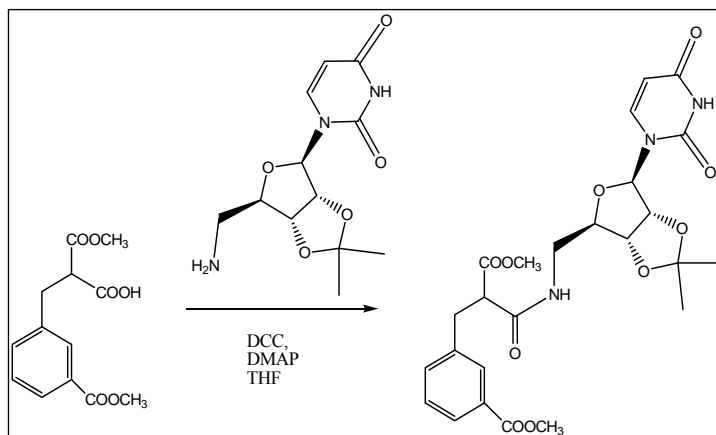
**MS (ESI): m/z (%):** 189 (10), 265 (M-H<sup>-</sup>, 7)

**HR-MS: m/z :** MH<sup>+</sup> 267,1033 (izračunano za C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>O<sub>3</sub>: 267,1021

**IR (KBr):** 3416, 3004, 1722, 1613, 1285, 1161, 753 cm<sup>-1</sup>.

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = + 1,8° (c = 0,303 g /100ml, MeOH)

**4.14. Sinteza metil 3-(3-(((3a*S*,6a*S*)-6-(2,4-dioksa-3,4-dihidropirimidin-1(2*H*)-il)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-*d*][1,3]dioksol-4-il)metilamino)-2-(metoksikarbonil)-3-oksopropil)benzoata (OBK 14)**



1,1 g (3,9 mmol) spojine **OBK 13** smo raztopili v 50 mL brezvodnega THF, ohladili na ledu in med mešanjem dodali 801 mg (3,9 mmol) DCC, 1,10 g (3,9 mmol) **OBK 3** ter 474 mg (3,9 mmol) DMAP. Po 48 urah smo produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF:heksan/EtOAc = 1/4).

**Rf:** 0,24 (MF:heksan/EtOAc = 1/4)

**Izkoristek:** 63 %

**Elementna sestava:** C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>

**M** = 531,19 g/mol

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 91-95°C

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-*d*<sub>6</sub>):** δ 1.24, 1.26 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.45, 1.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.99-3.22 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 3.22-3.48 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>-CH), 3.59, 3.60 (s, 3H, COOCH<sub>3</sub>), 3.65-3.80 (m, 1.5H, Ar-CH<sub>2</sub>-CH + NH-CH<sub>2</sub>-CH), 3.81, 3.83 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.89 (dd, *J* = 10.1 Hz, *J* = 5.7 Hz, 0.5 H, NH-CH<sub>2</sub>-CH), 4.44, 4.58 (dd, *J* = 4.4 Hz, *J* = 6.5 Hz, 1H, CH-CH), 4.82, 4.96 (dd, *J* = 6.5 Hz, *J* = 2.3 Hz, 1H, CH-CH), 5.62 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, O-CH-N), 5.69 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, N-CH=CH), 7.40 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.47 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.62, 7.65 (d, *J* = 8.1 Hz, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH=CH), 7.80-7.88 (m, 2H, Ar-H), 8.34 (t, *J* = 5.37 Hz, 1H, OC-NH), 11.41 (s, 1H, Ar-NH) ppm.

**MS (ESI): m/z (%):** 532 (MH<sup>+</sup>, 100)

**HR-MS: m/z : MH<sup>+</sup> 532,1930** (izračunano za C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>: 532,1931)

