

KAZALO

POVZETEK	3
ABSTRACT	4
SEZNAM OKRAJŠAV	5
1. UVOD	7
1.1 Protimikrobno delovanje antibiotikov	7
1.2 Rezistenca na protimikrobne učinkovine	7
1.3 Bakterijska celična stena	9
1.3.1 Celična stena grampozitivnih (G+) in gramnegativnih (G-) bakterij	9
1.3.2 Peptidoglikan	10
1.3.2.1 Zgradba peptidoglikana	10
1.3.2.2 Biosinteza peptidoglikana	12
1.4 Mur encimi in njihovi inhibitorji	14
1.4.1 Mur ligaze	14
1.4.2 MurC	15
1.4.2.1 Vezava ATP na MurC	16
1.4.3 Inhibitorji encima MurC	17
1.4.4 Inhibitorji encima MurC in MurD	20
2. NAČRT ZA DELO	23
3. MATERIALI IN METODE	28
3.1. Materiali	28
3.2. Metode	28
3.2.1 Kromatografske metode	28
3.2.2 Spektroskopske metode	28
3.2.3 Temperatura tališča	29
3.2.4 Biokemijska testiranja	29
3.2.5 Nomenklatura in risanje spojin	29
4 EKSPERIMENTALNO DELO	30
4.1. Sinteza aldehydov	30
4.1.1 Sinteza 2-[(4-nitrobenzil)oksi]benzaldehida (1)	30
4.1.2 Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)benzojska kislina (2)	31
4.1.3 Sinteza N-[4-(aminosulfonil)fenetil]-4-(1,3-dioksolan-2-il)benzamida (3)	32
4.1.4 Sinteza N-[4-(aminosulfonil)fenetil]-4-formilbenzamida (4)	33
4.1.5 Sinteza 2-formilfenil 4-nitrobenzensulfonata (5)	34
4.1.6 Sinteza 3-bromobenzoil klorida (6)	35
4.1.7 Sinteza 2-(4-nitrofenil)-1,3-dioksolana (7)	36
4.1.8 Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)fenilamina (8)	37
4.1.9 Sinteza 3-bromo-N-(4-formilfenil)benzamida (9)	37
4.1.10 Sinteza N-(4-formilfenil)-4-nitrobenzamida (10)	38
4.2 Sinteza sulfonohidrazidov	39
4.2.1 Sinteza 1-[3,4-dihidro-2(1H)-izokinolinil]-1-etanona (11)	39
4.2.2 Sinteza 2-acetil-1,2,3,4-tetrahidro-7-izokinolinsulfonil klorida (12)	40

4.2.3	Sinteza 2-acetil-1,2,3,4-tetrahidro-7-izokinolinsulfonohidrazida (13)	41
4.2.4	Sinteza N-fenetilacetamida (14)	41
4.2.5	Sinteza 4-[2-(acetilamino)etil]benzensulfonil klorida (15)	42
4.2.6	Sinteza N-[4-(hidrazinosulfonil)fenil]acetamida (16)	43
4.2.7	Sinteza 2,4(1H,3H)-kinazolindiona (17)	43
4.2.8	Sinteza 2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolinsulfonil klorida (18)	44
4.2.9	Sinteza 2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolinsulfonohidrazida (19)	45
4.2.10	Sinteza 1,4-dihidro-2,3-kinoksalindiona (20)	46
4.2.11	Sinteza 2,3-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinoksalinsulfonil klorida (21)	47
4.2.12	Sinteza 2,3-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinoksalinsulfonohidrazida (22)	488
4.2.13	Sinteza 2,4-kinazolindiamina (23)	499
4.2.14	Sinteza 2,4-diamino-6-kinazolinsulfonil klorida (24)	50
4.2.15	Sinteza 2,4-diamino-6-kinazolinsulfonohidrazida (25)	51
4.3	Sinteza končnih spojin (sulfonohidrazidi s povečano polarnostjo)	52
4.3.1	Sinteza 2-acetil-N'-({2-[(4-nitrobenzil)oksi]fenil} metiliden)-1,2,3,4-tetrahidro-7-izokinolinsulfonohidrazida (26)	52
4.3.2	Sinteza 2-({2-[(2-acetil-1,2,3,4-tetrahidro-7-izokinolinil)sulfonil]hidrazono} metil)fenil 4-nitrobenzensulfonata (27)	53
4.3.3	Sinteza 2-({2-({4-[2-(acetilamino)etil]fenil} sulfonil)hidrazono} metil} fenil 4-nitrobenzensulfonata (28)	54
4.3.4	Sinteza N-[4-({2-[(2-acetil-1,2,3,4-tetrahidro-7-izokinolinil)sulfonil]hidrazono} metil)fenil]-4-nitrobenzamida (29)	55
4.3.5	Sinteza 4-({2-({4-[2-(acetilamino)etil]fenil} sulfonil)hidrazono} metil}-N-[4-(aminosulfonil)fenil]benzamida (30)	56
4.3.6	Sinteza N-(4-({2-({4-[2-(acetilamino)etil]fenil} sulfonil)hidrazono} metil} fenil)-3-bromobenzamida (31)	57
4.3.7	Sinteza N'-({2-[(4-nitrobenzil)oksi]fenil} metiliden)-2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolinsulfonohidrazida (32)	57
4.3.8	Sinteza N-[4-({(Z)-2-[(2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolil)sulfonil]hidrazono} metil)fenil]-4-nitrobenzamida (33)	58
4.3.9	Sinteza 2-(2-({[(2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolil)sulfonil]amino} etenil) fenil 4-nitrobenzensulfonata (34)	60
4.3.10	Sinteza 3-bromo-N-[4-({2-[(2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolil)sulfonil]hidrazono} metil)fenil]benzamid (35)	61
4.3.11	Sinteza 3-bromo-N-[4-({2-[(2,3-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinoksalil)sulfonil]hidrazono} metil)fenil]benzamida (36)	62
4.3.12	Sinteza 2,4-diamino-N'-({2-[(4-nitrobenzil)oksi]fenil} metiliden)-6-kinazolinsulfonohidrazida (37)	63
5	REZULTATI IN RAZPRAVA	64
5.1	Razprava o sintezah spojin	64
5.1.1	Zaščita aldehidne skupine 4-formilbenzojske kisline (2, 7)	64
5.1.2	Odstranitev zaščite z aldehidne skupine (4)	65
5.1.3	Tvorba amidne vezi (3)	65
5.1.4	Redukcija nitro skupine (8)	67
5.1.5	Sinteza kinazolin-2,4(1H, 3H)-diona (17)	68
5.1.6	Sinteza 1,4-dihidro-2,3-kinoksalindiona (20)	68
5.1.7	Sinteza 2,4-kinazolindiamina (23)	69
5.1.8	Priprava aromatskih sulfonohidrazidov (13, 16, 22, 19, 25)	69
5.1.9	Pripenjanje različnih substituentov na prosto aminsko skupino (6, 9, 10)	71
5.1.10	Pripenjanje sulfonohidrazidov (26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36 in 37)	71
5.2	Rezultati biokemičnega testiranja spojin	72
6	SKLEP	75
	LITERATURA	76

POVZETEK

Rezistenca na antibiotike pri mikroorganizmih predstavlja velik problem pri zdravljenju mikrobnih infekcij. Pojavljajo se številni sevi, ki so rezistentni na večino trenutno uporabljenih protimikrobnih učinkovin. Prav zaradi tega je nujno načrtovanje novih protimikrobnih učinkovin, ki bi delovale na še neizkoriščene tarče.

Najpomembnejši sestavni del bakterijske celične stene je peptidoglikan, ki s svojo trdnostjo zagotavlja preživetje bakterije v hipotoničnem okolju. Ker ima edinstveno zgradbo, značilno za evkarionte, je peptidoglikan pomembna tarča za razvoj novih protimikrobnih učinkovin. Številne protibakterijske učinkovine zavirajo sintezo peptidoglikana v poznejših stopnjah. Zgodnejše stopnje njegove biosinteze, ki potekajo v citoplazmi, kjer med drugim sodelujejo encimi Mur-ligaze, pa predstavljajo novejšo, v veliki meri še neizkoriščeno možnost za iskanje novih učinkovin.

V okviru dipolomske naloge smo sintetizirali serijo spojin, ki so potencialni inhibitorji MurC. Kot spojino vodnico smo pri sintezi spojin uporabili benziliden rodanine. Sintetizirane spojine imajo sulfonohidrazonoilno skupino, ki vsebuje kisli vodikov atom na dušiku in je glede na poznavanje lastnosti spojine vodnice nujno potreben za inhibicijo omenjenih encimov. Poleg sulfonohidrazonoilne skupine vsebujejo naše spojine še benzilidensko skupino ter s polarnimi skupinami substituiran aromatski obroč, ki predstavlja zamenjavo za nepolaren naftalenski obroč. S temi modifikacijami smo želeli povečati vodotopnost spojin in odstraniti fragment, ki zaradi svojih lastnosti ni zaželen pri zdravilnih učinkovinah.

Šestim končnim spojinam smo izmerili inhibitorno aktivnost na encim MurC, vendar se nobena od sintetiziranih spojin ni izkazala kot učinkovit inhibitor encima MurC. Domnevamo, da je najpomembnejši vzrok za to spremembo geometrija zdravilne učinkovine do katere pride pri zamenjavi planarnega lipofilnega naftalena z bolj polarnimi skupinami.

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

ABSTRACT

Resistance to the antibiotics by microorganisms presents an emerging problem in the medical treatment of infectious diseases. Numerous bacterial strains are becoming resistant to most of antimicrobial agents currently in use. Therefore the design of new compounds with antibacterial activity, which would act on new targets, represents an important field of research in medicinal chemistry.

Peptidoglycane is an essential part of the bacterial cell wall that insures the survival of bacteria in hypotonic environment. Because of its unique structure, which is characteristic for eucarionts, peptidoglycane is important target for development of new antibacterial agents. Numerous antibacterial agents inhibit the later steps of peptidoglycan synthesis. The early, cytoplasmic steps of the biosynthesis of peptidoglycan precursor, catalyzed by a series of Mur enzymes remain underexploited and therefore represents attractive targets for discovering new agents.

In our thesis we synthesised a series of compounds as potential inhibitors of MurC. We used benzylidene rodanines, which are known inhibitors of MurC and MurD, as lead compounds. The synthesized compounds have a sulfonohydrazoneoyl group, which contains an acidic NH group. This acidic NH group is necessary for the inhibition of the previously mentioned enzymes. Besides sulfonohydrazoneoyl group, our compounds also contain the benzylidene substituent and the aromatic ring substituted with polar groups as replacements for the nonpolar naphthalene ring present in previous series of compounds. With these modifications we wanted to increase the solubility of the compounds and to remove part of the molecule, which is responsible for the undesirable properties of these molecules.

The ability to inhibit MurC was measured for six synthesized final compounds, unfortunately none of the tested substances proved to be an effective inhibitor of MurC enzyme. We believe that the most important reason lies in the change of the three-dimensional conformation of our compounds, which changes markedly with the replacement of the planar nonpolar naphthalene ring with more polar groups.

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

SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozindifosfat
AMPPNP	nehidrolizirajoči analog ATP (5-adenilil- β , γ -imidodifosfat)
Ar	aromat
DMF	dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
d	dublet (NMR)
dd	dublet dubleta (NMR)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EI	elektronska ionizacija (electron ionisation) (MS)
ESI	elektrosprej ionizacija (Electron Spray Ionization) (MS)
G ⁻	gramnegativne bakterije
G ⁺	grampozitivne bakterije
HOBT	1-hidroksibenzotriazol hidrat
IC ₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
IR	infrardeča spektroskopija (infrared radiation)
J	sklopitvena konstanta (NMR)
M	molekulska masa
m	multiplet (NMR)
mDAP	<i>meso</i> -diaminopimelinska kislina
Mra Y	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-pentapeptid fosfotransferaza
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruvat-transferaza
MurB	enolpiruvat-reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuraminska kislina: L-alanin-ligaza
MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin: D-glutamat-ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat: mezodiaminopimelinat-ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-mezodiaminopimelinat D-alanin-D-alanin-ligaza
MurG	<i>N</i> -acetilglukozamin-transferaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina

MRSA	na meticilin rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i> (Methicillin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
MS	masna spektrometrija (mass spectroscopy)
NMR	jedrsko magnetna resonanca (nuclear magnetic resonance)
NADPH	nikotinamidadeninukleotidfosfat
PEP	fosfoenolpiruvat
Pi	anorganski fosfat (fosfat inorganic)
PRSP	na penicilin rezistentni <i>Staphylococcus pneumoniae</i>
PTSA	<i>p</i> -toluensulfonska kislina
q	kvartet (NMR)
RA	rezidualna aktivnost (residual activity)
SAR	odnos med strukturo in delovanjem (structure-activity relationship)
s	singlet (NMR)
THF	tetrahidrofuran
t	triplet (NMR)
T	temperatura
TLC	tankoplastna kromatografija (thin layer chromatography)
UDP	uridindifosfat
UMA	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin
UMP	uridinmonofosfat
UNAM	UDP-N-acetilmuraminska kislina
VRE	na vankomicin rezistentni <i>Enterococcus faecium</i> in <i>faecalis</i> (Vancomycin-Resistant <i>Enterococcus</i>)
VRSA	na vankomicin rezistentni <i>Staphylococcus aureus</i> (Vancomycin-Resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
δ	kemijski premik

1. UVOD

1.1 Protimikrobno delovanje antibiotikov

Antibiotiki so v ožjem pomenu produkti različnih vrst mikroorganizmov (bakterije, glive, aktinomicete), ki zavirajo rast (bakteriostatično delovanje) ali povzročajo smrt (baktericidno delovanje) drugih mikroorganizmov. V širšem pomenu besede pa mednje štejemo tudi polsintezne derivate (npr. peniciline in cefalosporine), medtem ko spojine popolnoma sinteznega izvora (npr. sulfonamidi in kinoloni) uvrščamo med kemoterapevtike (1).

Ključna značilnost dobrega antibiotika je selektivna toksičnost; to je sposobnost, da zavira rast in razvoj le mikroorganizmov, na gostitelja pa nima toksičnega vpliva. Poleg selektivne toksičnosti so pomembni tudi širok spekter delovanja, dolg razpolovni čas ($\uparrow t_{1/2}$), možnost peroralnega jemanja, dobro prodiranje v medceličnino, celice in likvor ter čim manjša vezava na beljakovine v plazmi in medceličnini. Naravni antibiotiki navadno ne ustrezajo vsem tem zahtevam, zato njihovo biološko uporabnost pogosto optimiziramo s farmacevtsko-kemijsko modifikacijo osnovne molekule ali s pripravo ustreznih farmacevtskih oblik s tehnološkimi postopki (1,2,3).

Antibiotiki delujejo protibakterijsko na različne načine, v glavnem pa tako, da:

- ◆ zavirajo sintezo celične stene bakterij,
- ◆ delujejo neposredno na celično membrano mikroorganizmov (spremenijo permeabilnost celične membrane),
- ◆ vplivajo na sintezo proteinov (z vezavo na eno ribosomsko podenoto povzročijo celično smrt ali prizadenejo funkcijo ene ribosomske podenote in povzročijo reverzibilno inhibicijo sinteze proteinov),
- ◆ vplivajo na metabolizem bakterijskih nukleinskih kislin ter delujejo kot antimetaboliti (2).

1.2 Rezistenca na protimikrobne učinkovine

Hkrati z razvojem številnih učinkovitih protimikrobnih učinkovin so ugotovili, da le-te postopoma izgubljajo učinkovitost, ker bakterije postajajo nanje odporne. Pojav odpornosti se je večal tudi zaradi neustreznega predpisovanja antibiotikov, nepravilnega

jemanja s strani pacientov, v veliki meri pa tudi zaradi uporabe antibiotikov v veterini. Tako so bakterije preko mutacij in izmenjave specifičnih genov razvile odpornost na protimikrobne učinkovine. Dolgotrajna in napačna uporaba antibiotikov je povzročila velik selektivni pritisk na obstoječe mikroorganizme, pri čemer so preživeli le najbolj odporni sevi. Zaradi selekcijskih procesov so bakterije razvile različne mehanizme odpornosti po enem ali več od naslednjih biokemijskih mehanizmov:

- ◆ s produkcijo encimov, ki razgrajujejo antibiotik (npr. β -laktamaze),
- ◆ s spremembo permeabilnosti celične stene,
- ◆ z modifikacijo tarčne molekule s posledično zmanjšano afiniteto do učinkovine,
- ◆ s spremembo metaboličnih poti,
- ◆ z razvojem alternativnega encima (npr. modificiran encim, ki lahko spremeni potek reakcije; nek drug encim, ki katalizira podobno reakcijo, lahko prične opravljati funkcijo katalizatorja v reakciji).

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 (4).

Hitrost razvijanja in razširjanja odpornosti bakterij je vedno večji zdravstveni problem in hkrati tudi gonilna sila za iskanje novih potencialnih protimikrobnih učinkovin. Eno izmed novejših potencialnih prijemališč za nove protimikrobne učinkovine so Mur ligaze, ki so specifične za bakterije in so prisotne tako v gramnegativnih kot v grampozitivnih bakterijah (5,6).

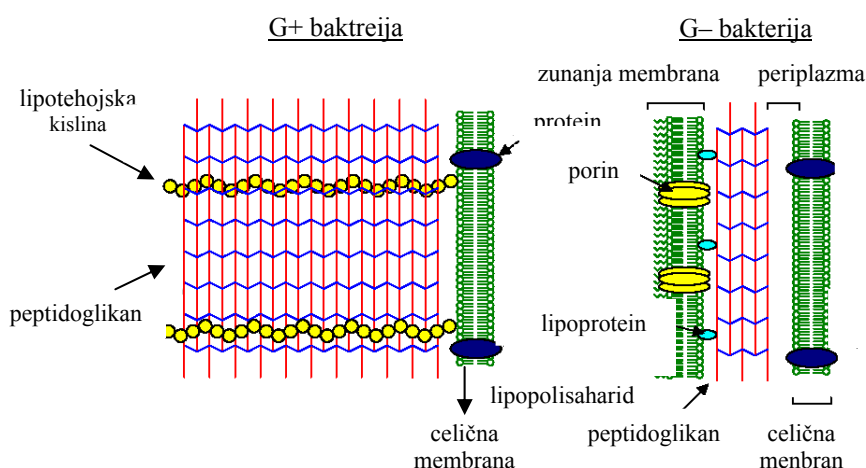
1.3 Bakterijska celična stena

Glavna značilnost bakterijske celične stene je njena togost in izjemna mehanska trdnost. Njen najpomembnejši del je peptidoglikan, ki bakteriji omogoča vzdrževanje

visokega osmotskega tlaka v notranjosti (5-25 atmosfer). Njena izjemna mehanska trdnost zagotavlja varovanje celične vsebine pred vplivi iz okolja, omogoča preživetje celice v močno hipotoničnem okolju, v katerem bi sicer nabreknila in lizirala, in ji daje stalno in značilno obliko. Celična stena mora poleg tega delovati kot polprepustna bariera, preko katere lahko poteka izmenjava želenih snovi iz okolice. Zaradi teh funkcij je vzdrževanje integritete celične stene v vseh fazah delitve in rasti za bakterijo ključnega pomena. Celična stena zaradi svoje specifične zgradbe predstavlja primerno tarčno mesto za protibakterijske učinkovine, saj omogoča selektivno toksičnost (2,7,8,9).

Od strukture celične stene je odvisna tudi dovzetnost bakterij na barvanje po Gramu, kar je najpogosteje uporabljana metoda za hitro karakterizacijo bakterij. V obarvanem preparatu modrovijolične bakterije imenujemo grampozitivne, rdeče pa gramnegativne (2).

1.3.1 Celična stena grampozitivnih (G+) in gramnegativnih (G-) bakterij



Slika 1: Zgradba celične stene grampozitivnih in gramnegativnih bakterij

Pri obeh tipih bakterij celična stena leži na zunanji strani citoplazemske membrane, ki je po svoji zgradbi zelo podobna tisti v evkariontskih celicah in jo sestavlja fosfolipidni dvosloj z membranskimi proteini. Glavna sestavina celične stene tako grampozitivnih, kot gramnegativnih bakterij je makromolekula peptidoglikana, ki jo sestavljajo verige ponavljajočih se disaharidnih enot *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc), medsebojno premrežene s kratkimi peptidnimi verigami (slika 1) (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 glicerolfosfata ali ribitolfosfata, teihuronsko pa enote glukuronske kisline in N-acetilgalaktozamina. Obe kislini s svojimi fosfatnimi, hidroksilnimi in aaminskimi skupinami predstavljata ionsko-izmenjevalni sistem, ki skrbi za dostavo Mg^{2+} ionov plazemski membrani, ki so pomembni za delovanje encimov v biosintezi peptidoglikana (1,7).