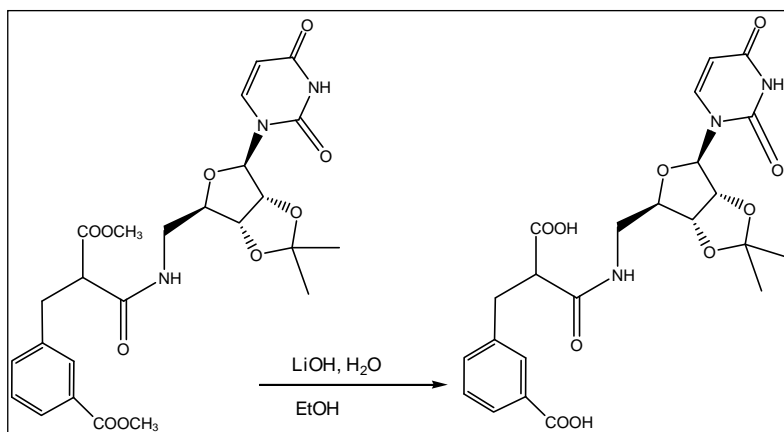
**Elementna analiza za C<sub>25</sub>H<sub>29</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub> × ¼ H<sub>2</sub>O:**

	%C	%H	%N
<b>Izračunano:</b>	56,02	5,55	7,84
<b>Ugotovljeno:</b>	55,69	5,42	8,33

**IR (KBr):** 3904, 3328, 2990, 1718, 1542, 1287, 1988, 754 cm<sup>-1</sup>.

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = - 11,2° (c = 0,290 g /100ml, MeOH)

**4.15. Sinteza 3-(2-karboksi-3-(((3aS,6aS)-6-(2,4-diokso-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-2,2-dimetil-tetrahidrofuro[3,4-d][1,3]dioksol-4-il)metilamino)-3-oksopropil)benzojske kisline (OBK 15)**



1,3 g (2,5 mmol) **OBK 14** smo raztopili v 100 mL 96% EtOH, dodali 293 mg (2,5 mmol) LiOH in 1,5 mL (73 mmol) H<sub>2</sub>O ter mešali 24 ur. Bledo rumeno raztopino smo nato nakisali z 1M HCl iz pH 12 na 8 in uparili EtOH pod znižanim tlakom. Preostanku smo dodali 20 mL vode in nakisali z 1M HCl do pH 3. Izpadla je bela kosmičasta oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem in posušili na vodni črpalki.

**Rf:** 0 (MF: EtOAc)

**Izkoristek:** 65 %

**Elementna sestava:** C<sub>23</sub>H<sub>25</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>

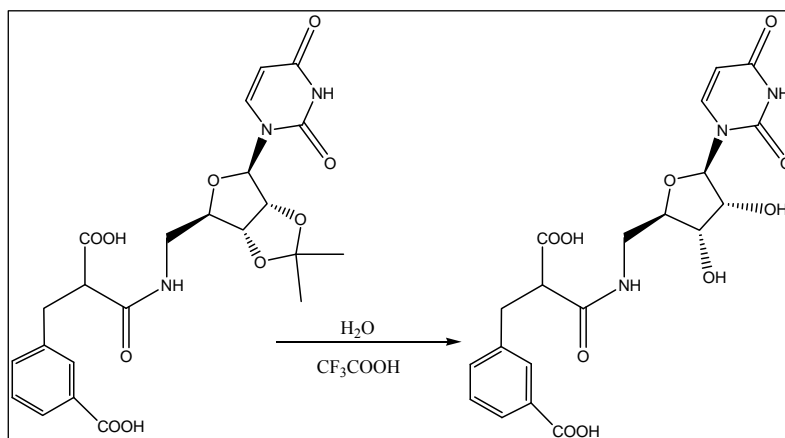
**M** = 503,15 g/mol

**Opis:** rumena, viskozna tekočina

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 1.24, 1.26, (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.44, 1.46 (s, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.96-3.18 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 3.21-3.70 (m, 3H, NH-CH<sub>2</sub>-CH + CH<sub>2</sub>-CH-COOH), 3.92 (dd, *J* = 9.80 Hz, *J* = 5.05 Hz, 0.5H, NH-CH<sub>2</sub>-CH), 3.83 (dd, *J* = 10.18 Hz, *J* = 5.26 Hz, *J* = 0.5H, NH-CH<sub>2</sub>-CH), 4.42-4.50, 4.55-4.64 (m, 1H, CH<sub>2</sub>-CH-CH-O), 4.74-4.83, 4.87-4.94 (m, 1H, NH-CH-O), 5.62, 5.66 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, CH=CH), 5.71, 5.76 (d, *J* = 2.6 Hz, 1H, O-CH-CH), 7.33-7.42 (m, 2H, Ar-H), 7.60, 7.66 (d, *J* = 8.0 Hz, CH=CH), 7.71-7.85 (m, 1H, Ar-H), 8.31 (t, *J* = 4.9 Hz, 1H, CO-NH-CH<sub>2</sub>), 11.39 (br, 1H, CO-NH-CO), 11.44 (br, 1H, COOH) ppm.

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = -10,4^\circ$  (*c* = 0,322 g /100ml, MeOH)

**4.16. Sinteza 3-(2-karboksi-3-(((3R,4S)-5-(2,4-diokso-3,4-dihidropirimidin-1(2H)-il)-3,4-dihidroksi-tetrahidrofuran-2-il)metilamino)-3-oksopropil)benzojske kisline (OBK 16)**



**OBK 16** smo pripravili po postopku iz članka (26). 806 mg spojine **OBK 15** smo suspendirali v 8,4 mL vode in ohladili na ledu. Suspenziji smo nato po kapljicah dodali 25,4 mL ohlajene CF<sub>3</sub>COOH in mešali 1 uro na sobni temperaturi. Pod znižanim tlakom smo odparili vodo, preostanek raztopili v EtOH in oborili z zmesjo etanola in dietiletra.

**Rf:** 0 (MF: EtOAc)

**Izkoristek:** 37 %

**Elementna sestava:** C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>

**M** = 463,12 g/mol

**Opis:** bel prašek

**T<sub>tališča</sub>** : 130 -150°C

**<sup>1</sup>H-NMR (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):** δ 2.96-3.14 (m, 2H, Ar-CH<sub>2</sub>), 3.26-3.47 (m, 2H, NH-CH<sub>2</sub>), 3.60 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH-C=O), 3.69 (m, 1.5H, CH<sub>2</sub>-CH-CHO + CH<sub>2</sub>-CH-CHO), 3.83 (dd, *J* = 8.7 Hz, *J* = 4.4 Hz, 0.5H, CH-CH-CH), 3.95, 4.00 (dd, *J* = 5.5 Hz, *J* = 10.5 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>-CH-CH-CH), 5.3 (br, 2H, OH), 5.58-5.62 (m, 1H, CH=CH), 5.68-5.80 (m, 1H, N-CH-CH), 7.38 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.45 (t, *J* = 9.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.56, 7.62 (dd, *J* = 8.1 Hz, 1H, CH=CH), 7.70-7.85 (m, 2H, Ar-H), 8.30 (s, 1H, CO-NH), 11.33 (s, 1H, Ar-NH), 12.52 (br, 1H, COOH) ppm.

**MS (ESI): m/z (%):** 464 (MH<sup>+</sup>, 25), 492 (100)

**Elementna analiza za: C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub> , 1/5× H<sub>2</sub>O:**

	%C	H	%N
<b>Izračunano:</b>	51,44	4,62	9,00
<b>Ugotovljeno:</b>	51,82	4,78	8,49

**IR (KBr):** 3328, 1718, 1542, 1437, 1382, 1287, 1206, 1088, 754 cm<sup>-1</sup>.

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = - 19,1° (c = 0,313 g /100ml, MeOH)

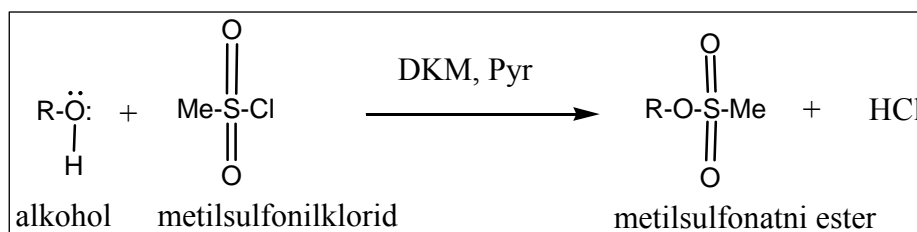


## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

V eksperimentalnem delu diplomske naloge smo uspešno sintetizirali 3 končne spojine, ki naj bi bile nizkomolekularni inhibitorji MurC in 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