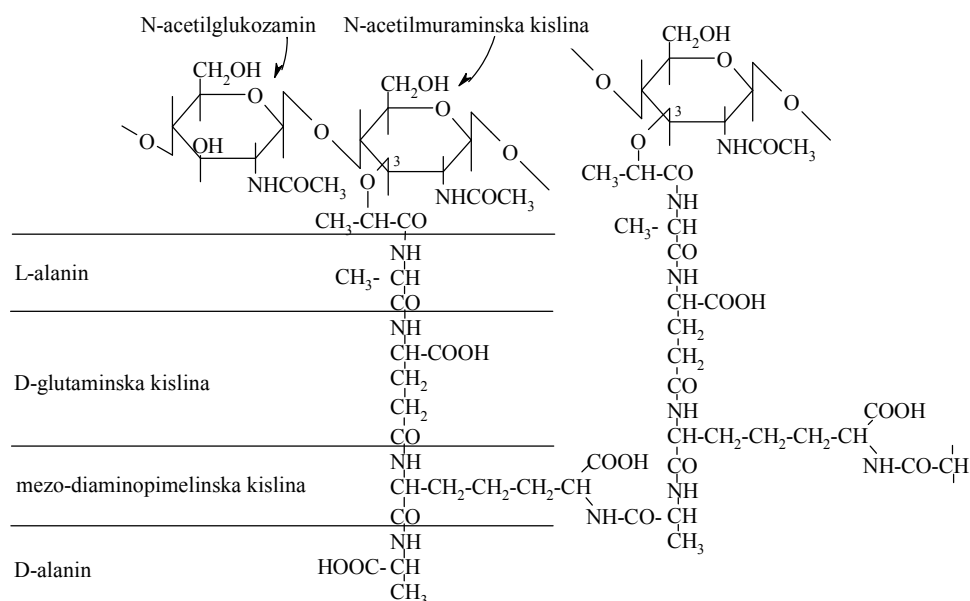
Pri gramnegativnih bakterijah je zgradba celične stene bolj kompleksna. Od citoplazemske membrane navzven vsebuje periplazemski prostor, ki vsebuje številne vezavne proteine. Nato sledi enoplasten peptidoglikan, ki ga obdaja čvrsta zunanja membrana. Ta je sestavljena iz fosfolipidnega dvosloja, proteinov, 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 (1,10).

1.3.2 Peptidoglikan

1.3.2.1 Zgradba peptidoglikana

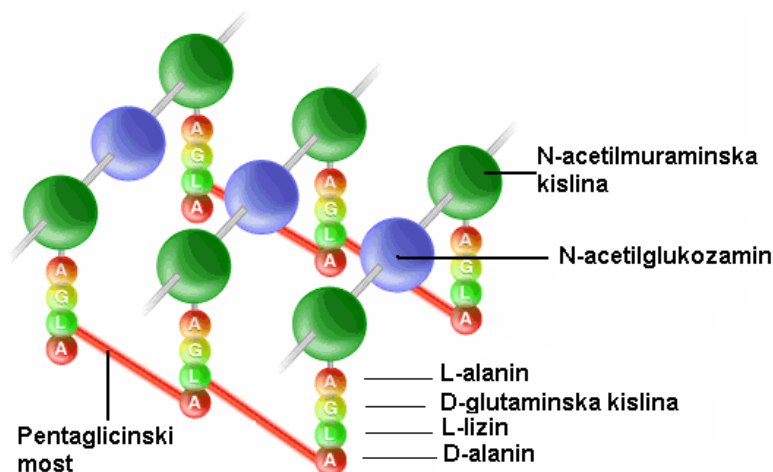
Bakterijski peptidoglikan je sestavljen iz linearnih polisaharidnih verig, glikanskih vlaken, ki so prečno povezana s kratkimi peptidnimi verigami. Polisaharidne verige so sestavljene iz izmenjujočih se enot N-acetilmuraminske kisline in N-acetilglukozamima, ki so med seboj povezane z 1,4- β glikozidno vezjo. N-acetilmuraminska kislina je derivat N-acetilglukozamina in ima na C-3 atomu preko etrske vezi pripeto D-laktilno skupino. Na karboksilno skupino vsakega ostanka muraminske kisline je vezan tetrapeptid, s sledečim

zaporedjem aminokislin: L-alanin, D-glutaminska kislina, mezo-diaminopimelinska kislina in D-alanin (slika 2) (7,11,12).



Slika 2: Zgradba osnovne monomerne enote peptidoglikana gramnegativnih bakterij in prikaz direktne prečne povezave dveh sosednjih polimernih verig

Osnovna zgradba peptidoglikana je pri različnih vrstah bakterij enaka, le pri kemijski sestavi in strukturni zgradbi je zaznati nekaj manjših razlik. Večina razlik je v aminokislinski sestavi peptidne verige, ki je pripeta na N-acetylmuraminsko kislino. Pri gramnegativnih bakterijah na tretjem mestu na peptidni verigi najdemo L-lizin, L-ornitin, L-diaminobutanojsko kislino ali L-homoserin pri grampozitivnih bakterijah pa na tem mestu prevladuje mezo-diaminopimelinska kislina. Razlike najdemo tudi v prečnih povezavah med sosednjimi glikanskimi verigami. Pri večini gramnegativnih in pri nekaterih grampozitivnih bakterijah prečna povezava nastane neposredno med prosto ε-amino skupino tretje aminokislinske enote glikanske verige in karboksilno skupino D-alanina na četrtem mestu sosednje verige (slika 3). Pri večini grampozitivnih bakterijah pa se tvori še dodaten peptidni most med glikanskimi vlakni. Peptidni most je običajno zgrajen iz petih glicinskih ostankov, ki se nahajajo med L-Lys ene in D-Ala druge verige. Dodatne razlike pri bakterijah je prisotna v deležu vseh tetrapeptidnih verig, ki sodelujejo v prečnih povezavah glikanskih vlaken in se giblje pri grampozitivnih bakterijah med 80 % ter pri gramnegativnih bakterijah med 20 % (1,2,11).



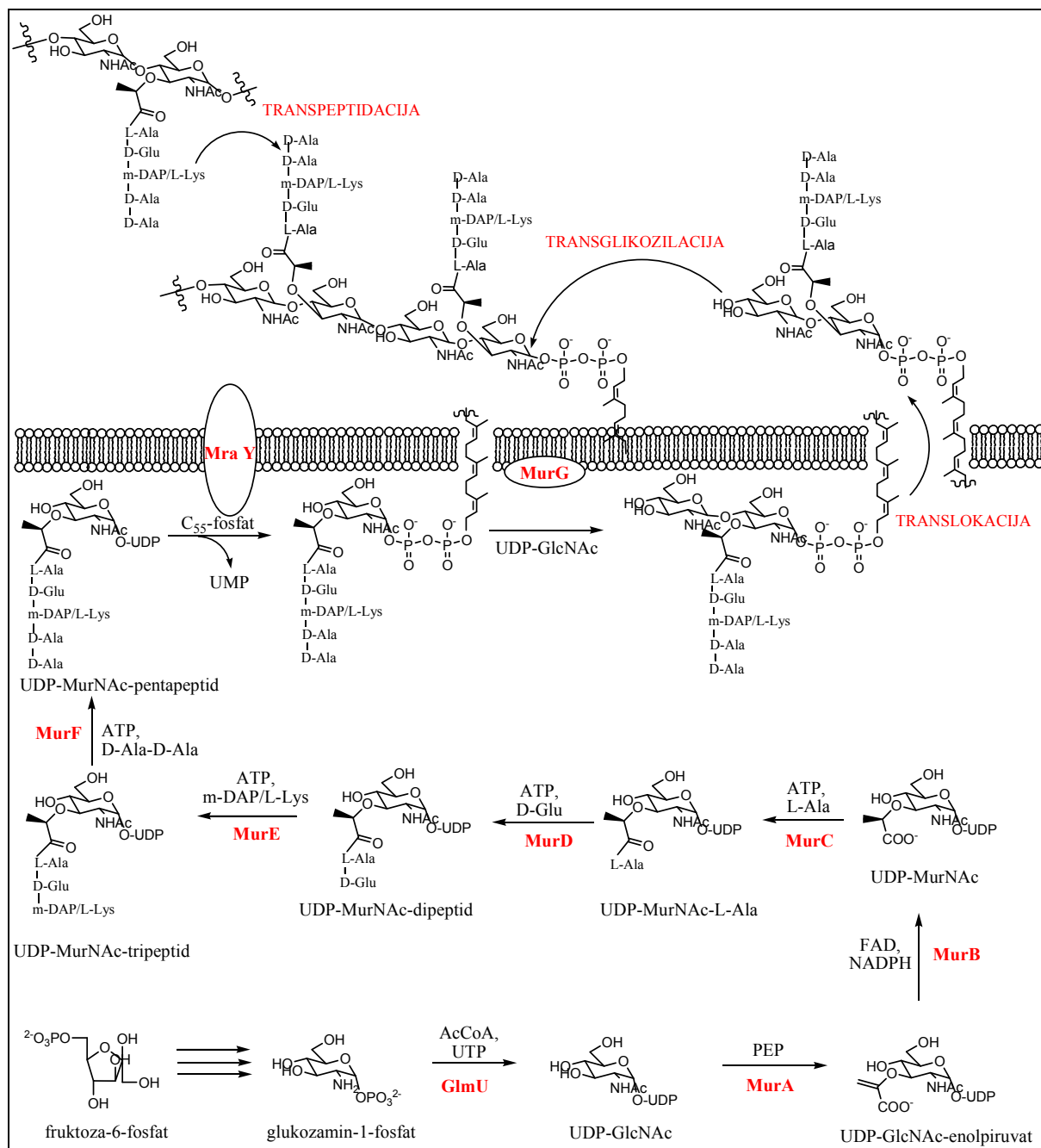
Slika 3: Prečne povezave polimernih verig peptidoglikana grampozitivnih bakterij

1.3.2.2 Biosinteza peptidoglikana

Biosinteza peptidoglikana je večstopenjski proces, ki ga lahko v osnovi razdelimo na tri dele.

1. sinteza prekurzorjev v citoplazmi,
2. prenos prekurzorjev skozi citoplazemsko membrano s pomočjo lipidnega nosilca in
3. prehod prekurzorjev v celično steno in vgradnja v že obstoječi peptidoglikan.

Prvi korak pri sintezi peptidoglikana je nastanek UDP-*N*-acetilglukozamina (UDP-GlcNAc) iz primarnega metabolita fruktoze-6-fosfata v štirih stopnjah. V naslednjih dveh stopnjah pride do pretvorbe UDP-*N*-acetilglukozamina v UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino (UDP-MurNAc). Najprej encim MurA katalizira prenos enolpiruvata iz fosfoenolpiruvata (PEP) na 3'-hidroksilno skupino UDP-*N*-acetilglukozamina, čemur sledi redukcija enolpiruvata do D-laktata z NADPH, kar katalizira encim MurB. Na karboksilno skupino D-laktata v tako nastali UDP-*N*-acetilmuraminski kislini, se nato postopoma pripne veriga petih aminokislin: L-Ala-D-Glu-mDAP(L-Lys)-D-Ala-D-Ala. Te reakcije katalizira skupina od ATP odvisnih aminokislinskih ligaz MurC, MurD, MurE in MurF. Prve tri aminokisliline se pripnejo posamično in sicer, L-Ala s pomočjo MurC, D-Glu s pomočjo MurD in mDAP (G⁻) ali L-Lys (G⁺) s pomočjo MurE. Preostala dva D-alaninska ostanka se dodata kot dipeptid (D-Ala-D-Ala) v reakciji, ki jo katalizira encim MurF (slika 4) (2,13).



Slika 4: Shematski prikaz posameznih stopenj biosinteze peptidoglikana (14)

Nastali UDP-*N*-acetilmuramil pentapeptid se v naslednjih stopnjah poveže z *N*-acetilglukozaminom, pri čemer se tvori osnovna gradbena enota peptidoglikana. Ta se nato prenese na zunanjo stran citoplazemske membrane. Ključna molekula, ki sodeluje pri tem prenosu je lipidni nosilec undekaprenilfosfat imenovan tudi C₅₅-izoprenoid fosfat.

UDP-*N*-acetilmuramil pentapeptid se najprej poveže s fosforiliranim lipidnim nosilcem, pri tem pa se sprosti UMP. Reakcijo katalizira membranski encim Mra Y,

inhibirajo pa jo antibiotiki amfomicin, moenomycin in mureidomicin. Pripetje *N*-acetilglukozamina na nastali kompleks katalizira encim MurG, ki je prav tako kot *Mra Y* membranski encim. Nastali disaharid pentapeptid se nato prenese na zunanjo stran citoplazemske membrane.

Na zunanji strani se vgradnja osnovnega gradnika v že obstoječi peptidoglikan začne s povezovanjem sladkornih enot (transglikozilacija), pri čemer se tvorijo daljša glikanska vlakna. To reakcijo katalizira membranski encim GlcNAc-pentapeptid transglikozilaza.

V zadnji stopnji biosinteze peptidoglikana se linearni gradniki, zbrani na lipidnem nosilcu na zunanji strani citoplazemske membrane, vgradijo v že obstoječo peptidoglikansko strukturo. Reakcijo imenujemo transpeptidacija, sodelujoče encime pa transpeptidaze. Gre za prečno povezovanje med peptidnimi verigami na sosednjih glikanskih vlaknih. Ključno vloga pri tem procesu ima D-Ala-D-Ala enota pentapeptida, saj ta predstavlja vezavno mesto za transpeptidazo. Transpeptidaza s serinsko -OH skupino v aktivnem mestu odcepi terminalni D-Ala, pri čemer se tvori aktiviran acilni intermediat. Ta reagira z ϵ -amino skupino *mezo*-diaminopimelinske kisline (L-lizina) ali pentaglicinskim mostom sosednje glikanske verige, tako da poteče premreženje (9,13,14).

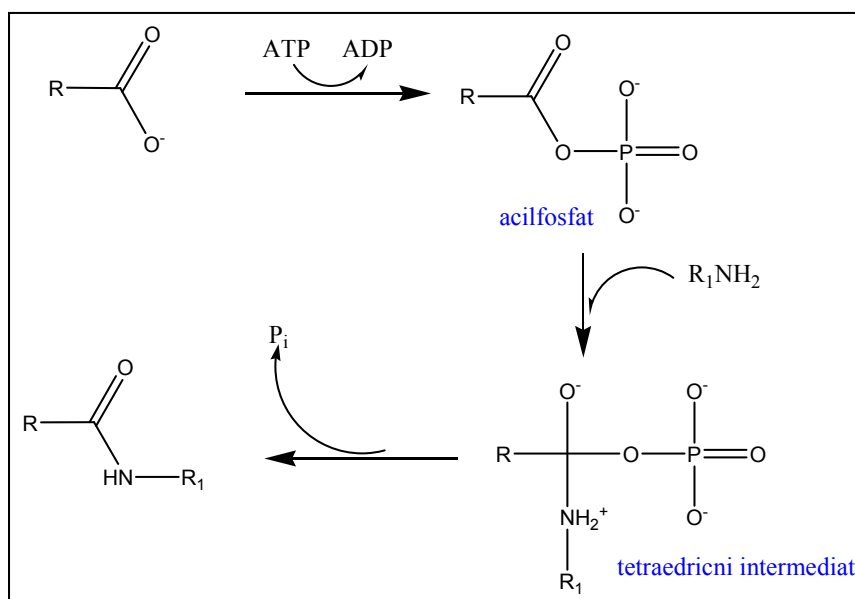
1.4 Mur encimi in njihovi inhibitorji

1.4.1 Mur ligaze

Encimi Mur so nujni za preživetje bakterij saj sodelujejo v biosintezi peptidoglikana, zato je inhibicija teh encimov primeren način za razvoj novih protimikrobnih učinkovin.

MurC, MurD, MurE in MurF encimi sodijo v skupino Mur-sintetaz. Vsi štirje encimi imajo podobno sekvenco aminokislin in so si evolucijsko blizu, zato zelo verjetno katalizirajo reakcije po podobnem mehanizmu. V štirih zaporednih stopnjah postopoma pripnejo verigo petih aminokislin na UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino. Pri vseh stopnjah poteče tvorba peptidne vezi in hkrati tudi cepitev ATP v ADP in anorganski fosfat (P_i). V prvi stopnji poteče aktivacija karboksilne skupine C-terminalne aminokisline nukleotidnega substrata s pomočjo ATP, da nastane acil-fosfatni intermediat, ki ga nato nukleofilno napade amino skupina prihajajoče aminokisline. Nastane nestabilno tetraedrično prehodno stanje in na koncu, po eliminaciji fosfata, nova peptidna vez (slika

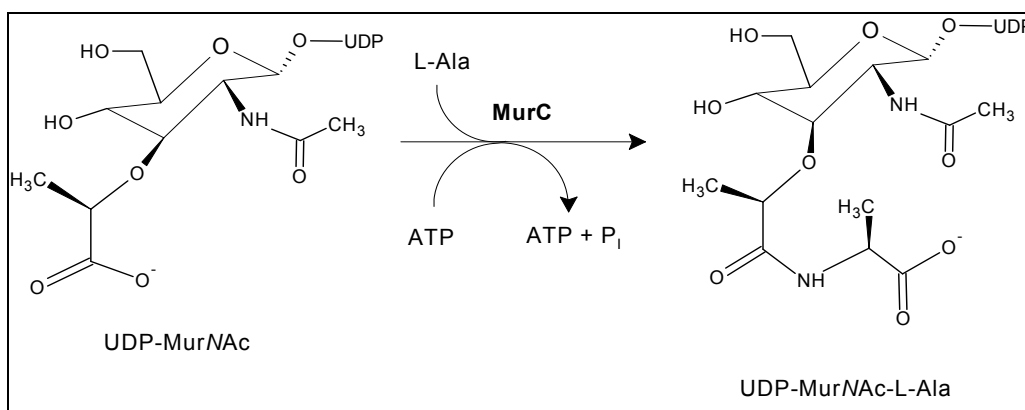
5). Nestabilni tetraedrični intermediat predstavlja izhodišče za načrtovanje novih inhibitorjev encimov Mur (7,11,15).



Slika 5: Mehanizem nastanka peptidne vezi preko tetraedričnega intermedjata

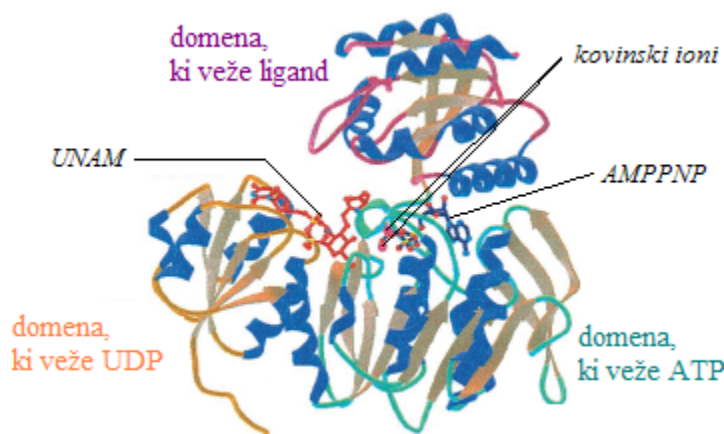
1.4.2 MurC

MurC (UDP-N-acetilmuramat:L-alanin-ligaza) je 50 kDaltonov velik protein, ki katalizira adicijo prve aminokisline, to je največkrat L-alanin, redkeje glicin ali L-serin, pri sintezi citoplazemskega prekursorja peptidoglikana. Tako omogoča pretvorbo UDP-N-acetilmuraminske kisline (UDP-MurNAc) v UDP-MurNAc-L-Ala (slika 6) (9).



Slika 6: Reakcija, ki jo katalizira MurC

Kristalna struktura encima MurC je bila določena pri bakterijah *Haemophilus influenzae*, *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli*. Encim je sestavljen iz treh domen (slika 7), N-terminalna domena (UDP-vezavna domena) sega do aminokislinskega ostanka 118. Sestavljena je iz 5 centralnih paralelnih β -struktur obdanih z 4 α -vijačnicami in veže UDP nukleotidni del substrata UDP-MurNAc. Centralna domena (ATP-vezavna domena) sega do aminokislinskega ostanka 119 do 324 in je največja. Na sredini ima 7 paralelnih β -struktur, okrog njih pa je razporejenih 5 vijačnih fragmentov in 3 antiparalelne β -strukture. Ta domena je odgovorna za vezavo ATP. C-terminalna domena (ligand-vezavna domena) obsega aminokislinske ostanke 315 do 473. Sestavljena je iz petih paralelnih in ene antiparalelne β -strukture, obdaja pa jih 5 α -vijačnic. Omogoča interakcijo med ribozo in α -fosfatno skupino v AMPPNP. Aminokislinski ostanki te domene so ključni za interakcije, ki omogočajo orientacijo in pravilno lego liganda (L-alanina) in rastoče verige peptidoglikana (10,16,17).



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

1.4.2.1 Vezava ATP na MurC

Vezavno mesto za ATP v encimu MurC leži na mejni površini med centralno in C-terminalno domeno in tvori interakcije z adeninskim obročem ter z α - in β -fosfati, ki se nahajajo v ATP-vezavni domeni. V področje med peptidnim delom Gly 128 in stransko verigo His 291 se vstavi adeninski obroč v AMPPNP ter tvori par vodikovih vezi med adeninom in stransko verigo Asn 295. Preostanek AMPPNP ujame ligand-vezavna domena in ustvari tri specifične reakcije. In sicer se tvorijo vodikove vezi med ribozo in Thr 356 ter

med ribozo in Asp 345. Stransko verigo Arg 326 uravnava ravnotežje negativnega naboja α -fosfata v AMPPNP s tvorbo vodikove vezi (18).

Aminokislinski preostanki Arg 377, Arg 380, His 348, His 376, Tyr 346 in Ala 549 so ključni za orientacijo in umeščanje pripenjajočega se L-alanina. Prva dva aminokislinska preostanka pravilno orientirata L-alanin preko interakcij s karboksilatno skupino. Ostali pa tvorijo plitev žep, ki onemogoča vezavo večjih aminokislin. Zaradi hidrofobnih lastnosti pa je preprečena vezava majhnih polarnih aminokislin. Ciljana mutageneza pri *E. Coli* je pokazala, da so trije aminokislinski preostanki ključni za katalizo, podobno se je pokazalo tudi pri *H. Influenzae*. To so: Liz 129, Glu 173 in Glu 352 (16).