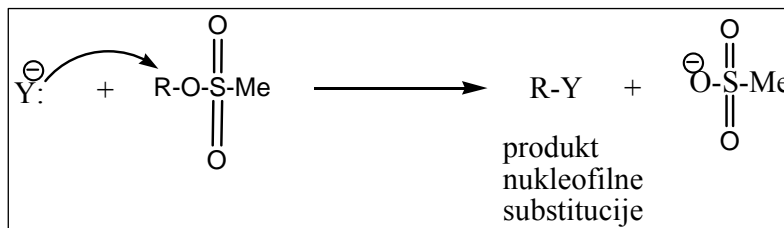
▪ Pri sintezi novih inhibitorjev Mur-ligaz smo izhajali iz 5'-amino-5'-deoksi-2',3'-O-izopropiliden uridina, pri katerem smo prosto hidroksilno skupino pretvorili v metilsulfonatni ester. Na ta način smo slabo izstopajočo OH skupino pretvorili v aktivirano skupino, ki lahko reagira z različnimi nukleofili po mehanizmu nukleofilne substitucije. Reakcija običajno poteče ob prisotnosti piridina (slika 9). Namesto mesilata bi lahko pripravili tudi tosilat s pomočjo p-toluensulfonilklorida. Poleg tega bi lahko OH skupino pretvorili v različne alkilhalogenide (alkilklorid, alkilbromid) s pomočjo različnih reagentov (npr. PPh<sub>3</sub>, CBr<sub>4</sub>).



**Slika 9:** Mehanizem nastanka estra iz mesilata

▪ Alkilsulfonatni estri reagirajo z nukleofili po mehanizmu nukleofilne substitucije, najpogosteje S<sub>N</sub>2. V našem primeru smo izvedli substitucijo z azidno skupino (-N<sub>3</sub>) (slika 10), ki predstavlja predstopnjo za amino skupino.

Ker je azid slabo topen v nepolarnih topilih (npr. v organskem topilu DKM), smo izvedli reakcijo pri povišani temperaturi (45°C) in v polarnem aprotičnem topilu (DMF).



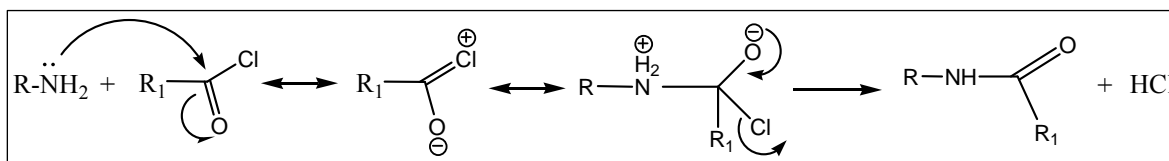
**Slika 10:** Mehanizem nukleofilne substitucije alkil sulfonatnega estra z azidom

▪ Redukcijo alkilazida smo izvedli v metanolu in atmosferi vodika. Za katalizator smo uporabili Pd/C, ki preko velike specifične površine izboljša stik med obema reagentoma. Ker je v uridinskem obroču prisotna dvojna vez, ki se pri povišanem tlaku reducira, reakcijo izvajamo pri tlaku 1 atm in sobni temperaturi. S tem dosežemo večjo selektivnost reakcije.

Amine lahko pripravimo tudi na drugačen način, na primer z amoniakom. Pri tem nastane zmes primarnega, sekundarnega in terciarnega amina. Bolj selektivna metoda za pripravo primarnega amina je aminiranje s tetraazaadamantanom, ki pa je izvedbeno bolj zapletena od uporabljene metode.

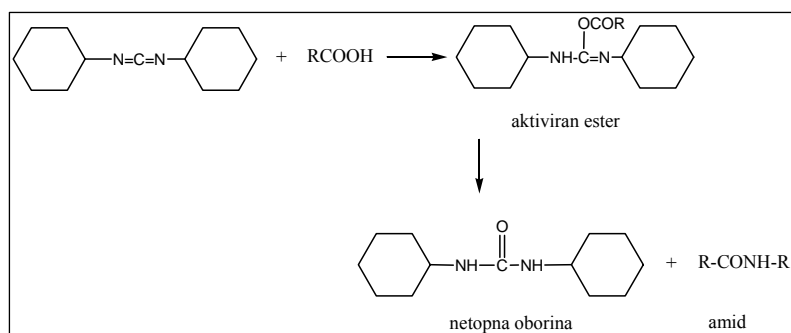
Redukcijo azida smo izvedli tudi z dodatkom nekaj kapljic CH<sub>3</sub>COOH (nastanek **OBK 3**), s čemer smo želeli preprečiti možno vezavo paladija na amin, nakar smo kasneje ugotovili, da prisotnost kisline ne vpliva na potek reakcije.