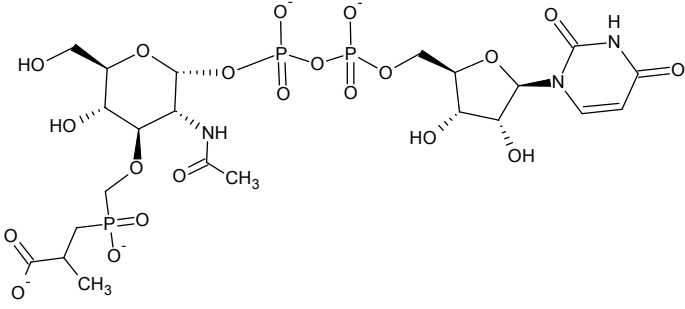
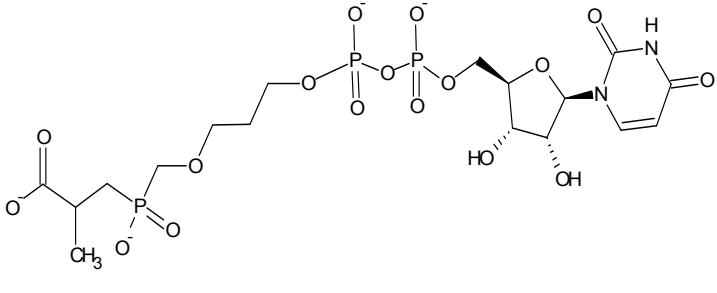
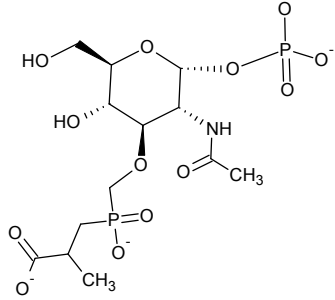
1.4.3 Inhibitorji encima MurC

Pri preučevanju specifičnosti encima MurC so bili odkriti prvi inhibitorji za L-Ala. Analogi L-Ala so imeli modificirano stransko skupino (haloalanini, nenasičene aminokisliline, glicin in serin) in so pri koncentraciji 10 nM do določene mere (od 26 do 89 %) zavirali encim MurC iz *E. Coli*. Spojine, ki jim je manjkala primarna amino skupina (N-metil-L-Ala) ali karboksilna skupina (L-cikloserin, sulfonske kisline, fosfonske kisline) pa niso imele inhibitorne aktivnosti (19).

Fosfinatni analogi prehodnega stanja, ki so derivati ustrezno substituirane fosfinske kisline, so bili prvi izredno učinkoviti inhibitorji MurC. Skupna lastnost teh spojin je, da se v aktivnem mestu encima fosforilirajo s pomočjo ATP. Nastala fosforil fosfinatna struktura je zelo dober mimetik tetraedričnega prehodnega stanja, ki nastane pri procesu tvorbe peptidne vezi (19).

Kljub dobri inhibitorni lastnosti fosfinatnih inhibitorjev, le ti nimajo protibakterijskega delovanja. To je najverjetneje posledica njihove nezmožnosti aktivnega oziroma pasivnega prehajanja v citoplazmo, za to so v veliki meri odgovorni odsotnost aktivnih transporterjev in močno polarni fosfinatna ter difosfatna skupina (20).

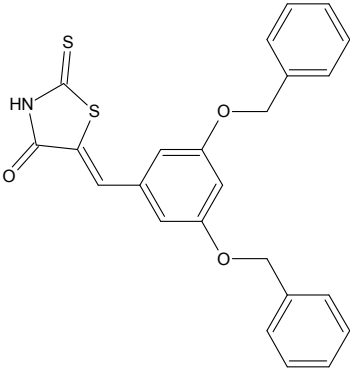
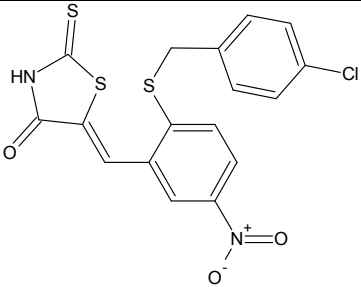
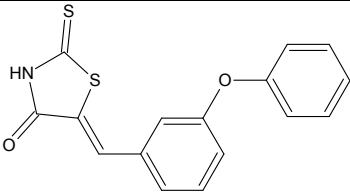
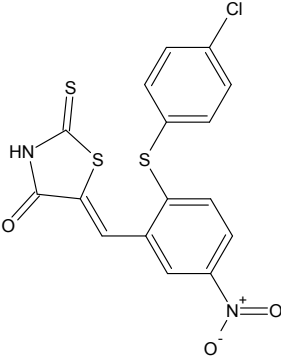
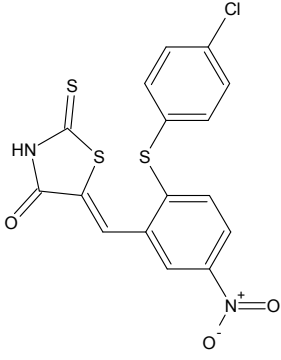
Spojina **1** je najmočnejši poznani fosfinatni inhibitor encima MurC. Pri spojini **2** se je izkazalo, da zamenjava sladkornega dela molekule s hidrofobnim 1,3 propandiolnim distančnikom, zmanjša jakost inhibicije za več kot tri velikostne razrede. Prisotnost UDP dela je tudi pomembna za inhibicijo, saj spojina **3** s terminalno fostatno skupino slabo inhibira encim MurC (preglednica I) (21).

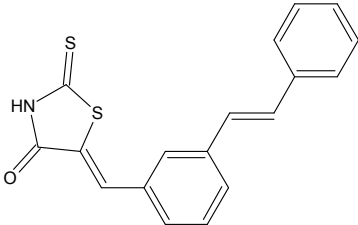
<u>1</u>		IC₅₀ = 49 nM
<u>2</u>		IC₅₀ = 60 μM
<u>3</u>		IC₅₀ > 100 μM

Preglednica I: Fosfinatni inhibitor encima MurC

V vrsti nizkomolekularnih nepeptidnih spojin so se kot najbolj učinkoviti inhibitorji encima MurC izkazale spojine benziliden rodanini. Ugotovili so, da imajo najboljšo inhibitorno učinkovitost benziliden rodanini, ki imajo na C-5 atomu benzilidenske skupine vezano fenoksi-, benziloksi-, fenilsulfamil- ali benzilsulfamil- skupino. S substitucijo dušika na tretjem mestu je inhibitorno delovanje izginilo iz česar so sklepali, da je prosta –NH skupina nujna za inhibitorno delovanje, ker v aktivnem mestu encima MurC tvori vodikove vezi (preglednica II) (22).

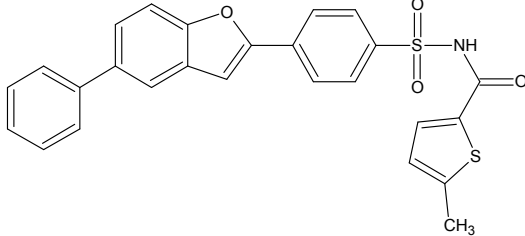
Bistvena prednost benziliden rodanininskih inhibitorjev pred fosfinatnimi je, da kljub slabšemu zaviranju encima, izkazujejo protibakterijsko delovanje proti grampozitivnimi in gramnegativnimi bakterijami (22).

<u>4</u>		$IC_{50} = 12 \mu M$
<u>5</u>		$IC_{50} = 272 \mu M$
<u>6</u>		$IC_{50} = 22 \mu M$
<u>7</u>		$IC_{50} = 24 \mu M$
<u>8</u>		$IC_{50} = 24 \mu M$

<u>9</u>		IC₅₀ = 18 μM
----------	---	--------------------------------

Preglednica II: Inhibitorji encima MurC z benziliden rodaninsko strukturo

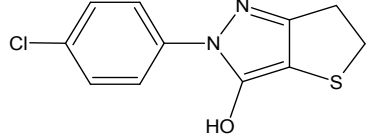
Derivati benzofuran acil-sulfonamidov kompetitivno tekmujejo z ATP in UNAM za vezavo na encim MurC in kažejo dobro inhibitorno aktivnost. Spojina **10** ima IC₅₀=2,3 μM, vendar ima visoko afiniteto do vezave na plazemske proteine (preglednica III) (23).

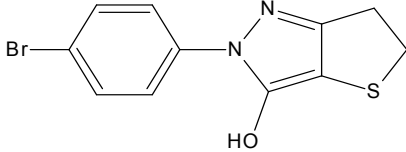
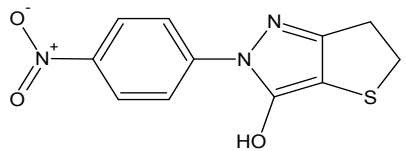
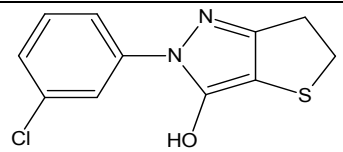
<u>10</u>		IC₅₀ = 2,3 μM
-----------	---	---------------------------------

Preglednica III: Inhibitor encima MurC z benzofuran acilsulfonamidno strukturo

1.4.4 Inhibitorji encima MurC in MurD

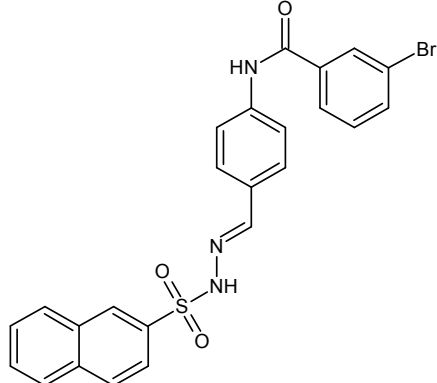
2-fenil-5,6-dihidro-2H-tieno[3,2-c]pirazol-3-ol derivati so se izkazali kot dobri inhibitorji encima MurC, vendar niso specifični za posamezne ligaze saj delujejo tudi na encime MurA in MurD. Imajo protibakterijske učinke na grampozitivne bakterije, med njimi tudi na meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), na vankomicin rezistentna *Enterococcus faecium in faecalis* (VRE) in na penicilin rezistentni *Staphylococcus pneumoniae* (PRSP). Vendar so pri testiranju v prisotnosti 4 % govejega serumskega albumina pri nekaterih spojinah ugotovili, da se v visoki meri vežejo nanj, zato so za uporabo kot učinkovine neprimerne, so pa dobre spojine vodnice za nadaljnji razvoj inhibitorjev ligaz Mur (preglednica IV) (24).

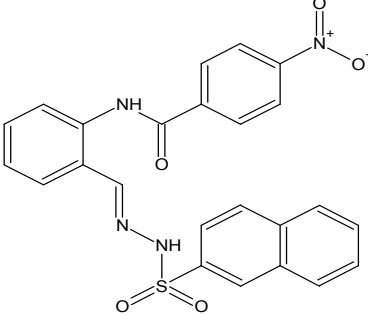
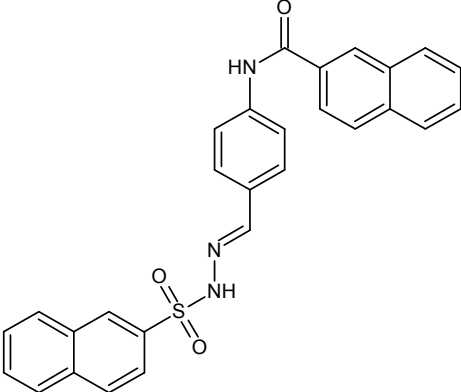
<u>11</u>		IC₅₀ = 10,1 μM (MurC) IC₅₀ = 11,5 μM (MurD)
-----------	---	--

<u>12</u>		IC₅₀ =11,4 μM (MurC) IC₅₀ =9,0 μM (MurD)
<u>13</u>		IC₅₀ =19,1 μM (MurC) IC₅₀ =9,5 μM (MurD)
<u>14</u>		IC₅₀ =15,8 μM (MurC) IC₅₀ =8,3 μM (MurD)

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

Sintetiziranih je bilo tudi več derivatov sulfonohidrazidov, ki so inhibitorji encimov MurC in MurD. Za najbolj aktivne so se izkazale spojine **15**, **16** in **17**. Gre za spojine, ki imajo na distalnem fenilnem obroču lipofilne substituentne, ki občutno povečajo inhibično aktivnost (preglednica V) (25).

<u>15</u>		IC₅₀ =30 μM (MurC) IC₅₀ =30 μM (MurD)
------------------	--	--

<u>16</u>		IC₅₀ = 27 μM (MurC) IC₅₀ = 43 μM (MurD)
<u>17</u>		IC₅₀ = 31 μM (MurC) RA(50μM) = 19% (MurD)

Preglednica V: Inhibitorji MurC in MurD z N-benzilidensulfonhidrazidnim fragmentom

2. NAČRT ZA DELO

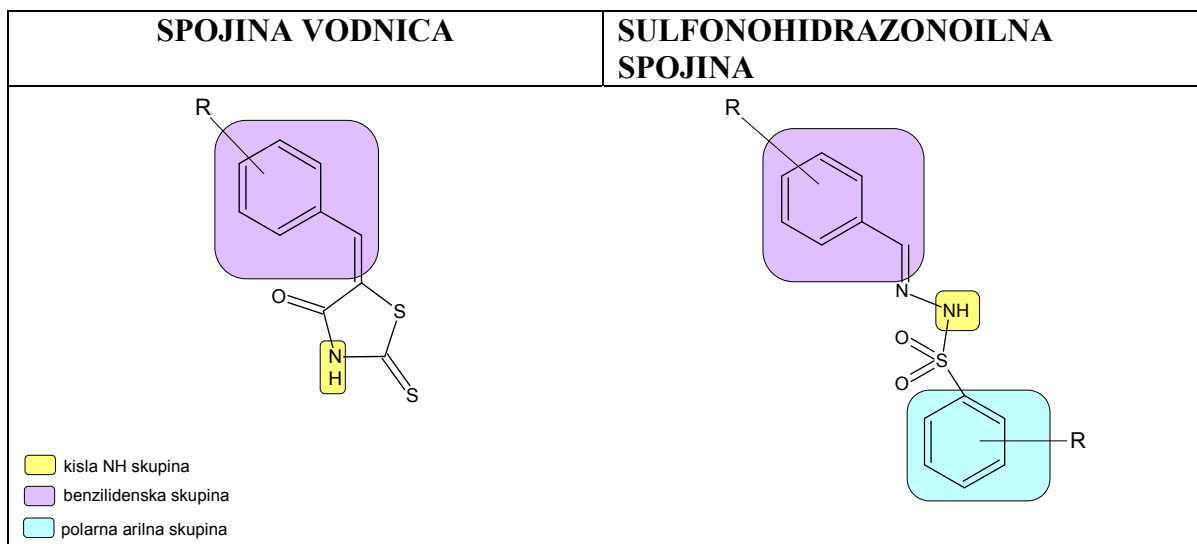
Z eksperimentalnim delom v okviru diplomske naloge želimo pripraviti več novih, potencialnih inhibitorjev encimov MurC. Kot spojino vodnico bomo pri načrtovanju novih inhibitorjev uporabili benziliden rodanine, ki v skupini nizkomolekularnih nepeptidnih spojin sodi med najbolj aktivne inhibitorje encima MurC.

Pri benziliden rodaninih sta za inhibitorno aktivnost nujno potrebni dve strukturni značilnosti. To sta prosti kisli H v amidni vezi (NH-CO) in arilna skupina, ki je vezana na C-5 rodaninov. Prosta NH skupina je nujno potrebna, kajti v primeru, če je na N vezana metilna, etilna, arilna, alilna ali metilenska skupina, spojine izgubijo inhibitorno aktivnost. Poleg tega prosta NH skupina omogoča tvorbo vodikovih vezi v aktivnem mestu encima MurC. Druga strukturna značilnost se nanaša na arilno skupino, ki je vezana na C-5 rodaninov. Analogi rodaninov, ki imajo na C-5 vezano fenoksi-, benziloksi-, fenilsulfanil- ali benzilsulfanil-benzilidensko skupino, imajo izraženo inhibitorno delovanje. Analogi z alkil- in nitro-benzilidensko, furanilmetilensko skupino, halo-, alkil- ali aril-furanilmetilensko, alkoksinaftalenmetilensko, indanilmetilensko in bifeniletilensko skupino pa niso inhibitorno aktivni (22).

V naši diplomski nalogi bomo sintetizirali sulfonohidrazide kot potencialne inhibitorje ligaz Mur. Sulfonohidrazidni inhibitorji, ki so bili sintetizirani v preteklosti, so imeli določeno inhibitorno aktivnost na ligaze Mur, problem pa je bila slaba vodotopnost. Zato bomo nepolaren naftalenski obroč nadomestili s polarnejšimi skupinami. Z uvedbo polarnejših skupin predpostavljamo, da bomo povečali topnost, kar nam bo olajšalo samo testiranje sintetiziranih spojin, hkrati pa bodo spojine primernejše za potencialni učinek.

Pri našem delu bomo sintetizirali spojine z naslednjimi strukturnimi značilnostmi:

- ◆ Prosta NH skupina, ki bo del sulfonohidrazidne skupine, in bo na S atomu imela vezano polarno arilno skupino
- ◆ Benzilidenska skupina, ki bo preko amidne vezi na mestu 4 povezana še z enim aromatskim obročem (slika 8)

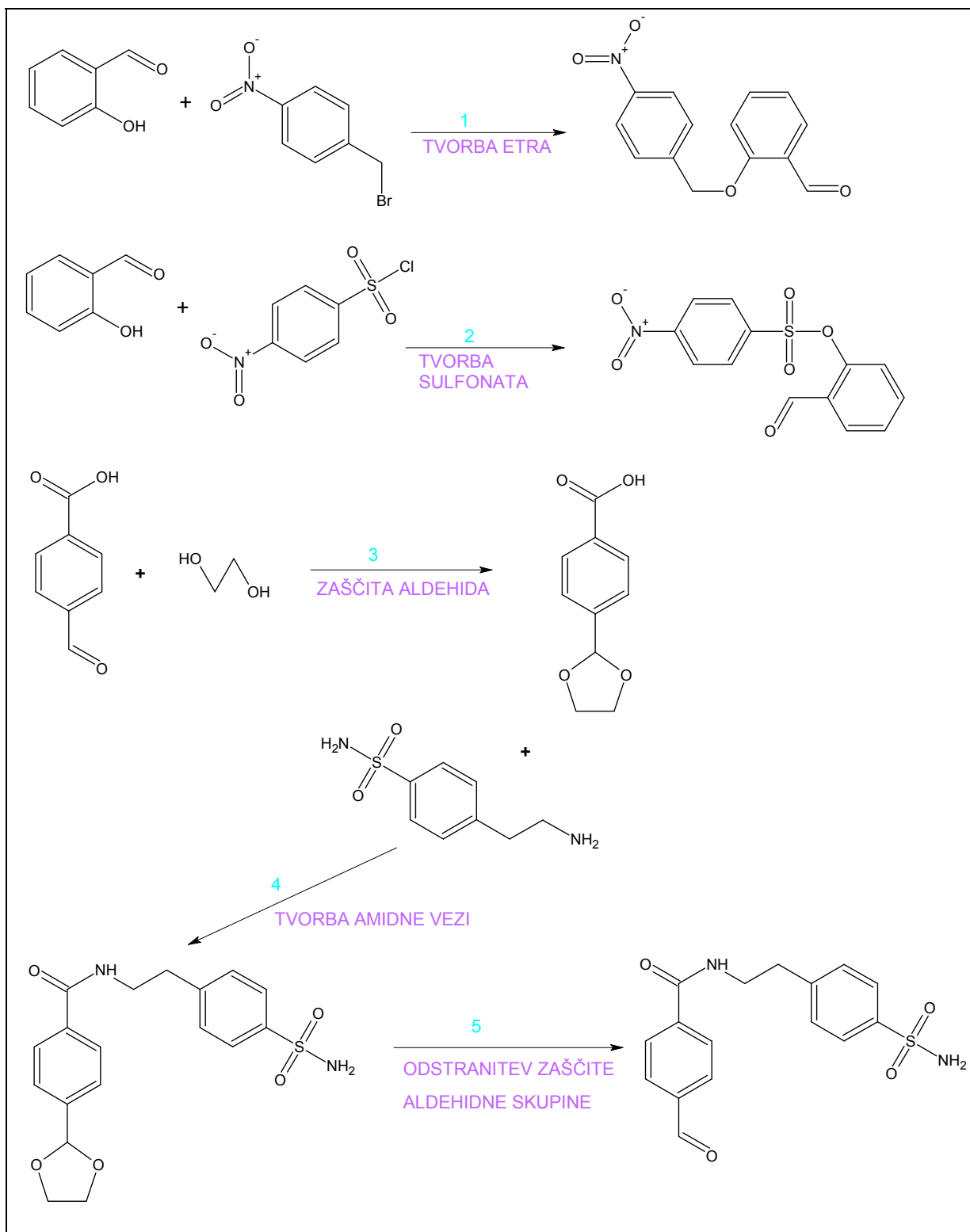


Slika 8: Pogled na strukturne značilnosti benziliden rodaninov in sulfonohidrazonoilnih spojin

Eksperimentalnega dela se bomo lotili na takšen način, da bomo posebej sintetizirali posamezne sintone (fragменти molekul, ki jih združimo) in jih na koncu povezali med seboj. Ločeno bomo sintetizirali več različnih aldehydov ter več posameznih sulfonohidrazidov ter jih nato povezali, da bomo dobili končne sulfonohidrazonoilne spojine.