▪ Amide lahko pripravimo iz aminov s pomočjo kislinskih kloridov, anhidridov (simetrični, mešani), aktiviranih estrov, s karbodiimidno metodo (DCC) in z difenilfosforilazidom (DPPA). Za sintezo **OBK 4** smo uporabili metilmalonilklorid. Kislinski kloridi so med omenjenimi derivati karboksilnih kislin najbolj reaktivni. Sinteza amidov poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije, pri kateri nukleofilna NH<sub>2</sub> skupina s prostim elektronskim parom napade elektrofilen C-atom nato sledi eliminacija dobro izstopajoče skupine, v našem primeru HCl (slika 11). Pri reakciji smo uporabili Et<sub>3</sub>N kot bazo, katera je reagirala s HCl do nastanka soli.



Slika 11: Mehanizem nastanka amidne vezi med aminom in kislinskim kloridom

Pri sintezi spojin **OBK 9** in **14** smo uporabili drug način aktivacije karboksilne skupine kisline. Za aciliranje smo izbrali DCC metodo. Pri njej se v prvi stopnji tvori aktiviran ester med kislinsko karboksilno skupino in dicikloheksilkarbodiimidom, s katerim nato reagira amin (slika 12). Dimetilaminopiridin smo uporabili kot katalizator in bazo. Za usmeritev reakcije v N-aciliran produkt in preprečitev nastanka stranskih produktov (O-aciliranje) smo reakcijo izvajali pri nizki temperaturi (ledena kopel).

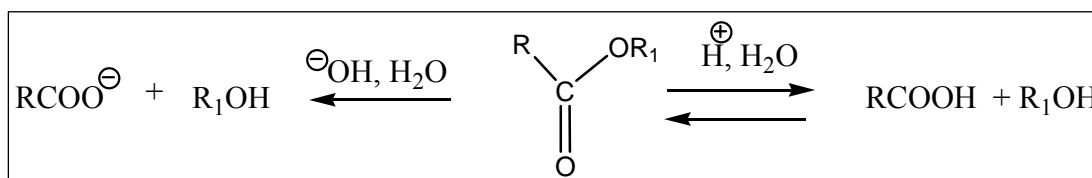


Slika 12: Mehanizem aciliranja z DCC metodo

- Metilne estre smo hidrolizirali v bazičnem mediju z LiOH v MeOH. Pri sintezi OBK 10 in 15 smo uporabili topilo EtOH, kar ni bistveno vplivalo na potek reakcije. Kot baza bi lahko uporabili tudi NaOH ali KOH, ker pa sta to močnejši bazi kot LiOH, smo le tega uporabili z namenom selektivnega poteka reakcije. LiOH smo uporabili tudi zato, ker je dobro topen v organskih topilih (EtOH, MeOH).

Pri bazično katalizirani hidrolizi nastaneta alkohol in sol karboksilne kisline. Hidrolizo estrov lahko izvedemo tudi v kislem mediju oz. pod vplivom encimov (slika 13).

Slednji reakciji sta reverzibilni, na smer poteka reakcije pa lahko vplivamo z izbiro ustreznih pogojev (pH, sprotno odstranjevanje enega od produktov reakcije).



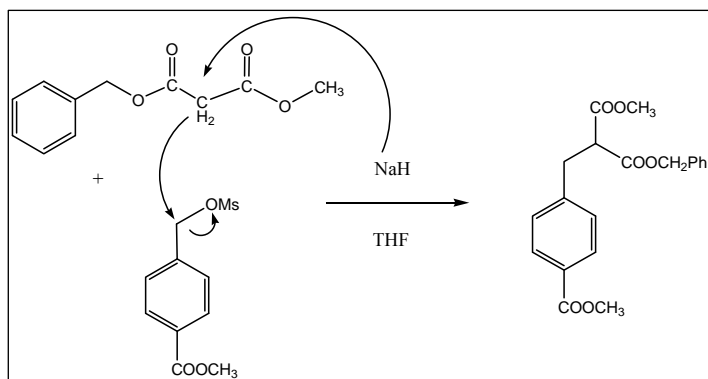
Slika 13: Ireverzibilna bazična in reverzibilna kislinska hidroliza

V našem primeru uporaba kisline ni primerna zaradi ostalih zaščitnih skupin (acetonidna), ki bi se tudi odstranile.

Po hidrolizi estra z LiOH smo težko izolirali spojine **OBK 5**, **OBK 10** in **OBK 15**, ker je LiOH podobno kot naše spojine topen v vodi. Problem topnosti obeh spojin v vodi smo pri **OBK 6** rešili tako, da smo spojino prelili z zmesjo etanola in dietiletra, pri tem se je LiCl raztopil naša spojina pa ne.

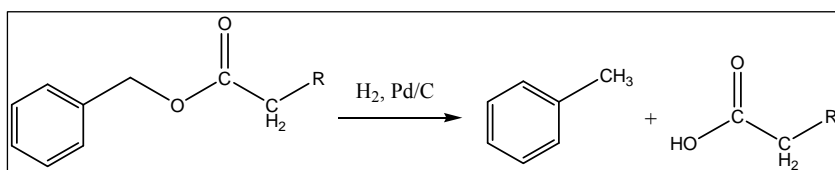
- Reakcija med mesilatom in diestrom malonske kisline poteče po mehanizmu nukleofilne substitucije (nastane **OBK 7**). Nukleofil predstavlja aktivirana metilenska skupina malonata, kateri lahko z NaH odcepimo enega izmed kislinskih vodikov (slika 14). Nastali anion napade elektrofilno benzilno CH<sub>2</sub> skupino v mesilatu, izstopi pa dobro izstopajoča skupina CH<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>H. Proste malonske kisline ne moremo uporabiti, saj bi bili protoni na karboksilni skupini bolj kisli in bi nastala ustrezna sol. Uporabili smo asimetrični ester malonske kisline, ki nam omogoča selektivno hidrolizo estrov. Za topilo smo uporabili brezvodni aprotični tetrahidrofuran (THF), lahko bi uporabili katerokoli brezvodno aprotično topilo (DMF, dioksan). Če bi bila v topilu prisotna voda bi le-ta reagirala z NaH do NaOH, ki je šibkejša baza kot NaH. Nastali NaOH bi lahko tudi neselektivno hidroliziral ester.

Nastalo **OBK 7** smo težko ločili od nezreagirane izhodne spojine, saj imata spojini zelo podobna retencijska faktorja (R<sub>f</sub>).



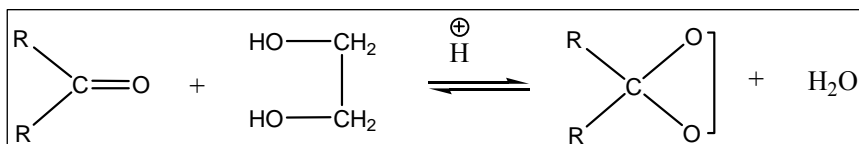
**Slika 14:** Mehanizem uvedbe benzilmetil malonata

- Benzilno skupino najlažje odstranimo s katalitičnim hidrogeniranjem (slika 15), medtem ko je za odstranitev metilnega estra primerna bazična hidroliza. Reakcijo smo izvedli v metanolu, kjer smo izhodno spojino raztopili in mešanico prepihali z argonom. Na ta način smo odstranili prisoten kisik, ki bi lahko povzročil vžig reakcijske zmesi zaradi reaktivnosti katalizatorja Pd/C. Nato smo reakcijsko zmes mešali v atmosferi vodika. Vir vodika je lahko tudi cikloheksadien, cikloheksen ali amonijev formiat.



**Slika 15:** Cepitev zaščitne benzilne skupine s hidrogenolizo

- Acetonidna zaščitna skupina je primerna za vicinalne diole, ki jih na ta način zaščitimo v obliki acetala. Podobno kot pri večini drugih acetalov je zaščita stabilna v nevtralnem oz. bazičnem mediju, odstranjujemo pa jo v kislem. Najpogosteje uporabimo dva reagenta:  $\text{CF}_3\text{COOH}$  kot v našem primeru oziroma HCl / AcOH (slika 16).