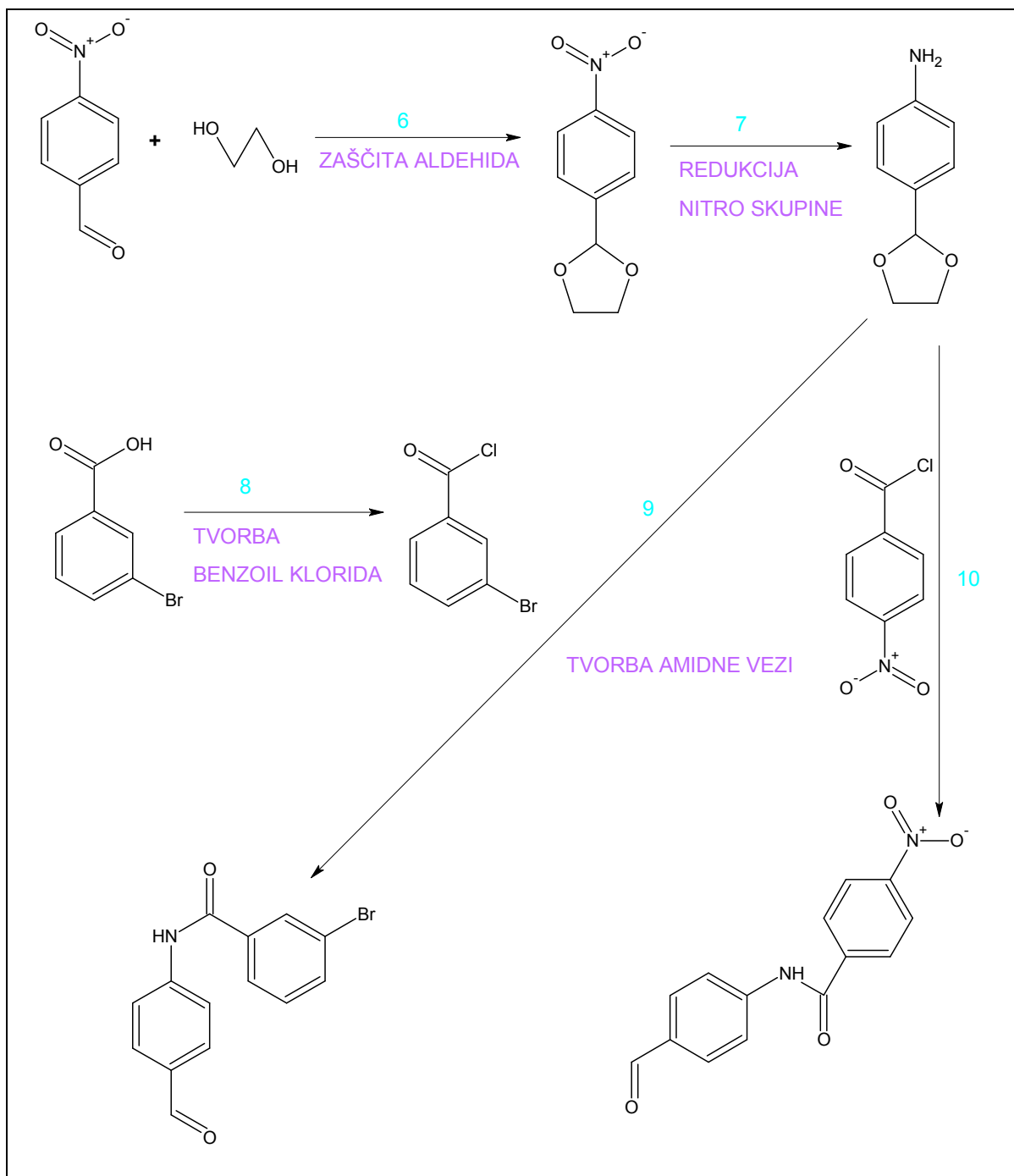
Aldehyde bomo sintetizirali po različnih postopkih glede na funkcionalno skupino, ki povezuje oba aromatska obroča (etri, sulfonati, amidi) (slika 9, slika 10). Sulfonohidrazide bomo pripravili v dveh zaporednih stopnjah. Najprej bomo klorsulfonirali aromatski ali heteroaromatski sistem, v naslednji stopnji pa bomo pripeli hidrazin hidrat (slika 11, slika 12).

Sintetizirane spojine bomo *in vitro* testirali na encim MurC, ki je udeležen v biosintezi peptidoglikana. Dobljeni rezultati nam bodo pokazali, če je naše razumevanje strukturnih zahtev za vezavo na aktivno mesto encima pravilno in nam hkrati dali iztočnico za nadaljnje raziskave na področju nizkomolekularnih nepeptidnih inhibitorjev MurC encimov.



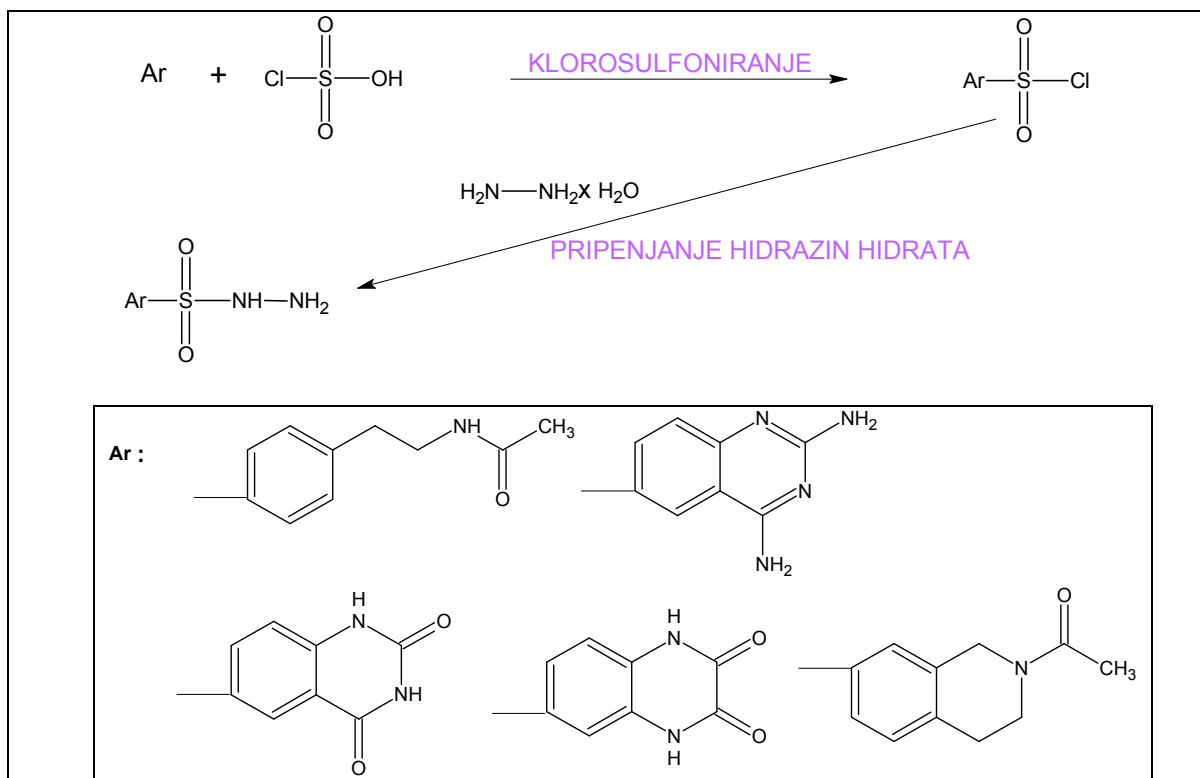
Slika 9: Reakcijska shema sinteze aldehydov

1: THF, Et₃N, KF; **2:** THF, Et₃N; **3:** p-Ts-OH, toluen; **4:** EDC, HOBT, Et₃N, CH₂Cl₂; **5:** HCOOH, H₂O

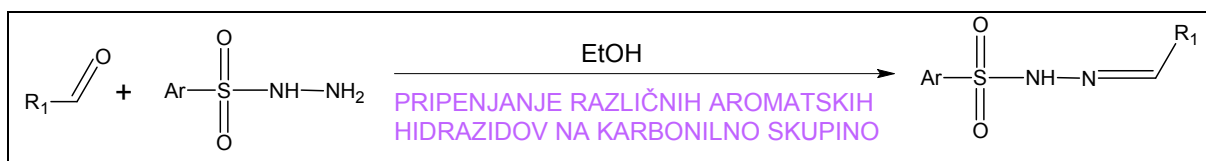


Slika 10: Reakcijska shema sinteze aldehydov

6: p-Ts-OH, toluen; 7: H₂/Pd/C, THF; 8: SOCl₂; 9, 10: K₂CO₃, THF



Slika 11: Splošna reakcijska shema sinteze sulfonhidrazidov



Slika 12: Splošna reakcijska shema sinteze sulfonhidrazonoilnih spojin

3. MATERIALI IN METODE

3.1. Materiali

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

3.2. Metode

3.2.1 Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija

Za tankoplastno kromatografijo (TLC) smo uporabljali plošče Kieselgel 60 F₂₅₄ izdelovalca Merck z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko ($\lambda=254$ nm) in različne orositvene reagente.

Kolonska kromatografija

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

3.2.2 Spektroskopske metode

Jedrsko magnetna resonanca (NMR)

¹H NMR spektri so bili posneti z instrumentom Bruker Avance DPX₃₀₀ na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, ki deluje v okviru Nacionalnega centra za NMR spektroskopijo visoke ločljivosti. Kot topilo smo uporabljali DMSO-d₆ in CDCl₃. 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.

Infrardeča spektroskopija (IR)

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

3.2.3 Temperatura tališča

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

3.2.4 Biokemijska testiranja

Spojine, ki smo jih sintetizirali, smo testirali na inhibitorno aktivnost na encim MurC 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 malahitno 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.

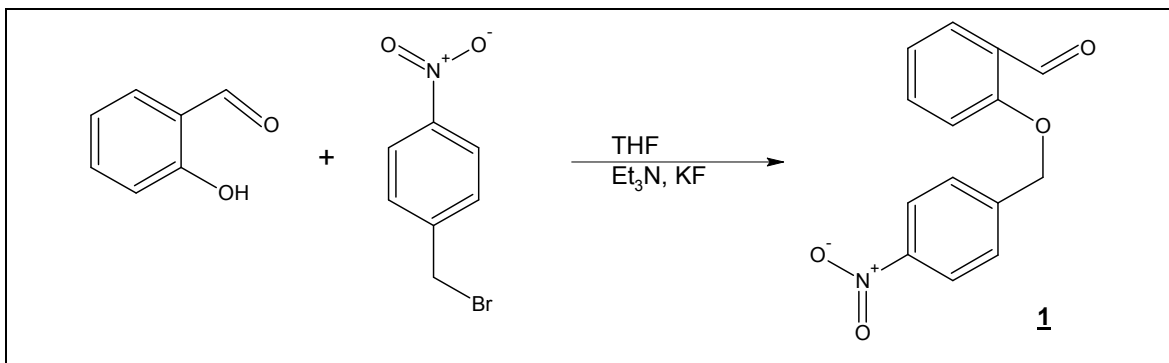
3.2.5 Nomenklatura in risanje spojin

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

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. Sinteza aldehydov

4.1.1 Sinteza 2-[(4-nitrobenzil)oksi]benzalhida (**1**)



Spojino **1** smo sintetizirali po postopku iz članka (25).

2,16 g (10,00 mmol) 4–nitrobenzilbromida, 1,22 g (10,00 mmol) salicilaldehida, 1,16 g (20,00 mmol) KF in 1,26 g trietilamina (12,37 mmol) smo suspendirali v 50 mL THF. Reakcijsko bučko smo opremili z vodnim povratnim hladilnikom in jo s klorkalcijevo cevko zaščitili pred atmosfersko vlago ter reakcijsko zmes segrevali 12 ur pri temperaturi vrenja. Oborino smo odfiltrirali in matičnici odparili topilo pod znižanim tlakom. Preostanek smo raztopili v 50 mL etilacetata ter spirali z dvakrat po 10 mL 10 % citronske kisline, z dvakrat po 10 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃ in z 10 mL nasičene vodne raztopine NaCl. Organske faze smo sušili z Na₂SO₄. Nato smo s presesavanjem odfiltrirali sušilno sredstvo ter pod znižanim tlakom odparili THF. Surovi produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo. Tako smo dobili 0,81 g (3,15 mmol) svetlo rumenih igličastih kristalov.

Izkoristek: 31 %

Elementna sestava: C₁₄H₁₁NO₄

Rf (etilacetat/heksan=1/3): 0,35

T_{tališča}: 109-112 °C

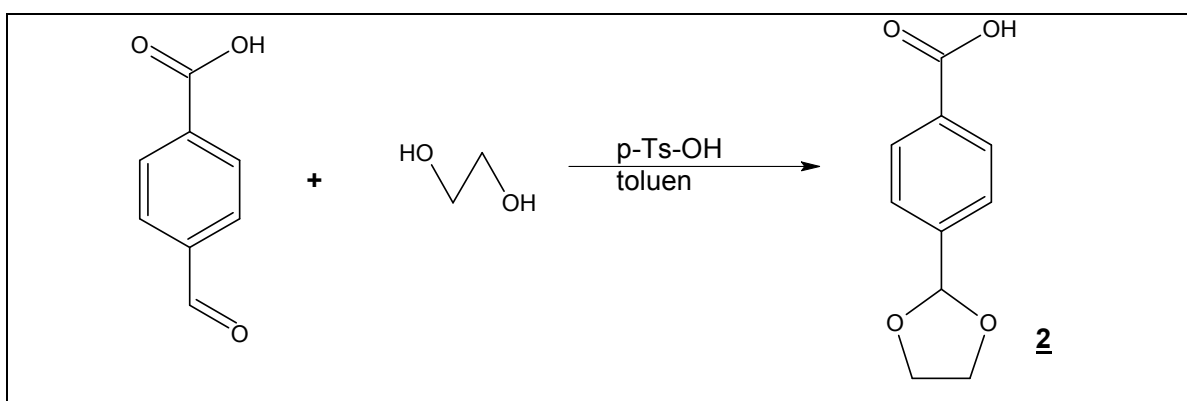
M: 257,241 gmol⁻¹

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ 5.33 (s, 2H, Ar- CH_2), 7.03 (d, 1H, $J=8.4$ Hz, Ar- H), 7.13 (t, 1H, $J=7.5$ Hz, Ar- H), 7.58 (m, 1H, Ar- H), 7.67 (d, 2H, $J=8.8$ Hz, Ar- H), 7.91 (m, 1H, Ar- H), 8.30 (m, 2H, Ar- H), 10.59 (s, 1H, CHO) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 258 (MH^+ , 6), 181 (100)

IR (KBr): 3422, 3080, 2926, 2362, 1935, 1686, 1598, 1520, 1403, 1348, 1244, 1189, 1104, 1050, 840, 736, 628, 529 cm^{-1} .

4.1.2 Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)benzojska kislina (2)



Spojino 2 smo sintetizirali po postopku iz članka (25).

Molekulska sita (0,4 nm) smo aktivirali s segrevanjem v sušilniku pri 120°C 20 minut. 5,00 g (33,3 mmol) 4-formilbenzojske kisline smo raztopili v 40 mL toluena in dodali 13,20 g (213 mmol) etilenglikola, 240 mg (1,39 mmol) 4-toluensulfonske kisline kot katalizatorja in 1,00 g molekulskih sit ter segrevali pri temperaturi vrenja 6 ur. Nato smo molekulska sita odfiltrirali s presesavanjem in matičnici dodali 50 mL 10 % vodne raztopine citronske kisline. Organsko in vodno fazo smo ločili, vodno fazo ekstrahirali z dvakrat po 20 mL toluena in 30 mL etilacetata. Združili smo vse organske faze in jih sprali s 40 mL nasičene vodne raztopine NaCl, sušili z Na_2SO_4 in pod znižanim tlakom odparili topilo. Dobili smo 4,61 g (23,74 mmol) svetlo rumenega trdnega produkta.

Izkoristek: 71 %

Elementna sestava: $\text{C}_{10}\text{H}_{10}\text{O}_4$

Rf (etilacetat): 0,60

T_{tališča}: 170-173 °C

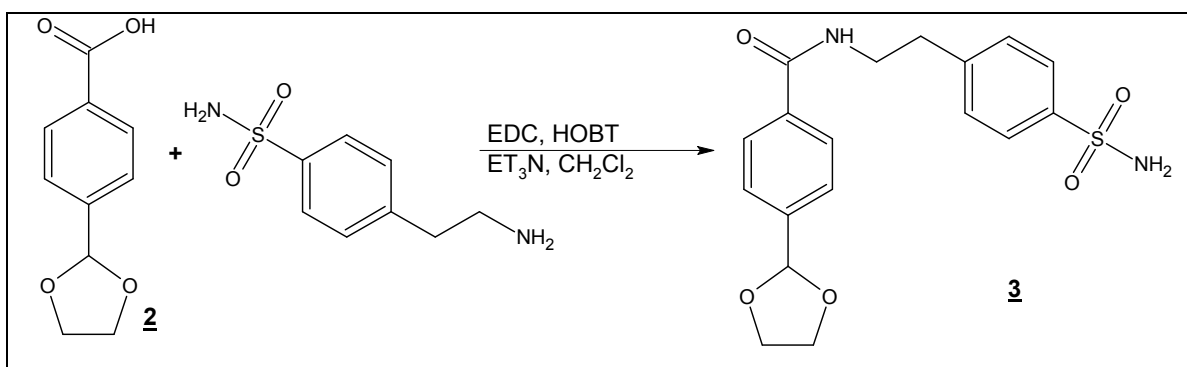
M: 194,184 gmol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 3.94-4.08 (m, 4H, O-CH₂-CH₂), 5.78 (s, 1H, Ar-CH), 7.54-7.98 (AA'BB', 4H, J=8.3 Hz, Δν = 58.1 Hz, Ar-H), 13.1 (s, 1H, COOH) ppm.

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

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

4.1.3 Sinteza N-[4-(aminosulfonyl)fenetil]-4-(1,3-dioksolan-2-il)benzamida (**3**)



1,00 g (5,15 mmol) 4-(1,3-dioksolan-2-il)benzojske kisline smo natehtali v suho bučko, ki smo jo postavili na ledeno kopel. Kisline smo nato raztopili v 25 mL diklorometana, dodali 990 mg (5,15 mmol) EDC, 700 mg (5,15 mmol) HOBT in 2 mL brezvodnega trietilamina. Zmes smo nato na ledeni kopeli mešali še 1 uro. Nastala je svetlo rumena raztopina, ki smo ji dodali 1,09 g (6,50 mmol) 4-(2-aminoetil)benzensulfonamida. Reakcijsko zmes smo 24 ur mešali pri sobni temperaturi in jo nato spirali z dvakrat po 15 mL 10 % vodne raztopine citronske kisline, z dvakrat 15 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, s 15 mL prečiščene vode in s 15 mL nasičene vodne raztopine NaCl. Nato smo organsko fazo pol ure sušili z Na₂SO₄ in odparili topilo pod nižanim tlakom. Dobili smo 0,714 g (3,68 mmol) trdnega produkta.

Izkoristek: 71 %

Elementna sestava: C₁₈H₂₀N₂O₅S

T_{tališča}: 162-165 °C

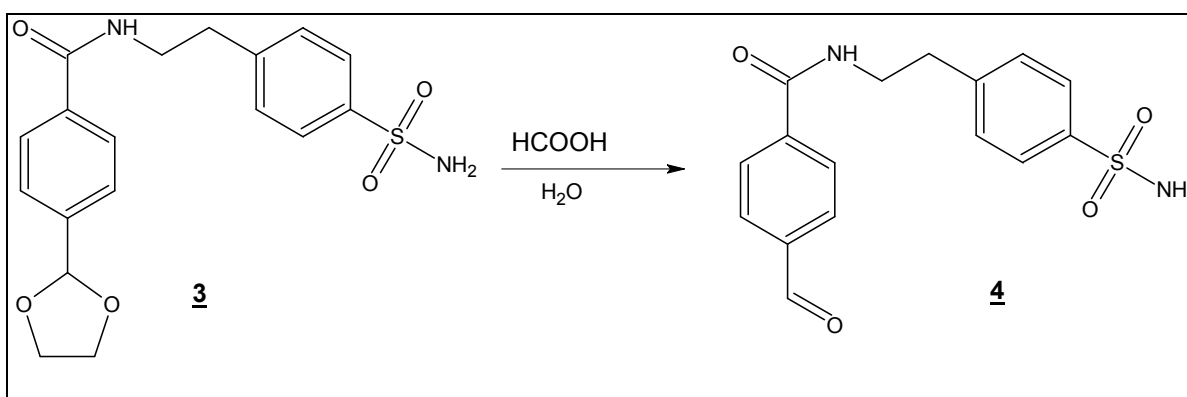
M: 194,184 gmol⁻¹

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ 2.94 (t, 2H, $J=7.1$ Hz, Ar- CH_2), 3.05 (t, 2H, $J=7.3$ Hz, NH- CH_2), 3.94-4.08 (m, 4H, O- CH_2 - CH_2 -O), 5.78 (s, 1H, Ar- CH), 7.28 (s, 1H, SO_2 - NH_2), 7.42-7.74 (AA'BB', 4H, $J=8.3$ Hz, $\Delta\nu=96$ Hz, Ar- H), 7.52-7.85 (AA'BB', 4H, $J=8.3$ Hz, $\Delta\nu=99$ Hz, Ar- H), 8.63 (t, 1H, $J=5.5$ Hz, CO-NH) ppm.