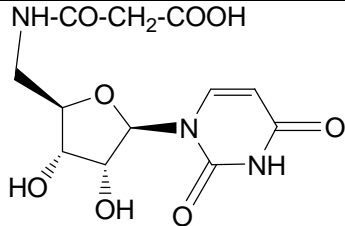
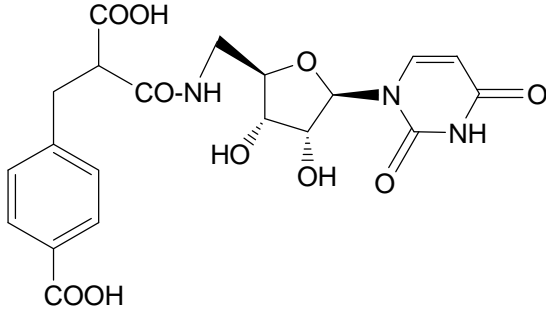
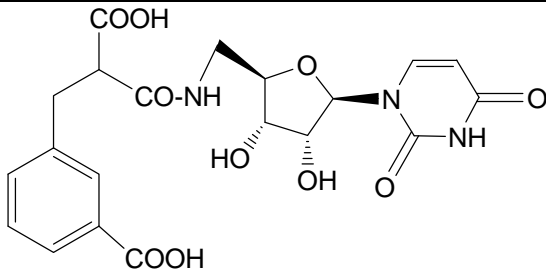


**Slika 16:** Zaščita in odščita ketala

## 5.2. Seznam sintetiziranih končnih spojin

Pri eksperimentalnem delu diplomske naloge smo uspešno sintetizirali 3 končne spojine (preglednica VIII), ki naj bi bile nizkomolekularni inhibitorji MurC in MurD encimov. Na koncu smo vsem spojinam določili inhibitorno aktivnost na encima MurC in MurD. Aktivnost spojin smo preizkusili pri koncentraciji 500  $\mu\text{M}$ . Rezultati so zbrani v preglednici VIII.

**Preglednica VIII:** Strukture končnih spojin in rezultati biokemijskega testiranja, predstavljeni kot rezidualne aktivnosti encima (RA%)

Stran	Oznaka spojine	Strukturna formula	c( $\mu\text{M}$ )	RA% MurC	RA% MurD
34	<b>OBK <u>6</u></b>		500	96	spojina ni testirana
39	<b>OBK <u>11</u></b>		500	100	81
46	<b>OBK <u>16</u></b>		500	101	81

Rezidualna aktivnost encima (RA) je razmerje katalitičnih aktivnosti encima z inhibitorjem in brez inhibitorja. Izrazimo jo v odstotkih in je merilo za učinkovitost inhibitorja. Določili smo jo s testom z malahitnim zelenim, pri čemer smo merili količino nastalega fosfata. Primerjava RA spojin nam poda razlike med učinkovitostjo spojin ter informacije o odnosu med strukturo in delovanjem. Manjša kot je RA, v večji meri inhibitor pri dani koncentraciji upočasni encimsko katalizirano reakcijo. Vrednosti RA od 80-100% so v mejah eksperimentalne napake, zato spojine s takšno aktivnostjo označimo za neaktivne. Tudi vrednosti nad 100% so verjetno posledica eksperimentalnih napak.

Pri koncentraciji 500  $\mu\text{M}$  se nobena od končnih spojin ni izkazala kot dober inhibitor MurC oz. MurD encima. Vzrokov za neaktivnost je lahko več: spojine tvorijo premalo interakcij z aktivnim mestom substrata, zaradi rigidnega distančnika (benzenov obroč) spojina ni zavzela ustrezne konformacije, ki je potrebna za vezavo v aktivno mesto.

## 6. SKLEP

V okviru diplomskega dela smo na osnovi poznavanja strukture substratov in produktov reakcij, ki jih katalizirajo encimi Mur, ter na osnovi poznavanja zgradbe aktivnega mesta encima načrtovali in sintetizirali več novih potencialnih inhibitorjev. Skupaj smo sintetizirali 16 spojin od tega 3 končne, ki smo jih biokemično ovrednotili.

Z ustreznimi analiznimi postopki smo dokazali strukturno ustreznost in čistost spojin. Trem končnim spojinam smo z encimsko metodo določili inhibitorno aktivnost na encima MurC in MurD. Žal se nobena od analiziranih spojin, pri koncentraciji 500  $\mu\text{M}$ , ni izkazala kot dober inhibitor.

Ker naše spojine niso bile aktivne, bi bilo v prihodnje smiselno narediti določene modifikacije v načrtovanih spojinah. Za energetsko ugodnejšo vezavo v aktivno mesto encima bi lahko uporabili drugačen distančnik, s katerim bi molekula zavzela drugačno konformacijo, ki bi ji omogočila lažjo vezavo v aktivno mesto. Naslednji možen pristop bi bila uporaba molekulskega modeliranja in modifikacija spojine na način, ki bi omogočil več interakcij z aktivnim mestom encima.



## 7. LITERATURA

1. Katz AH, Caufield CE: Structure based design approaches to cell wall biosynthesis inhibitors, *Current Pharmaceutical Design*, 2003; 9: 857-866
2. El Zoelby A, Sanschagrin F, Levesgue RC: Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol Microbiol*, 2003, 47: 1-12
3. Goodman Gilman A: *The Pharmacological Basis of Therapeutics* 10<sup>th</sup> Ed., The McGrawHill Companies, New York, 2001: 1143-1146
4. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower P: *Pharmacology*, 5<sup>th</sup> edition, Churchill Livingstone 2003: 629-635
5. Scholar EM, Pratt WB: *The antimicrobial drugs*, 2<sup>nd</sup> Ed., Oxford University Press, New York, 2000: 37-48, 64-66
6. Gobec S, Urleb U: Inhibitorji biosinteze peptidoglikana. *Farm Vestn*, 1999; 50: 183-193
7. Hammond SM, Lambert PA, Rycroft AN, *The bacterial cell surface*, Croom Helm, London & Sydney, Kapitan Szabo publishers, Washinton DC, 1984: 1-28
8. Jean van Heijenoort: Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Natural Product Reports*, 2001: 503-519
9. [www.biologycorner.com/resources/gram\\_bacteria.jpg](http://www.biologycorner.com/resources/gram_bacteria.jpg)
10. Hiratake J: Enzyme Inhibitors as Chemical Tools to Study Enzyme Catalysis: Rational design, *Synthesis and Applications Chem. Rec.* , 2005: 209-228
11. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis, *FEMS Microbiol Rev* II 2008: 1-40
12. 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 Folypolyglutamate Synthetaze, *J Mol Biol* 2000;301: 1257-1266
13. 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
14. 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
15. Yoneyama H, Katsumata R: Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development, *Biosci Biotechol Biochem* 2006; 70: 1060-1075

16. Mol D, Brooun A, Dougan R, Hilgers T, Trai 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
17. 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; 697-699
18. Frlan R, Kovač A, Blanot D, Gobec S, Pečar S, Obreza A: Design and Synthesis of Novel N-Benzylidenesulfonohydrazide Inhibitors of MurC and MurD as Potential Antibacterial Agents, *Molecules* 2008; 13: 11-30
19. Li Z, Francisco D, Hu W, Labthavikul P, Peterson J, Severin A, Singh G, Yang Y, Rasmussen A, Lin Y, Skotnicki S, Mansour S: 2-Phenyl-5,6-dihydro-2H-thieno[3,2c]pyrazol-3-ol Derivates as New Inhibitors of Bacterial Cell Wall Biosynthesis, *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13: 2591-2594
20. Ehmman DE, Demeritt JE, Hull KG Fisher SL, Fisher SL: Biochemical characterization of an inhibitor of Escherichia Coli UDP-N-acetilmuramil-L-alanin ligase, *Biochim et Biophys Acta* 2004; 1698: 167-174
21. Schuyler A, Caufield CH, Hu W, Keeney D, Labthvikul 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
22. Gegnas LD, Waddel ST, Chabin RM, Reddy S, Wong KK: Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurD, *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8: 1643-1648
23. 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
24. Winans KA, Bertozzi CR, An Inhibitor of the Human UDP-GlcNAc 4-Epimerase: *Chemistry& Biology* 2002; 9:113-129
25. Bozzoli A, Kazmierski W, Kennedy G, Pasquarello A, Pecunioso Angelo: *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* 2000; 10: 2759-2763
26. Babič A, Gobec S, Gravier-Pelletier C, Le Merrer Y, Pečar S :*Tetrahedron* 2008; 64: 9093-9100