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

IR (KBr): 3316, 2936, 2364, 1920, 1719, 1635, 1542, 1433, 1397, 1323, 1158, 1080, 945, 839, 768, 686, 596, 544 cm^{-1} .

4.1.4 Sinteza N-[4-(aminosulfonyl)fenetil]-4-formilbenzamida (**4**)



1,30 g (3,79 mmol) N-[4-(aminosulfonyl)fenetil]-4-(1,3-dioksolan-2-il)benzamida smo natehtali v bučko, dodali 15 mL metanojske kisline in kapljico vode. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi čez noč. Potem smo metanojsko kislino odparili pod znižanim tlakom. Produkt smo naalkalili z vodno raztopino NaHCO_3 do $\text{pH}=8$. Vodno fazo smo nato ekstrahirali s štirikrat po 20 mL diklorometana. Organsko fazo smo nato pol ure sušili z Na_2SO_4 ter topilo pod znižanim tlakom uparili do suhega. Dobili smo 1,26 g (3,79 mmol) belega trdnega produkta.

Izkoristek: 100 %

Elementna sestava: $\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$

Rf (etilacetat): 0,54

T_{tališča}: 146-149 °C

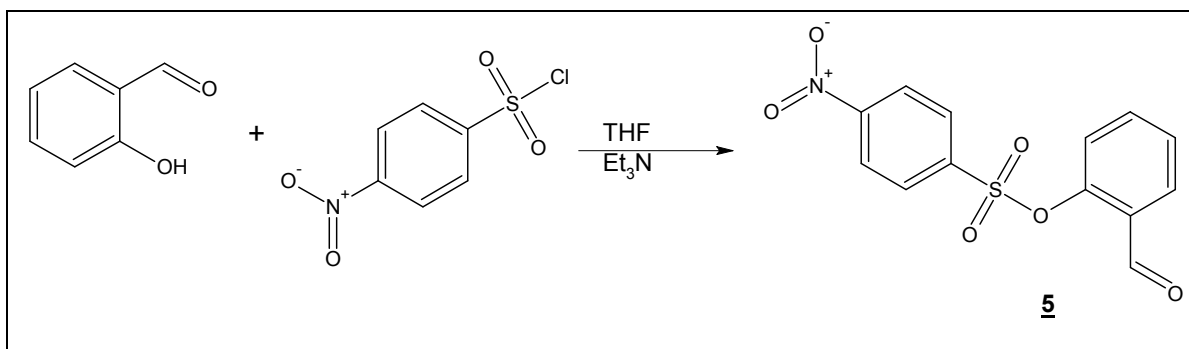
M: 332,375 g mol^{-1}

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO-d_6): δ 2.95 (t, 2H, $J=7.1$ Hz, Ar- CH_2), 3.55 (q, 2H, $J=6.9$ Hz, NH- CH_2), 7.28 (s, 2H, SO_2 -NH $_2$), 7.43-7.77 (AA'BB', 4H, $J=8.3$ Hz, $\Delta\nu=93$ Hz, Ar-H), 7.98 (m, 4H, Ar-H), 8.80 (t, 1H, $J=10.1$ Hz, CO-NH), 10.07 (s, 1H, CHO) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 333 (MH^+ , 100)

IR (KBr): 3308, 1705, 1638, 1545, 1460, 1336, 1154, 1094, 1017, 905, 846, 688, 596, 545 cm^{-1} .

4.1.5 Sinteza 2-formilfenil 4-nitrobenzensulfonata (**5**)



Spojino **5** smo sintetizirali po postopku iz članka (25).

2,00 g (16,38 mmol) salicilaldehida in 3,63 g (16,38 mmol) 4-nitrobenzensulfonil klorida smo natehtali v suho bučko in ju raztopili v 20,00 mL THF. V bučko smo dodali še 3,4 mL (24,75 mmol) trietilamina in jo postavili na ledeno kopel. Reakcijsko zmes smo mešali 24 ur pri čemer je temperatura počasi narasla do sobne temperature. Dodali smo 50 mL etilacetata, spirali z dvakrat po 10 mL 10 % citronske kisline, z dvakrat po 10 mL nasičene vodne raztopine NaHCO_3 in z 10 mL nasičene vodne raztopine NaCl . Organsko fazo smo sušili z Na_2SO_4 . Nato smo s presesavanjem odfiltrirali sušilno sredstvo ter pod nižanim tlakom odparili THF. Dobili smo 2,83 g (9,20 mmol) rumenega praška.

Izkoristek: 56 %

Elementna sestava: $\text{C}_{13}\text{H}_9\text{NO}_6\text{S}$

R_f (etilacetat/heksan=1/3): 0,31

T_{tališča}: 80-83 °C

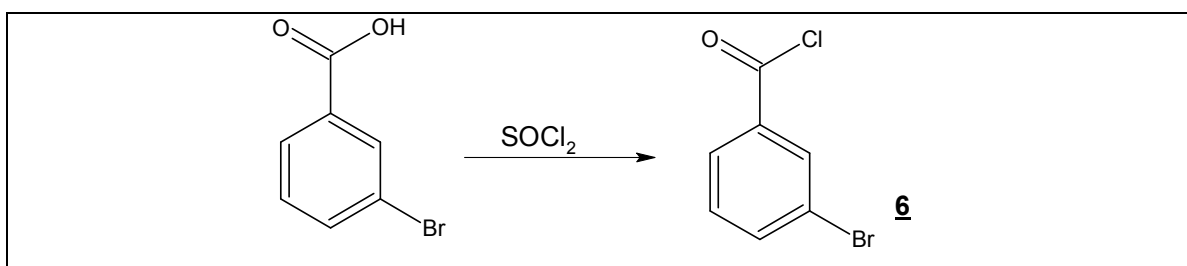
M: 307,280 g mol^{-1}

$^1\text{H NMR}$ (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.21 (d, 1H, $J=8.2$ Hz, Ar-CH), 7.59 (t, 1H, $J=7.5$ Hz, Ar-CH), 7.75 (m, 1H, Ar-CH), 7.90 (m, 1H, Ar-CH), 8.19-8.49 (AA'BB', 4H, $J=8.8$ Hz, $\Delta\nu=84$ Hz, Ar-H), 10.03 (s, 1H, CHO) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 307 (M^+ , 6), 120 (100)

IR (KBr): 2942, 2740, 2678, 2492, 2358, 2139, 1917, 1477, 1331, 1398, 1290, 1172, 1037, 904, 807, 762 cm^{-1} .

4.1.6 Sinteza 3-bromobenzoil klorida (**6**)



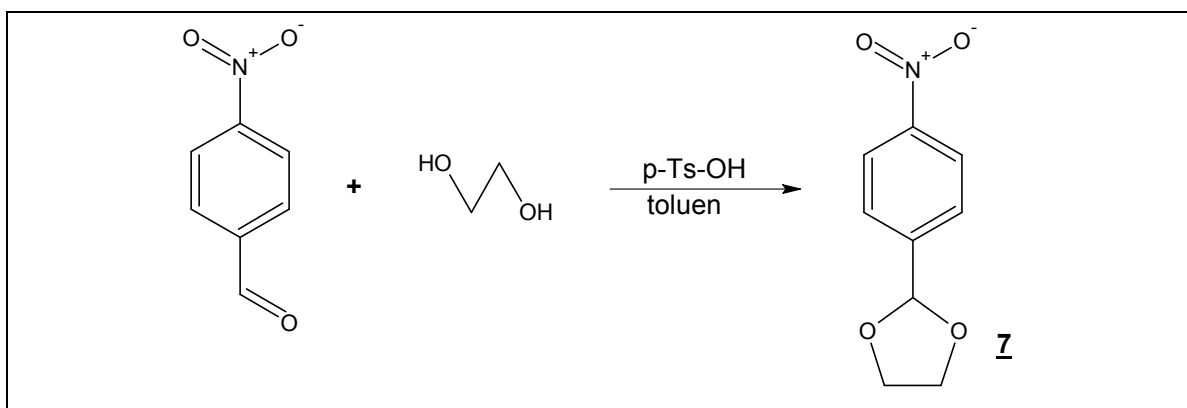
5,00 g (24,78 mmol) 3-bromobenzojske kisline smo natehtali v bučko, jo raztopili v 90 mL toluena ter po kapljicah dodali 15 mL (206,2 mmol) tionilklorida. Reakcijsko bučko smo opremili z vodnim povratnim hladilnikom in jo s klorkalcijevo cevko zaščitili pred atmosfersko vlago. Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri temperaturi vrenja. Naslednji dan smo odparili topilo, preostanek raztopili v 50 mL diklormetana, sprali z 20 mL nasičene vodne raztopine NaHCO_3 . Organsko fazo smo 15 minut sušili z Na_2SO_4 , nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Dobili smo 5,46 g (24,87 mmol) belega praška.

Produkt smo zaradi nevarnosti hidrolize takoj uporabili v nadaljnji reakciji zato nismo naredili analiz.

Izkoristek: 100 %

Elementna sestava: $\text{C}_7\text{H}_4\text{BrClO}$

M: 219,436 g mol^{-1}

4.1.7 Sinteza 2-(4-nitrofenil)-1,3-dioksolana (**7**)

Spojino **7** smo sintetizirali po postopku iz članka (25).

Molekulska sita (0,4 nm) smo aktivirali s segrevanjem v sušilniku pri 120°C 20 minut. 10,00 g (66,15 mmol) 4-nitrobenzaldehyda smo raztopili v 40 mL toluena in dodali 22,30 g (370 mmol) etilenglikola, 240 mg (2,43 mmol) 4-toluensulfonske kisline kot katalizatorja in 10,00 g molekulskih sit ter segrevali pri temperaturi vrenja 24 ur. Nato smo molekulska sita odfiltrirali s presesavanjem in matičnici dodali 50 mL 10 % vodne raztopine citronske kisline. Ločili smo organsko in vodno fazo ter vodno fazo ekstrahirali z dvakrat po 20 mL toluena in 30 mL etilacetata. Združili smo vse organske faze in jih sprali s 25 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃, 25 mL nasičene vodne raztopine NaCl, sušili z Na₂SO₄ in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 12,91 g (66,15 mmol) svetlo rumenega trdnega produkta.

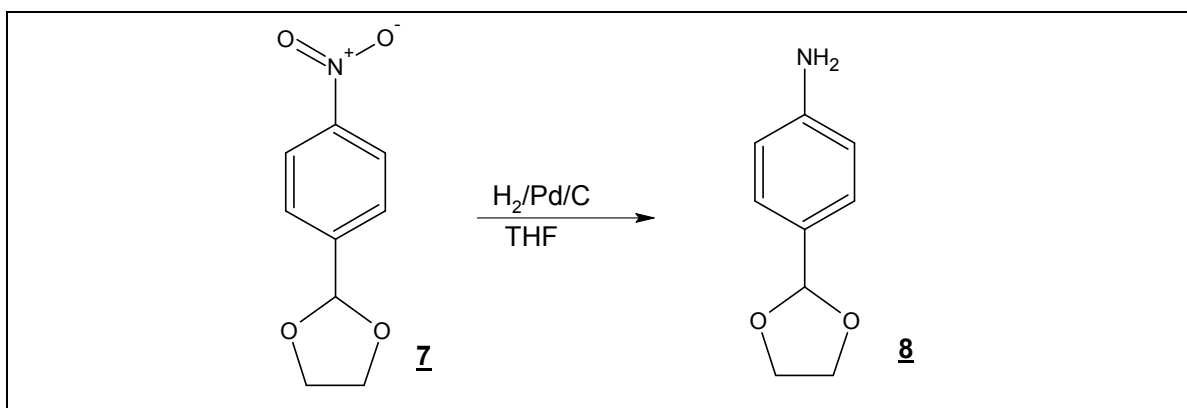
Izkoristek: 100 %

Elementna sestava: C₉H₉NO₄

T_{tališča}: 78-81 °C

M: 195,172 gmol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 4.04 (m, 4H, O-CH₂-CH₂-O), 5.89 (s, 1H, Ar-CH), 7.70-8.26 (AA'BB', 4H, J=8.8 Hz, Δv=77 Hz, Ar-H) ppm.

4.1.8 Sinteza 4-(1,3-dioksolan-2-il)fenilamina (**8**)

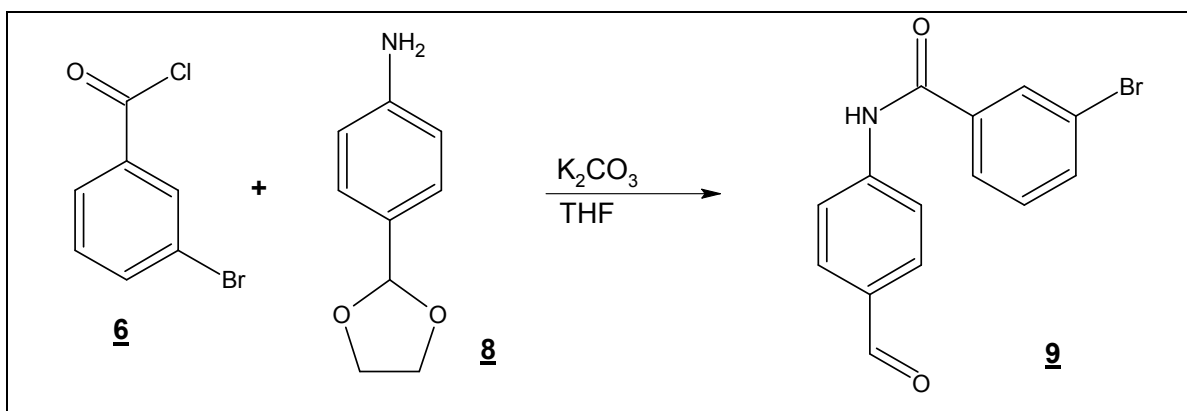
Spojino **8** smo sintetizirali po postopku iz članka (25).

12,90 g (66,10 mmol) 2-(4-nitrofenil)-1,3-dioksolana smo raztopili v 200 mL brezvodnega THF ter prepihovali z argonom 20 minut. Dodali smo 1,30 g katalizatorja Pd/C. Potem smo reakcijsko zmes s pomočjo Parrove aparature hidrogenirali pod tlakom 5 barov 2 uri. Po 2 urah smo katalizator odfiltrirali s presesavanjem in matičnico zaradi nestabilnosti produkta takoj uporabili v dveh ločenih naslednjih reakcijah. Predpostavimo, da se v matičnici nahaja 10,92 g (66,10 mmol) produkta.

Izkoristek: 100 %

Elementna sestava: C₉H₁₁NO₂

M: 165,189 g mol⁻¹

4.1.9 Sinteza 3-bromo-N-(4-formilfenil)benzamida (**9**)

V bučko smo odmerili 32,2 mL matičnice, ki smo jo dobili pri sintezi 4-(1,3-dioksolan-2-il)fenilamina. Dodali smo 1,58 g (11,43 mmol) K_2CO_3 in 2,79 g (12,69 mmol) 3-bromobenzoilklorida. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 3 ure, potem smo odparili topilo pod znižanim tlakom, ostanku v bučki pa dodali 30 mL etilacetata. Organsko fazo smo spirali z 20 mL 10 % vodne raztopine citronske kisline, z 20 mL nasičene vodne raztopine $NaHCO_3$, z 20 mL prečiščene vode in z 20 mL nasičene vodne raztopine $NaCl$. Organsko fazo smo 30 minut sušili z Na_2SO_4 , nato smo s presesavanjem odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Dobili smo 2,95 g (9,70 mmol) trdnega produkta oranžne barve.

Izkoristek: 85 %

Elementna sestava: $C_{14}H_{10}BrNO_2$

Rf (etilacetat): 0,57

T_{tališča}: 175-178 °C

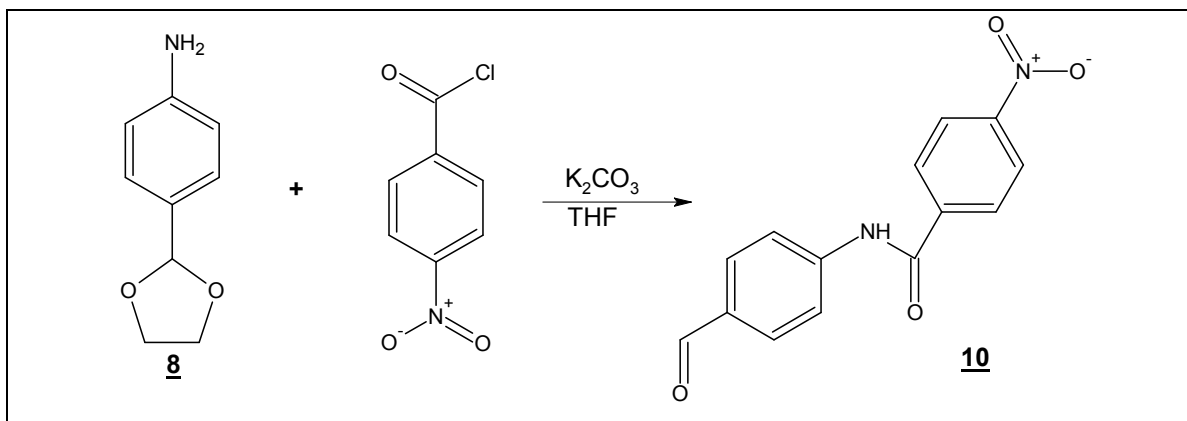
M: 304,139 $g\ mol^{-1}$

1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.53 (t, 1H, J=7.9 Hz, Ar-CH), 7.83 (m, 1H, Ar-CH), 7.97 (m, 5H, Ar-CH), 8.16 (t, 1H, J=1.8 Hz, Ar-CH), 9.93 (s, 1H, CO-NH), 10.70 (s, 1H, CHO) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 304 (M^+ , 86), 306 (100)

IR (KBr): 3363, 3120, 2854, 2360, 1673, 1589, 1533, 1417, 1319, 1258, 1171, 1116, 1012, 833, 799, 711, 617, 513 cm^{-1} .

4.1.10 Sinteza N-(4-formilfenil)-4-nitrobenzamida (**10**)



V bučko smo odmerili 67,9 mL matičnice, ki smo jo dobili pri sintezi 4-(1,3-dioksolan-2-il)fenilamina. Dodali smo 3,34 g (24,16 mmol) K_2CO_3 in 4,92 g (26,58 mmol) 4-nitrobenzoilklorida. Reakcijsko zmes smo mešali pri sobni temperaturi 3 ure, potem smo odparili topilo pod znižanim tlakom, ostanku v bučki pa dodali 30 mL etilacetata. Organsko fazo smo spirali z 20 mL 10 % vodne raztopine citronske kisline, z 20 mL nasičene vodne raztopine $NaHCO_3$, z 20 mL prečiščene vode in z 20 mL nasičene vodne raztopine $NaCl$. Organsko fazo smo 30 minut sušili z Na_2SO_4 , nato smo s presesavanjem odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Dobili smo 4,95 g (18,32 mmol) trdnega produkta oranžne barve.

Izkoristek: 76 %

Elementna sestava: $C_{14}H_{10}N_2O_4$

Rf (etilacetat): 0,84

T_{tališča}: 277-280 °C

M: 270,240 $g\ mol^{-1}$

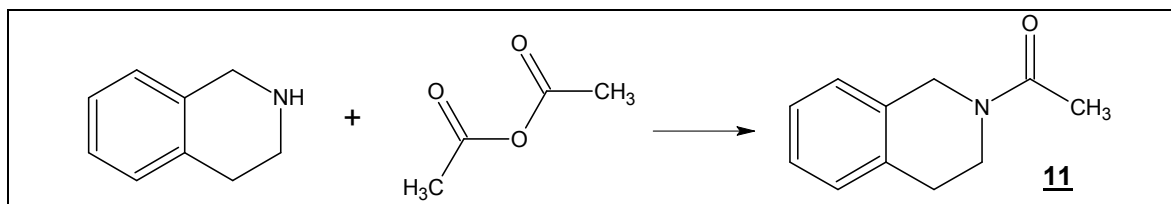
1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.93-8.05 (AA'BB', 4H, $J=8.7$ Hz, $\Delta v=27$ Hz, Ar-H), 8.20-8.41 (AA'BB', 4H, $J=6.9$ Hz, $\Delta v=54$ Hz, Ar-H), 9.94 (s, 1H, CO-NH), 10.93 (s, 1H, CHO) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 271 (MH^+ , 100)

IR (KBr): 3363, 3121, 2855, 1674, 1590, 1535, 1417, 1320, 1259, 1172, 1116, 1012, 896, 832, 711, 616 cm^{-1} .

4.2 Sinteza sulfonohidrazidov

4.2.1 Sinteza 1-[3,4-dihidro-2(1H)-izokinolinil]-1-etanona (**11**)



5,00 g (37,54mmol) 1,2,3,4-tetrahydroizokinolina smo natehtali v bučko, ki smo jo postavili na ledeno kopel. Vanjo smo počasi s kapalko dodali 9,00 g (88,20 mmol)

acetanhidrida. Reakcijsko zmes smo 30 minut mešali pri sobni temperaturi, nato smo pod znižanim tlakom odparili prebiten acetanhidrid ter nastalo očetno kislino. Ostanek smo raztopili v 50 mL diklormetana in sprali z 20 mL 2M HCl. Organsko fazo smo 15 minut sušili z Na₂SO₄, nato smo s presesavanjem odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Dobili smo 6,57 g (37,5 mmol) viskozne tekočine.

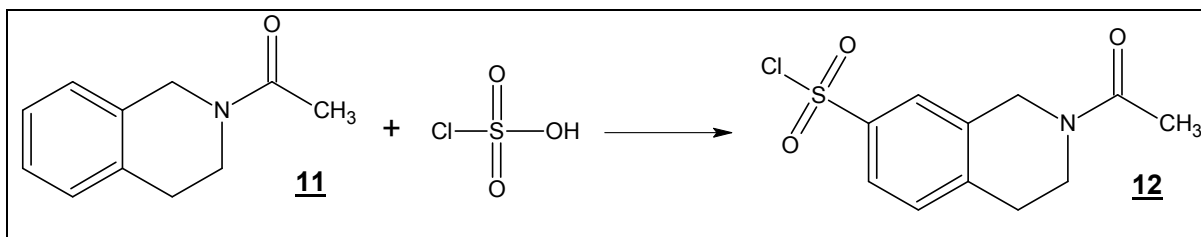
Izkoristek: 100 %

Elementna sestava: C₁₁H₁₃NO

M: 175,227 gmol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2.20 (s, 3H, CH₃), 2.90 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 3.77 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 4.68 (m, 2H, Ar-CH₂-N), 7.18 (m, 4H, Ar-CH) ppm.

4.2.2 Sinteza 2-acetil-1,2,3,4-tetrahidro-7-izokinolinsulfonil klorida (**12**)



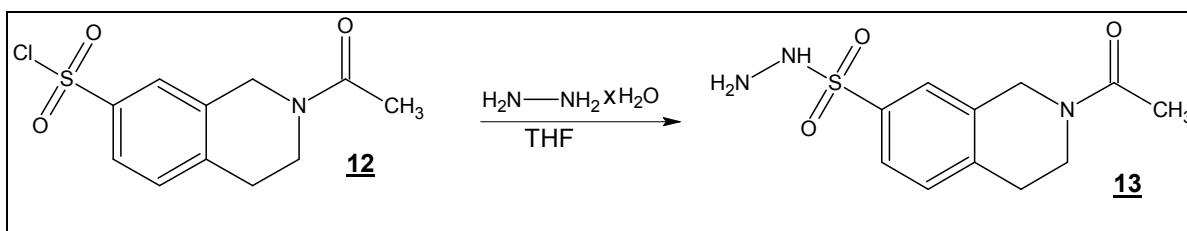
40,00 mL (600,7 mmol) klorsulfonske kisline smo odmerili v bučko ter jo z uporabo trdnega acetona (acetona, tekoči N₂) ohladili na -90 °C, dodali smo 6,57 g (37,5 mmol) 1-[3,4-dihidro-2(1H)-izokinolinil]-1-etanona. Reakcijsko zmes smo mešali preko noči pri sobni temperaturi, jo nato ohladili in počasi zlili na led. Dodali smo 100 mL diklormetana in ločili obe fazi. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄ in odparili topilo. Dobili smo 6,50 g (23,75 mmol) temno rjave tekočine.

Produkt smo takoj uporabili v nadaljnji reakciji.

Izkoristek: 63 %

Elementna sestava: C₁₁H₁₂ClNO₃S

M: 273,737 gmol⁻¹

4.2.3 Sinteza 2-acetil-1,2,3,4-tetrahidro-7-izokinolinsulfonohidrazida (**13**)

6,00 g (120 mmol) monohidrata smo natehtali v bučko, jo postavili na ledeno kopel ter vanjo po kapljicah dodali 6,50 g (23,75 mmol) 2-acetil-1,2,3,4-tetrahidro-7-izokinolinsulfonil klorida. Reakcijsko zmes smo 30 minut mešali pri 0 °C, nato smo odstavili ledeno kopel ter pustili mešati preko noči pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo v bučko dodali 50 mL etilacetata, sprali z dvakrat po 25 mL nasičene vodne raztopine NaCl, sušili z Na₂SO₄ in pod znižanim tlakom odparili topila. Dobili smo 4,23 g (15,71 mmol) trdnega produkta.

Izkoristek: 66 %

Elementna sestava: C₁₁H₁₅N₃O₃S

Rf (metanol/etilacetat =1/2): 0,94

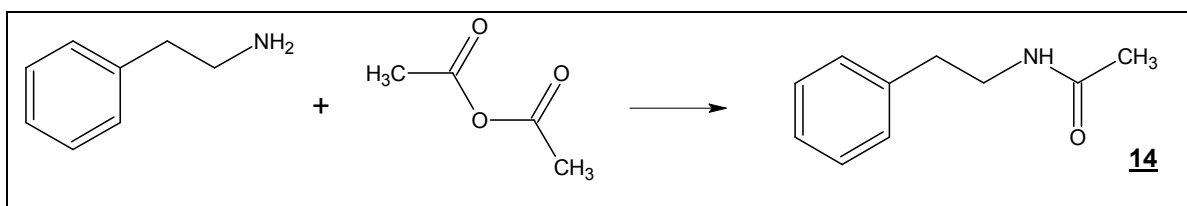
T_{tališča}: 77-80 °C

M: 269,321 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2.10 (s, 3H, CH₃), 2.89 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 3.68 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 4.70 (m, 2H, Ar-CH₂-N), 7.41 (t, 1H, J=6.6 Hz, Ar-CH), 7.63 (t, 2H, J=10.5 Hz, Ar-CH), 8.30 (s, 3H, NH-NH₂) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 270 (MH⁺, 63), 180 (100)

IR (KBr): 3356, 3198, 2361, 1618, 1430, 1328, 1251, 1157, 1034, 887, 829, 694, 572 cm⁻¹.

4.2.4 Sinteza N-fenetilacetamida (**14**)

10,00 g (82,52 mmol) 2-fenil-1-etanamina smo natehtali v bučko ter jo postavili na vodno kopel. Po kapljicah smo dodali 25,27 mg (247,56 mmol) acetanhidrida ter reakcijsko zmes pri sobni temperaturi pustili mešati preko noči. Naslednji dan smo odparili topilo (nezreagirani acetanhidrid, nastala očetna kislina), preostanek pa raztopili v 20 mL etilacetata, spirali s 30 mL 10 % citronske kisline, z 30 mL 1M NaOH, s 25 mL vode ter s 30 mL nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z Na₂SO₄ in topilo odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 12,53 g (9,20 mmol) trdnega produkta.

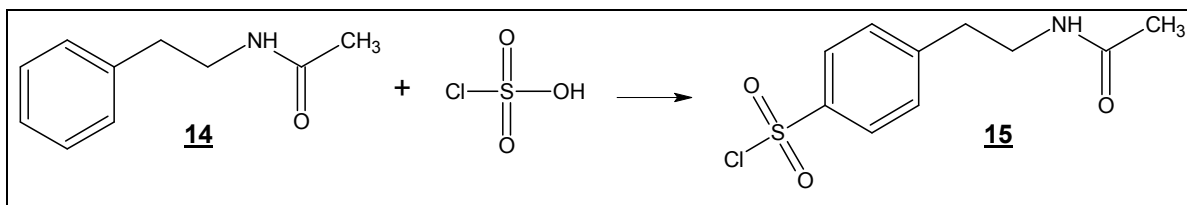
Izkoristek: 93 %

Elementna sestava: C₁₀H₁₃NO

M: 163,216 gmol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1.80 (s, 3H, CH₃), 2.71 (t, 2H, J=7.5 Hz, Ar-CH₂-CH₂), 3.27 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 7.23 (m, 5H, Ar-CH), 7.92 (s, 1H, CO-NH) ppm.

4.2.5 Sinteza 4-[2-(acetilamino)etil]benzensulfonil klorida (**15**)



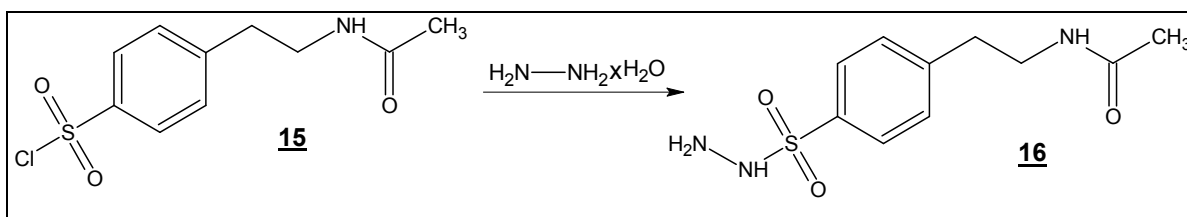
50,00 mL (750,8 mmol) klorsulfonske kisline smo odmerili v bučko ter jo ohladili na -30 °C, vanjo smo počasi dodali 12,53 g (76,8 mmol) N-fenetilacetamida in nato odmaknili ledeno kopel. Reakcijsko zmes smo pri sobni temperaturi mešali preko noči, jo nato ohladili in počasi zlili na led. Ko se je ves led stalil, smo naš produkt s presesavanjem odfiltrirali. Dobili smo 20,10 g (76,8 mmol) belega praška, ki smo ga takoj uporabili v nadaljnji sintezi.

Izkoristek: 100 %

Elementna sestava: C₁₀H₁₂ClNO₃S

M: 163,216 gmol⁻¹

4.2.6 Sinteza N-[4-(hidrazinosulfonil)fenetil]acetamida (**16**)



3,11g (62,2 mmol) hidrazin monohidrata smo natehtali v bučko, jo postavili na ledeno kopel ter vanjo po kapljicah dodajali raztopino 4-[2-(acetilamino)etil]benzensulfonil klorida 10,11 g (38,67 mmol) v 50 mL THF. Reakcijsko zmes smo 30 minut mešali pri 0 °C, nato smo odstavili ledeno kopel ter pustili mešati preko noči pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo v bučko dodali 50 mL etilacetata, spirali z dvakrat po 25 mL nasičeno vodno raztopino NaCl ter organsko fazo 15 minut sušili z Na₂SO₄. Nato smo s presesavanjem odfiltrirali sušilno sredstvo ter pod znižanim tlakom odparili topila. Dobili smo 3,04 g (11,81 mmol) viskozne tekočine.

Izkoristek: 31 %

Elementna sestava: C₁₀H₁₅N₃O₃S

Rf (etilacetat): 0,09

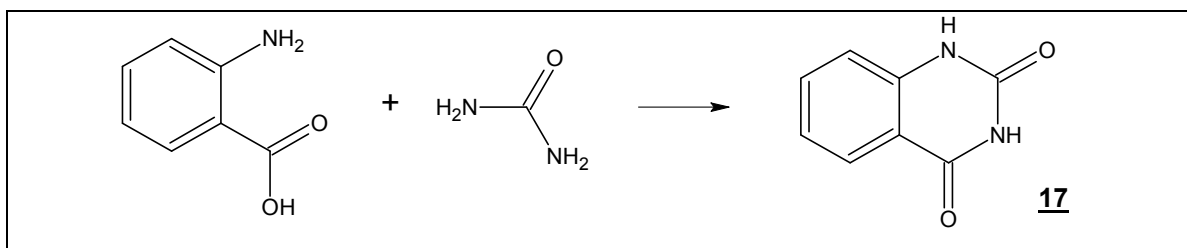
M: 257,311 gmol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1.96 (s, 3H, CH₃), 2.79 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 3.31 (t, 2H, J=6.5 Hz, Ar-CH₂-CH₂), 4.01 (m, 2H, NH-NH₂), 7.41-7.75 (AA'BB', 4H, J=8.2 Hz, Δν=93 Hz, Ar-H), 7.93 (t, 1H, J=5.1 Hz, NH-NH₂), 8.32 (s, 1H, CO-NH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 258 (MH⁺, 90), 210 (100)

IR (KBr): 3282, 2975, 1929, 1641, 1440, 1333, 1163, 1093, 1047, 1018, 872, 787, 695, 582 cm⁻¹.

4.2.7 Sinteza 2,4(1H,3H)-kinazolindiona (**17**)



Spojino **17** smo sintetizirali po postopku iz članka (26).

5,00 g (36,46 mmol) 2-aminobenzojske kisline in 21,89 g (364,6 mmol) sečnine smo natehtali v bučko in segrevali čez noč pri 150 °C. Naslednji dan smo v bučko dodali 75 mL 1M NaOH in segrevali, da se je reakcijska zmes raztopila. Nato smo nevtralizirali z 1M HCl. Izpadlo oborino smo s presesavanjem odfiltrirali ter jo sprali z metanolom in vodo. Dobili smo 4,66 g (28,74 mmol) svetlo rjavega praška.

Izkoristek: 79 %

Elementna sestava: C₈H₆N₂O₆

Rf (etilacetat): 0,11

T_{tališča}: 317-320 °C

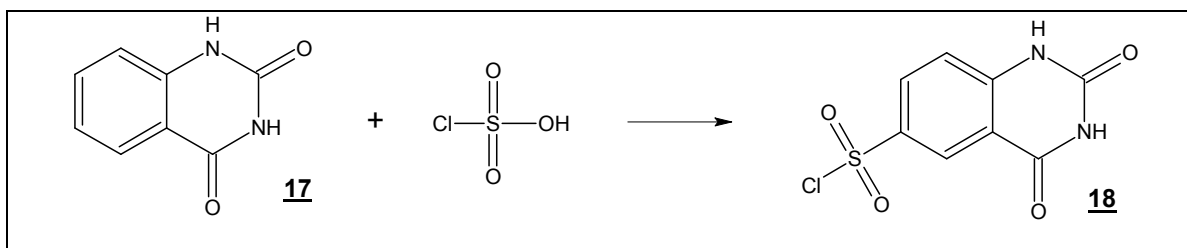
M: 162,148 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.18 (m, 2H, Ar-H), 7.63 (m, 1H, Ar-H), 7.89 (m, 1H, Ar-H), 11.18 in 11.19 (2s, 2H, CO-NH-CO-NH) ppm.

MS (EI): m/z (%): 162 (M⁺, 100)

IR (KBr): 3167, 3055, 2846, 2364, 1989, 1923, 1702, 1616, 1486, 1442, 1298, 1141, 1038, 857, 755, 684, 528 cm⁻¹.

4.2.8 Sinteza 2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolinsulfonil klorida (**18**)



9,60 mL (144,16 mmol) klorsulfonske kisline smo ohladili na ledeni kopeli in počasi med mešanjem na ledu dodali 4,66 g (28,78mmol) 2,4(1H,3H)-kinazolindiona. Po vsem dodatku smo bučko z reakcijsko zmesjo opremili z vodnim povratnim hladilnikom in jo s klorkalcijevo cevko zaščitili pred atmosfersko vlago. Reakcijsko zmes smo segreli na 80 °C in pri tej temperaturi pustili mešati preko noči. Naslednji dan 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. Dobili smo 16,30 g (24,18 mmol) svetlo rjavega praška.

Izkoristek: 84 %

Elementna sestava: C₈H₅ClN₂O₄S

Rf (diklormetan/metanol=20:1): 0,51

T_{tališča}: 231-234 °C

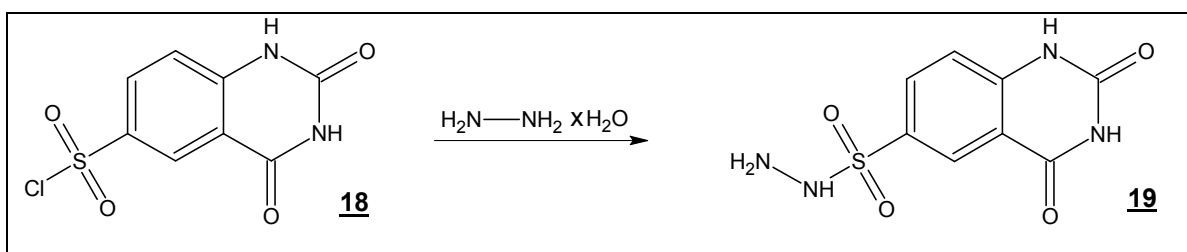
M: 260,655 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.11 (d, 1H, J= 8.4 Hz, Ar-H), 7.82 (m, 1H, Ar-H), 8.10 (d, 1H, J=1.8 Hz, Ar-H), 11.21 in 11.28 (2s, 2H, CO-NH-CO-NH) ppm.

MS (EI): m/z (%): 260 (M⁺, 95), 236 (100)

IR (KBr): 3448, 3042, 2362, 1674, 1615, 1484, 1438, 1368, 1294, 1176, 1070, 834, 762, 710, 617, 586 cm⁻¹.

4.2.9 Sinteza 2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolinsulfonohidrazida (**19**)



1,92 g (38,4 mmol) hidrazin monohidrata smo natehtali v bučko in jo postavili na ledeno kopel. 1,00 g (3,84 mmol) 2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolinsulfonil klorida smo suspendirali v 10 mL vode ter nastalo suspenzijo po kapljicah dodali v bučko s hidrazin monohidratom. Reakcijsko zmes smo 30 minut mešali pri 0°C, nato smo odstavili ledeno kopel ter pustili mešati preko noči pri sobni temperaturi. Naslednji dan smo nastalo suspenzijo s presesavanjem odfiltrirali ter oborino sprali z vodo. Dobili smo 0,90 g (3,52 mmol) trdnega produkta.

Izkoristek: 90 %

Elementna sestava: C₈H₈N₄O₄S

Rf (etilacetat): 0,24

T_{tališča}: 70-73 °C

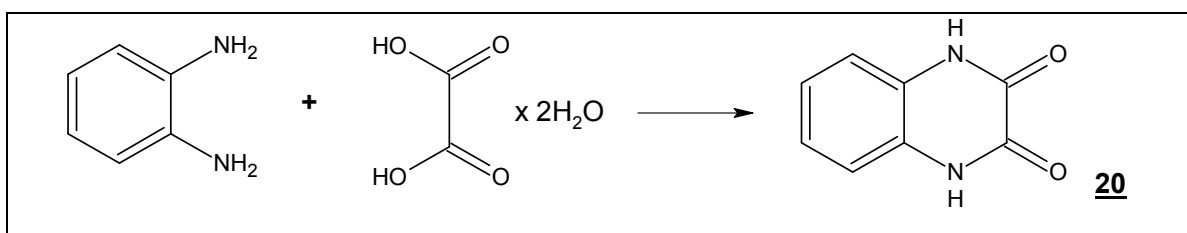
M: 256,240 g mol⁻¹

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 4.13 (s, 2H, NH-NH $_2$), 7.30 (d, 1H, J=8.6 Hz, Ar-H), 7.98 (m, 1H, Hz, Ar-H), 8.28 (m, 1H, Ar-H), 8.40 (s, 1H, NH-NH $_2$), 10,93 in 11,00 (2s, 2H, CO-NH-CO-NH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 257 (MH $^+$, 33), 279 (MNa $^+$, 100)

IR (KBr): 3572, 3350, 3242, 3045, 2930, 2845, 1693, 1497, 1388, 1175, 980, 908, 836, 769, 664, 538 cm^{-1} .

4.2.10 Sinteza 1,4-dihidro-2,3-kinoksalindiona (**20**)



Spojino **20** smo sintetizirali po postopku iz članka (27).

10,00 g (92,47 mmol) 2-aminofenilamina (92,47 mmol) in 11,66 g (92,47 mmol) oksalne kisline smo natehtali v bučko ter raztopili v 50 mL DMF. Po vsem dodatku smo bučko z reakcijsko zmesjo opremili z vodnim povratnim hladilnikom in jo s klorkalcijevo cevko zaščitili pred atmosfersko vlago. Reakcijsko zmes smo segrevali preko noči pri 150 $^{\circ}\text{C}$. Naslednji dan smo reakcijsko zmes ohladili. V bučko smo dodali 30 mL vode ter jo za 3 ure postavili v hladilnik. Izpadel je trden produkt, ki smo ga s presesavanjem odfiltrirali.

Izkoristek: 17 %

Elementna sestava: C $_8$ H $_6$ N $_2$ O $_6$

Rf (etilacetat): 0,28

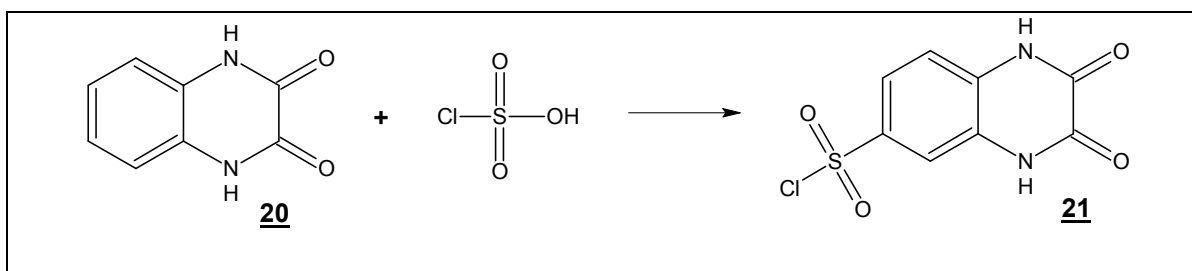
T_{tališča}: >300 $^{\circ}\text{C}$

M: 162,146 g mol^{-1}

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.10 (m, 4H, Ar-CH), 11.89 (s, 2H, NH-CO-CO-NH) ppm.

MS (EI): m/z (%): 162 (M $^+$, 100)

IR (KBr): 3750, 3046, 2968, 2881, 2776, 2370, 1680, 1419, 1391, 1246, 944, 854, 752, 702, 638, 580 cm^{-1} .

4.2.11 Sinteza 2,3-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinoksalinsulfonil klorida (**21**)

5,36 mL (80,55 mmol) klorsulfonske kisline smo odmerili v bučko ter vanjo počasi dodali 2,61 g (16,11 mmol) 1,4-dihidro-2,3-kinoksalindiona. Nato smo bučko z reakcijsko zmesjo opremili z vodnim povratnim hladilnikom in jo s klorkalcijevo cevko zaščitili pred atmosfersko vlago. Reakcijsko bučko smo segreli na 70 °C in pri tej temperaturi pustili mešati preko noči. Naslednji dan smo reakcijsko zmes ohladili in počasi zlili na led. Nastalo oborino smo odfiltrirali s presesavanjem. Dobili smo 4,20 g (16,11 mmol) svetlo rjavega praška.

Izkoristek: 100 %

Elementna sestava: C₈H₅ClN₂O₄S

R_f (diklormetan/metanol=20:1): 0,53

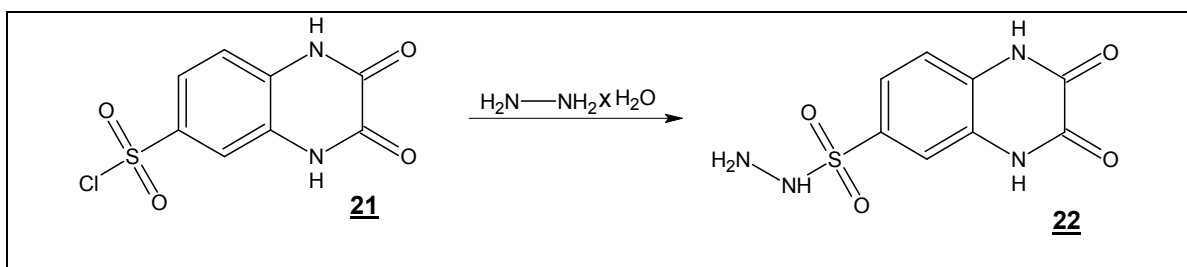
T_{tališča}: >300 °C

M: 260,655 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.07 (d, 1H, J=8.3 Hz, Ar-H), 7.31 (m, 1H, Ar-H), 7.45 (m, 1H, Ar-H), 11.93 in 11.96 (2s, 2H, NH-CO-CO-NH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 261 (MH⁺, 38), 283 (MNa⁺, 100)

IR (KBr): 3405, 3125, 2943, 2363, 1698, 1603, 1495, 1459, 1375, 1285, 1173, 1080, 951, 896, 833, 770, 674, 617, 568, 542 cm⁻¹.

4.2.12 Sinteza 2,3-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinoksalinsulfonohidrazida (**22**)

1,92 g (38,40 mmol) hidrazin monohidrata smo natehtali v bučko in postavili na ledeno kopel. 1,00 g (3,84 mmol) 2,3-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinoksalinsulfonil klorida smo suspendirali v 10 mL vode ter nastalo suspenzijo po kapljicah dodali v bučko s hidrazin monohidratom. Reakcijsko zmes smo 30 minut mešali pri 0 °C, nato smo odstavili ledeno kopel ter pustili mešati pri sobni temperaturi preko noči. Naslednji dan smo nastalo suspenzijo s presesavanjem odfiltrirali ter oborino sprali z vodo. Dobili smo 0,73 g (2,85 mmol) trdnega produkta.

Izkoristek: 74 %

Elementna sestava: C₈H₈N₄O₄S

Rf (etilacetat): 0,12

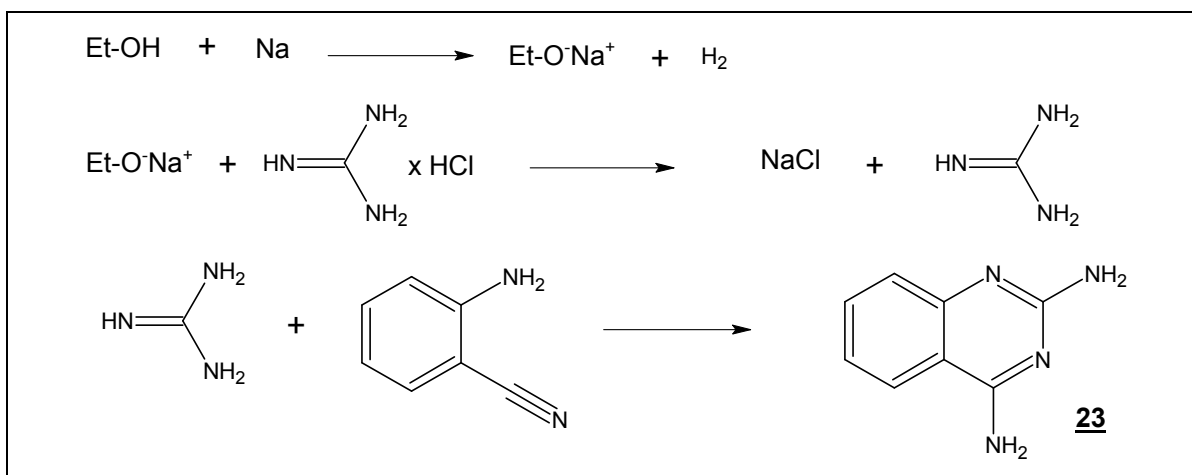
T_{tališča}: 240-243 °C

M: 256,240 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 4.21 (s, 2H, NH-NH₂), 7.24 (s, 1H, NH-NH₂), 7.48 (m, 1H, Ar-H), 7.58 (m, 1H, Ar-H), 9.63 (2s, 2H, NH-CO-CO-NH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 257 (MH⁺, 93), 279 (MNa⁺, 100)

IR (KBr): 3573, 3350, 3242, 3045, 2931, 2844, 1915, 1694, 1498, 1388, 1175, 954, 908, 836, 769, 698, 665, 618 cm⁻¹.

4.2.13 Sinteza 2,4-kinazolindiamina (**23**)

Spojino **23** smo sintetizirali po postopku iz članka (28).

5,84 g (253,96 mmol) natrija smo natehtali in ga počasi dodali v ohlajeni brezvodni etanol, reakcijsko zmes smo 2 uri mešali na ledeni kopeli. V nastali natrijev etoksid smo dodali 24,26 g (253,96 mmol) gvanidinijevega klorida ter pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Nastalo oborino smo s presesavanjem odfiltrirali, sprali z etanolom ter v filtratu odparili topila pod znižanim tlakom. Dobili smo viskozno tekočino, ki smo ji dodali 10,00 g (84,65 mmol) 2-aminobenzonitrila. Reakcijsko bučko smo 24 ur segrevali pri temperaturi vrenja. Naslednji dan smo reakcijsko bučko ohladili na ledu ter s presesavanjem odfiltrirali nastalo suspenzijo in oborino sprali z etanolom. Dobili smo 8,07 g (50,37 mmol) trdnega produkta.

Izkoristek: 60 %

Elementna sestava: $\text{C}_8\text{H}_8\text{N}_4$

Rf (etilacetat): na startu

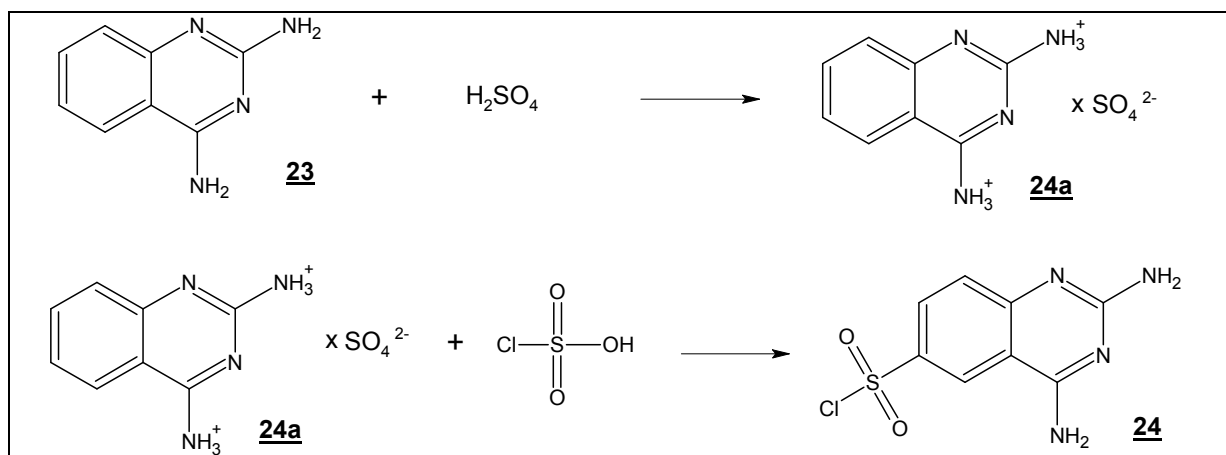
T_{tališča}: 312-315 °C

M: 160,176 g mol^{-1}

¹H NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆): δ 7.00 (t, 1H, *J*=7.5 Hz, Ar-H), 7.18 (m, 5H, NH₂, NH₂, Ar-H), 7.46 (t, 1H, *J*=7.2 Hz, Ar-H), 7.96 (d, 1H, *J*=7.9 Hz, Ar-H) ppm.

MS (EI): m/z (%): 160 (M⁺, 100)

IR (KBr): 3469, 3336, 3134, 2362, 1661, 1528, 1468, 1424, 1132, 875, 813, 756, 577 cm^{-1} .

4.2.14 Sinteza 2,4-diamino-6-kinazolinsulfonil klorida (**24**)

Spojino **24** smo sintetizirali po postopku iz članka (29).

8,07 g (50,37 mmol) 2,4-kinazolindiamina smo s pomočjo segrevanja raztopili v 100 mL vode. V vročo raztopino smo dodali 7,30 mL koncentrirane H_2SO_4 v 22 mL vode. Raztopino smo ohladili in dobili 6,65 g 2,4-kinazolindiaminijevega sulfata.

V bučko smo natehtali 0,48 g (13,54 mmol) NaCl in na ledeni kopeli dodali 14,40 (216,2 mmol) mL klorsulfonske kisline. V nastalo suspenzijo smo postopoma dodajali 6,65 g 2,4-kinazolindiaminijevega sulfata. Po dodatku vseh reagentov smo reakcijsko bučko opremili z vodnim povratnim hladilnikom in jo s klorkalcijevo cevko zaščitili pred atmosfersko vlago. Reakcijsko zmes smo 3 ure segrevali na $160\text{ }^\circ\text{C}$, jo nato postavili na led, da je izpadel naš produkt, ki smo ga s presesavanjem odfiltrirali. Dobili smo 4,19 g (16,2 mmol) trdnega produkta.

Izkoristek: 32 %

Elementna sestava: $\text{C}_8\text{H}_7\text{ClN}_4\text{O}_2\text{S}$

Rf (etilacetat): 0,43

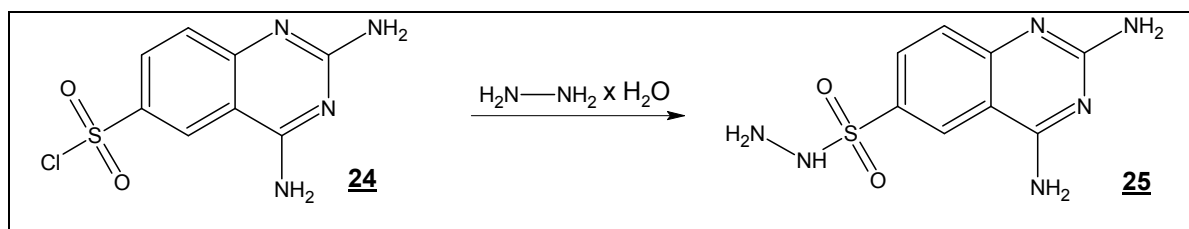
T_{tališča}: $> 300\text{ }^\circ\text{C}$

M: $258,686\text{ g mol}^{-1}$

^1H NMR (300 MHz, DMSO- d_6): δ 7.39 (s, 2H, NH_2), 8.00 (s, 2H, NH_2), 8.54 (m, 1H, Ar-H), 8.76 (m, 1H, Ar-H), 9.16 (m, 1H, Ar-H) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 259 (MH^+ , 50), 160 (100)

IR (KBr): 3132, 1678, 1518, 1421, 1182, 1083, 1034, 835, 761, 702, 622 cm^{-1} .

4.2.15 Sinteza 2,4-diamino-6-kinazolinsulfonohidrazida (**25**)

1,93 g (38,69 mmol) hidrazin monohidrata smo natehtali v bučko in jo postavili na ledeno kopel. 1,00 g (3,87mmol) 2,4-diamino-6-kinazolinsulfonil klorida smo raztopili v 10 mL vode ter nastalo raztopino po kapljicah dodali v bučko s hidrazin monohidratom. Reakcijsko zmes smo 30 minut mešali pri 0 °C ter nato pustili mešati pri sobni temperaturi preko noči. Naslednji dan smo nastalo suspenzijo s presesavanjem odfiltrirali ter oborino sprali z vodo. Dobili smo 0,90 g (3,54 mmol) trdnega produkta.

Izkoristek: 90 %

Elementna sestava: C₈H₁₀N₆O₂S

Rf (etilacetat): na startu

T_{tališča}: 241-244 °C

M: 254,270 g mol⁻¹

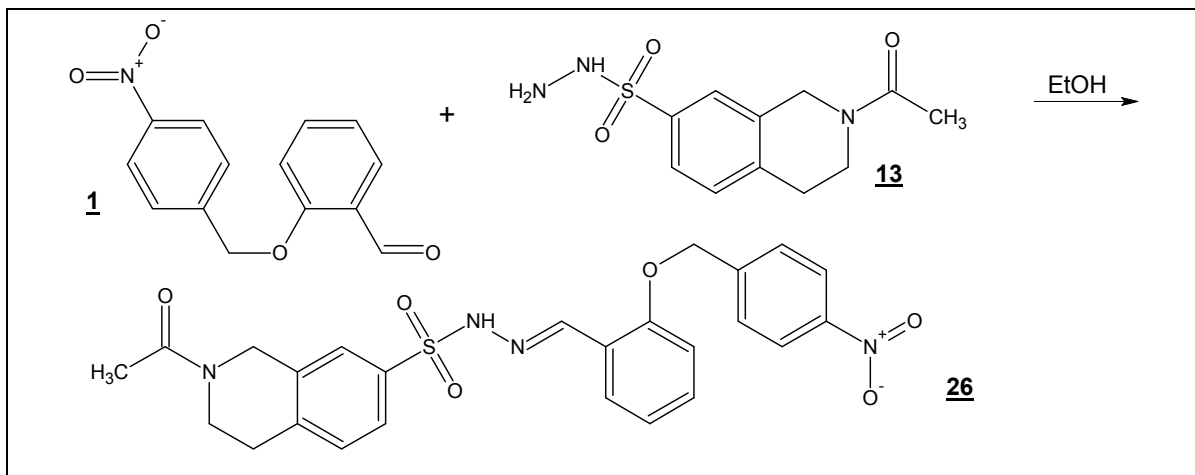
¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 4.04 (s, 2H, NH-NH₂), 6.38 (s, 2H, NH₂), 7.27 (s, 1H, NH-NH₂), 7.58 (s, 2H, NH₂), 7.76 (m, 1H, Ar-H), 8.17 (m, 1H, Ar-H), 8.45 (m, 1H, Ar-H) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 572 (MH⁺, 49), 127 (100)

IR (KBr): 3470, 3345, 3133, 2362, 1654, 1553, 1439, 1374, 1316, 1168, 1031, 946, 814, 709, 577 cm⁻¹.

4.3 Sinteza končnih spojin (sulfonohidrazidi s povečano polarnostjo)

4.3.1 Sinteza 2-acetil-N'-({2-[(4-nitrobenzil)oksi]fenil}metiliden)-1,2,3,4-tetrahidro-7-izokinolinsulfonohidrazida (**26**)



150,0 mg (0,583 mmol) 2-[(4-nitrobenzil)oksi]benzaldehyda (**1**) in 157,0 mg (0,583 mmol) 2-acetil-1,2,3,4-tetrahidro-7-izokinolinsulfonohidrazida (**13**) smo raztopili v 10 mL etanola. Reakcijsko zmes smo segrevali pri temperaturi vrenja preko noči. Naslednji dan smo s presesavanjem odfiltrirali nastalo suspenzijo. Izpadel je nečisti svetlo rumeni produkt, ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo. Tako smo dobili 107 mg (0,210 mmol) svetlo rumenega praška.

Izkoristek: 36 %

Elementna sestava: C₂₅H₂₄N₄O₆S

Rf (etilacetat): 0,29

T_{tališča}: 182-185 °C

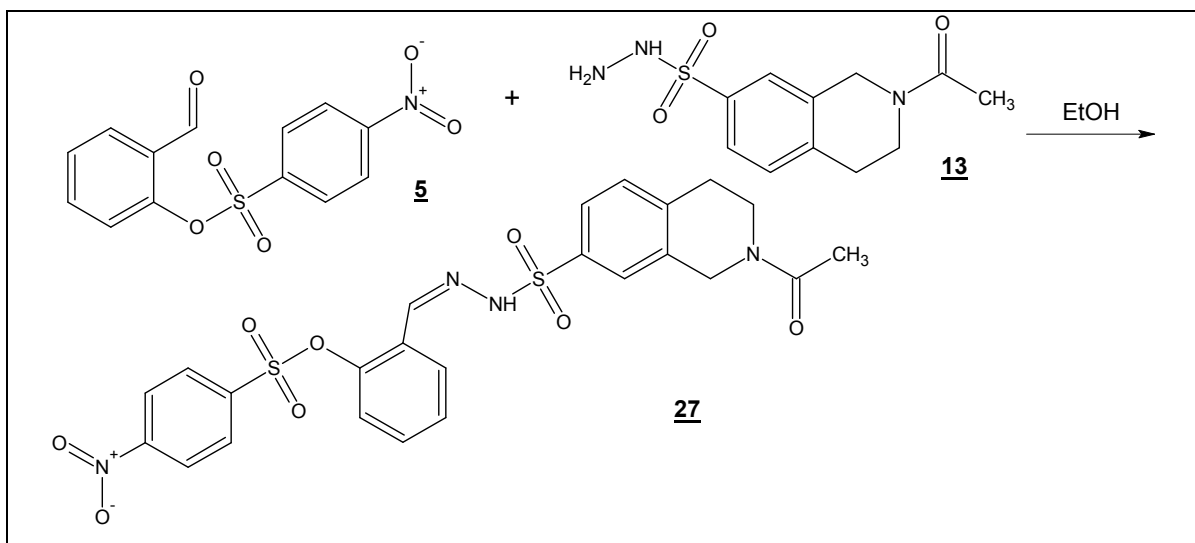
M: 508,547 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2.06 (s, 3H, CH₃), 2.85 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 3.64 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 4.69 (m, 2H, Ar-CH₂-N), 5.32 (s, 2H, Ar-CH₂-O), 7.01 (t, 1H, J=7.6 Hz, Ar-H), 7.11 (t, 1H, J=8.3 Hz, Ar-H), 7.40 (d, 1H, J=8.2 Hz, Ar-H), 7.81 (m, 5H, Ar-H), 8.29 (m, 3H, Ar-H), 9.05 (s, 1H, CH=N), 11.45 (s, 1H, =N-NH-SO₂) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 509 (MH⁺, 100)

IR (KBr): 3447, 3082, 2900, 2362, 1615, 1520, 1451, 1342, 1241, 1158, 1050, 962, 841, 767, 736, 637, 602 cm⁻¹.

4.3.2 Sinteza 2-({2-[(2-acetil-1,2,3,4-tetrahidro-7-izokinolinil)sulfonyl]hidrazono} metil)fenil 4-nitrobenzensulfonata (**27**)



150,0 mg (0,583 mmol) 2-formilfenil 4-nitrobenzensulfonata (**5**) in 131,5 mg (0,583 mmol) 2-acetil-1,2,3,4-tetrahidro-7-izokinolinsulfonohidrazida (**13**) smo raztopili v 10 mL etanola. Reakcijsko zmes smo segrevali pri temperaturi vrenja preko noči. Naslednji dan smo s presesavanjem odfiltrirali nastalo suspenzijo. Izpadel je nečist svetlo rumen produkt, ki smo ga očistili s kolonsko kromatografijo. Tako smo dobili 150 mg (0,269 mmol) svetlo rumenega praška.

Izkoristek: 46 %

Elementna sestava: C₂₄H₂₂N₄O₈S₂

R_f (etilacetat): 0,52

T_{tališča}: 218-221 °C

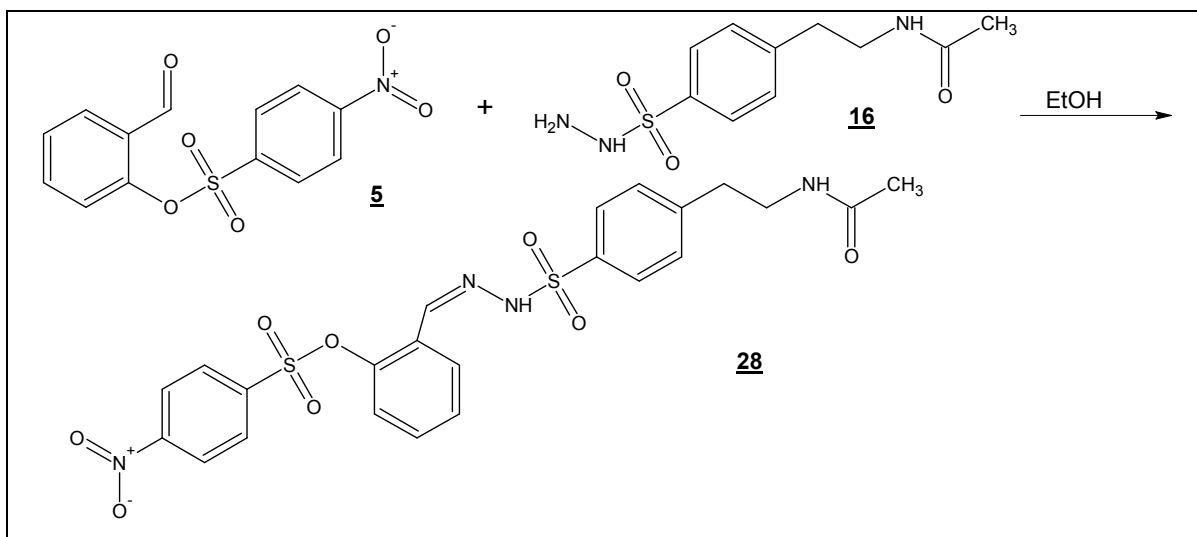
M: 558,586 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 2.07 (s, 3H, CH₃), 2.89 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 3.66 (t, 2H, J=5.2 Hz, Ar-CH₂-CH₂), 4.69 (m, 2H, Ar-CH₂-N), 7.10 (d, 1H, J=8.2 Hz, Ar-H), 7.23 (d, 1H, J=8.1 Hz, Ar-H), 7.42 (m, 2H, Ar-H), 7.68 (m, 2H, Ar-H), 8.13 (m, 3H, Ar-H), 8.19 (s, 1H, CH=N), 8.37 (m, 2H, Ar-H), 11.71 (s, 1H, =N-NH-SO₂) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 559 (MH⁺, 100)

IR (KBr): 3103, 2868, 2732, 2289, 1938, 1610, 1535, 1452, 1382, 1194, 1085, 971, 876, 785, 653, 614, 558 cm⁻¹.

4.3.3 Sinteza 2-([2-([4-[2-(acetilamino)etil]fenil]sulfonyl)hidrazono]metil]fenil 4-nitrobenzensulfonata (28)



150,0 mg (0,488 mmol) 2-formilfenil 4-nitrobenzensulfonata (**5**) in 125,3 mg (0,488 mmol) N-[4-(hidrazinosulfonyl)fenetil]acetamida (**16**) smo raztopili v 10 mL etanola. Reakcijsko zmes smo segrevali pri temperaturi vrenja preko noči. Naslednji dan smo odparili polovico topila pod znižanim tlakom, da dobimo nasičeno raztopino, ter nato bučko postavili na ledeno kopel, da se je pojavila oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem. Dobili smo 74 mg (0,135 mmol) trdnega belega produkta.

Izkoristek: 28 %

Elementna sestava: C₂₃H₂₂N₄O₈S₂

Rf (etilacetat): 0,22

T_{tališča}: 189-192 °C

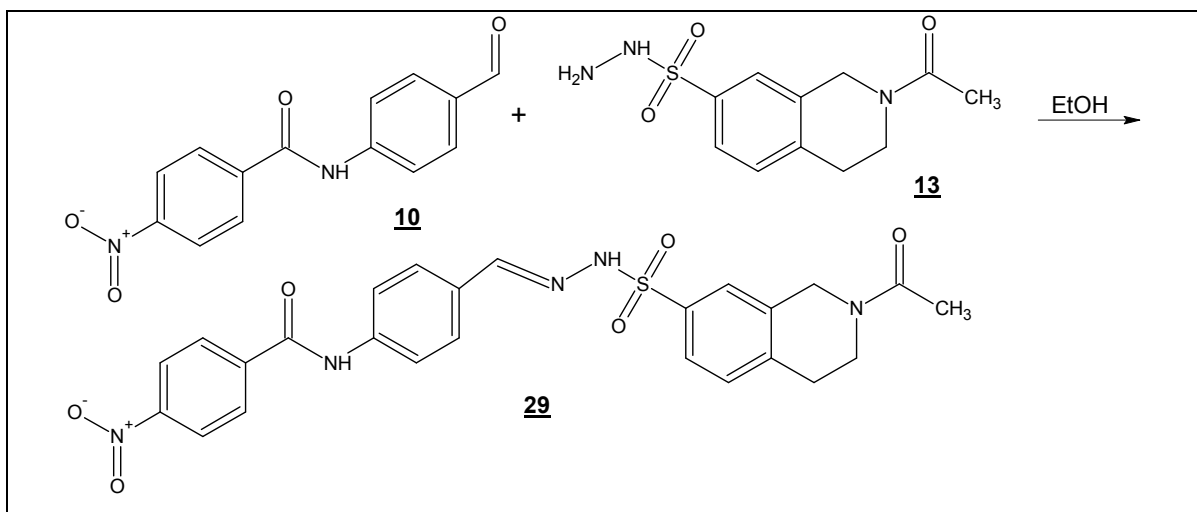
M: 546,575 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1.74 (s, 3H, CH₃), 2.77 (t, 2H, J=7.1 Hz, Ar-CH₂-CH₂), 3.26 (t, 2H, J=6.9 Hz, Ar-CH₂-CH₂), 7.10 (s, 1H, CH=N), 7.42 (m, 4H, Ar-H), 7.69 (s, 1H, CO-NH), 7.76 (d, 2H, J=8.2 Hz, Ar-H), 7.87 (m, 2H, Ar-H), 8.11 (m, 2H, Ar-H), 8.43 (d, 2H, J=8.9 Hz, Ar-H), 11.70 (s, 1H, =N-NH-SO₂) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 547 (MH⁺, 100)

IR (KBr): 3404, 3111, 2881, 2784, 2282, 1638, 1529, 1475, 1447, 1365, 1168, 1087, 956, 874, 774, 706, 655, 556 cm⁻¹.

4.3.4 Sinteza N-[4-({2-[(2-acetil-1,2,3,4-tetrahidro-7-izokinolinil)sulfonil]hidrazono}metil)fenil]-4-nitrobenzamida (**29**)



150,0 mg (0,555 mmol) N-(4-formilfenil)-4-nitrobenzamida (**10**) in 149,4 mg (0,555 mmol) N-[4-(hidrazinsulfonil)fenetil]acetamida (**13**) smo raztopili v 10 mL etanola. Reakcijsko zmes smo segrevali pri temperaturi vrenja preko noči. Odparili smo polovico topila pod znižanim tlakom, da pospešimo nastanek oborine, ter dodali 10 mL vode. Izpadlo je 197 mg (0,378 mmol) svetlo rumenega produkta, ki smo ga odfiltrirali s presesavanjem.

Izkoristek: 68 %

Elementna sestava: C₂₅H₂₃N₅O₆S

Rf (etilacetat/heksan=1/3): 0,27

T_{tališča}: 225-228 °C

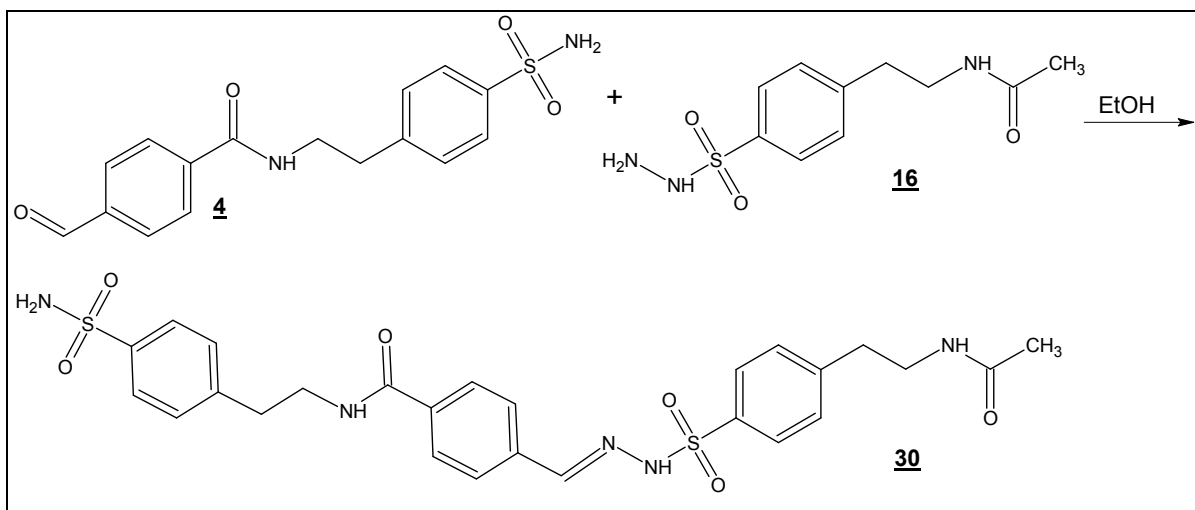
M: 521,546 gmol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆) δ 2.08 (s, 3H, CH₃), 2.87 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 3.65 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 4.71 (m, 2H, Ar-CH₂-N), 7.42 (m, 1H, Ar-H), 7.57 (m, 2H, Ar-H), 7.60 (m, 2H, Ar-H), 7.72 (m, 2H, Ar-H), 7.89 (s, 1H, CH=N), 8.20 (m, 2H, Ar-H), 8.39 (m, 2H, Ar-H), 11.34 (s, 1H, =N-NH-SO₂) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 522 (MH⁺, 100)

IR (KBr): 3369, 3035, 2878, 2363, 1684, 1620, 1529, 1329, 1254, 1329, 1254, 1159, 1050, 958, 840, 714, 596 cm⁻¹.

4.3.5 Sinteza 4-{{2-({4-[2-(acetilamino)etil]fenil}sulfonyl)hidrazono}metil}-N-[4-(aminosulfonyl)fenetil]benzamida (30)



150,0 mg (0,452mmol) N-[4-(aminosulfonyl)fenetil]-4-formilbenzamidea (**4**) in 116,1 mg (0,452 mmol) N-[4-(hidrazinosulfonyl)fenetil]acetamida (**16**) smo raztopili v 10 mL etanola. Reakcijsko zmes smo segrevali pri temperaturi vrenja preko noči. Po ohladitvi smo s presesavanjem odfiltrirali nastalo suspenzijo. Dobili smo 107 mg (0,210 mmol) belega praška.

Izkoristek: 46 %

Elementna sestava: C₂₆H₂₉N₅O₆S₂

Rf (etilacetat/heksan=1/3): 0,20

T_{tališča}: 242-245 °C

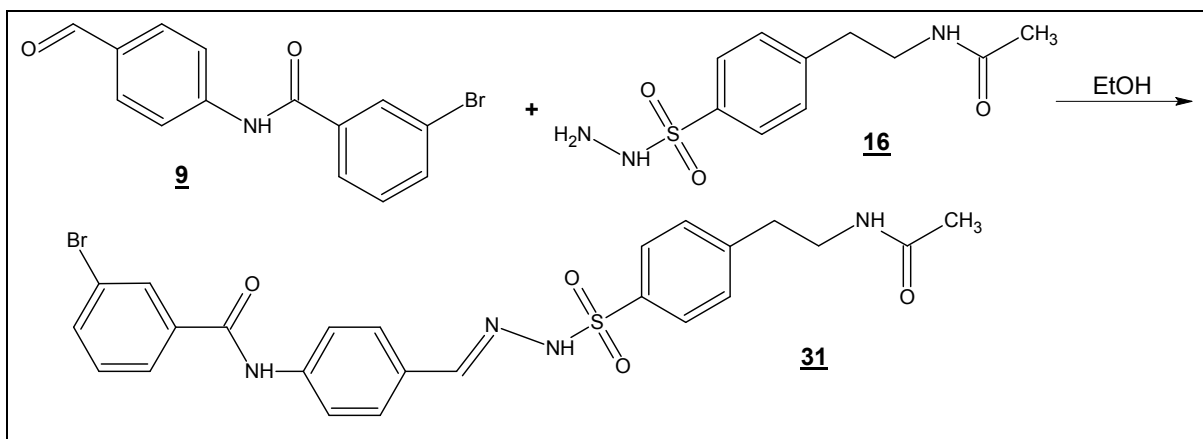
M: 571,671 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1.74 (s, 3H, CH₃), 2.76 (t, 2H, J=7.3 Hz, Ar-CH₂-CH₂), 2.93 (t, 2H, J=7.1 Hz, Ar-CH₂), 3.24 (d, 2H, J=7.2 Hz, Ar-CH₂-CH₂), 3.52 (q, 2H, J=7.0 Hz, NH-CH₂), 7.28 (s, 2H, SO₂-NH₂), 7.43 (m, 4H, Ar-H), 7.63 (d, 2H, J=8.4 Hz, Ar-H), 7.75 (d, 2H, J=8.2 Hz, Ar-H), 7.81 (m, 4H, Ar-H), 7.89 (m, 1H, CO-NH-CH₂), 7.95 (s, 1H, CH=N), 8.62 (t, 1H, J=5.6 Hz, NH-CO-CH₃), 11.63 (s, 1H, =N-NH-SO₂) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 572 (MH⁺, 82), 594 (MNa⁺, 100)

IR (KBr): 3313, 3200, 2932, 2297, 1643, 1543, 1455, 1330, 1169, 1095, 937, 816, 766, 686, 577 cm⁻¹.

4.3.6 Sinteza N-(4-{2-({4-[2-(acetilamino)etil]fenil}sulfonil)hidrazono]metil}fenil)-3-bromobenzamida (**31**)



150,0 mg (0,304 mmol) 3-bromo-N-(4-formilfenil)benzamida (**9**) in 126,9 mg (0,452 mmol) N-[4-(hidrazinosulfonil)fenetil]acetamida (**16**) smo raztopili v 10 mL etanola. Reakcijsko zmes smo segrevali pri temperaturi vrenja preko noči. Naslednji dan smo s presesavanjem odfiltrirali nastalo suspenzijo. Tako smo dobili 101 mg (0,186 mmol) belega praška.

Izkoristek: 61 %

Elementna sestava: C₂₄H₂₃BrN₄O₄S

Rf (etilacetat/heksan=1/3): 0,24

T_{tališča}: 235-238 °C

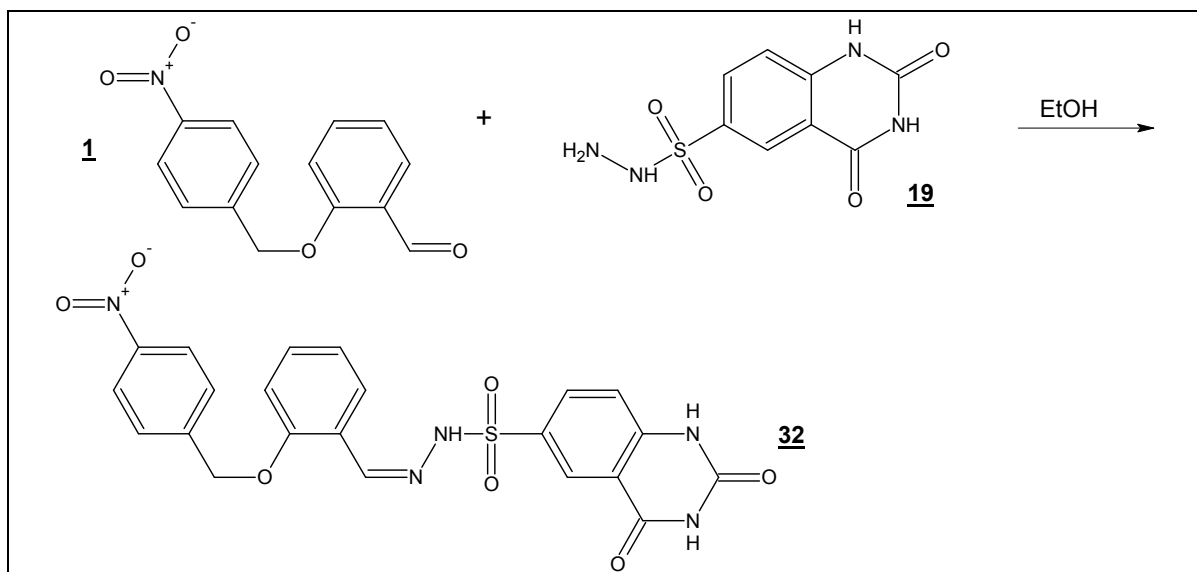
M: 543,434 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 1.75 (s, 3H, CH₃), 2.76 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 3.29 (m, 2H, Ar-CH₂-CH₂), 7.49 (m, 5H, Ar-H), 7.81 (m, 5H, Ar-H), 7.89 (m, 2H, Ar-H), 7.95 (s, 1H, CO-NH-CH₂), 8.13 (m, 1H, CH=N), 10.47 (s, 1H, NH-CO-Ar), 11.38 (s, 1H, =N-NH-SO₂) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 543 (MH⁺, 12), 576 (MNa⁺, 100)

IR (KBr): 3281, 3215, 2364, 1654, 1525, 1412, 1367, 1325, 1170, 1040, 959, 830, 695, 574 cm⁻¹.

4.3.7 Sinteza N'-({2-[(4-nitrobenzil)oksi]fenil}metiliden)-2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolinsulfonohidrazida (**32**)



150,0 mg (0,583 mmol) 2-[(4-nitrobenzil)oksi]benzalhida (**1**) in 149,3 mg (0,583 mmol) 2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolinsulfonohidrazida (**19**) smo raztopili v 10 mL etanola. Reakcijsko zmes smo segrevali pri temperaturi vrenja preko noči. Naslednji dan smo s presesavanjem odfiltrirali nastalo belo oorino.

Izkoristek: 51 %

Elementna sestava: C₂₂H₁₇N₅O₇S

R_f (etilacetat/heksan=1/3): na startu

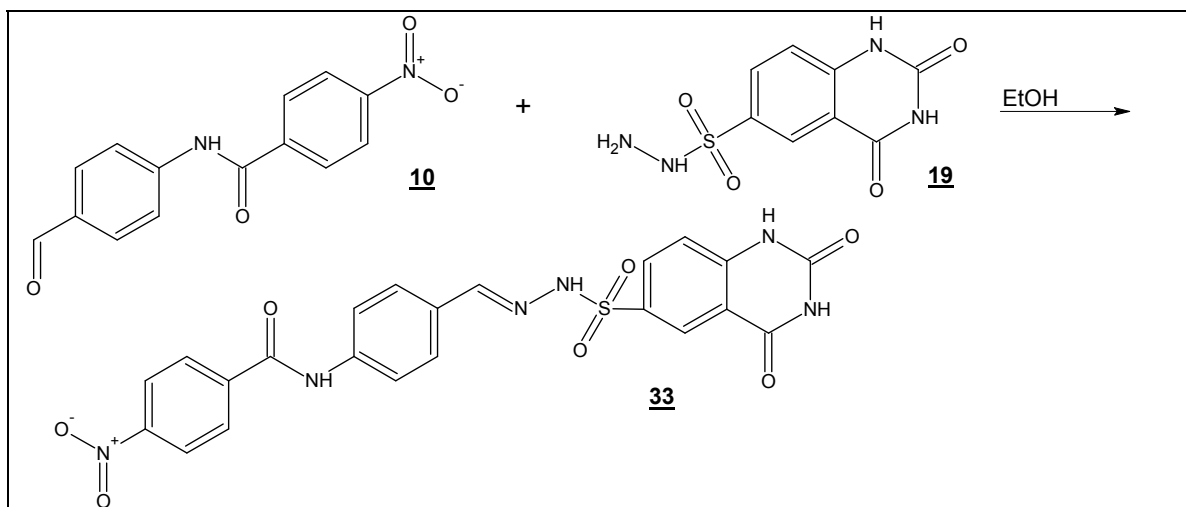
T_{tališča}: >300°C

M: 495,466 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 5.32 (s, 2H, Ar-CH₂), 6.99 (t, 1H, J=7.5 Hz, Ar-H), 7.13 (d, 1H, J=8.1 Hz, Ar-H), 7.31 (m, 1H, Ar-H), 7.38 (s, 1H, CH=N), 7.65 (m, 1H, Ar-H), 7.72 (d, 2H, J=8.8 Hz, Ar-H), 8.06 (m, 1H, Ar-H), 8.26 (m, 2H, Ar-H), 8.33 (s, 2H, Ar-H), 11.51 (3s, 3H, =N-NH-SO₂, CO-NH-CO-NH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 496 (MH⁺, 55), 259 (100)

4.3.8 Sinteza N-[4-({2-[(2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolinil)sulfonil]hidrazono}metil)fenil]-4-nitrobenzamida (**33**)



150,0 mg (0,555 mmol) N-(4-formilfenil)-4-nitrobenzamida (**10**) in 142,2 mg (0,555 mmol) 2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolinsulfonohidrazida (**19**) smo raztopili v 10 mL etanola. Reakcijsko zmes smo segrevali pri temperaturi vrenja preko noči. Naslednji dan smo s presesavanjem odfiltrirali nastalo rumeno suspenzijo.

Izkoristek: 93 %

Elementna sestava: C₂₄H₁₉N₅O₆S

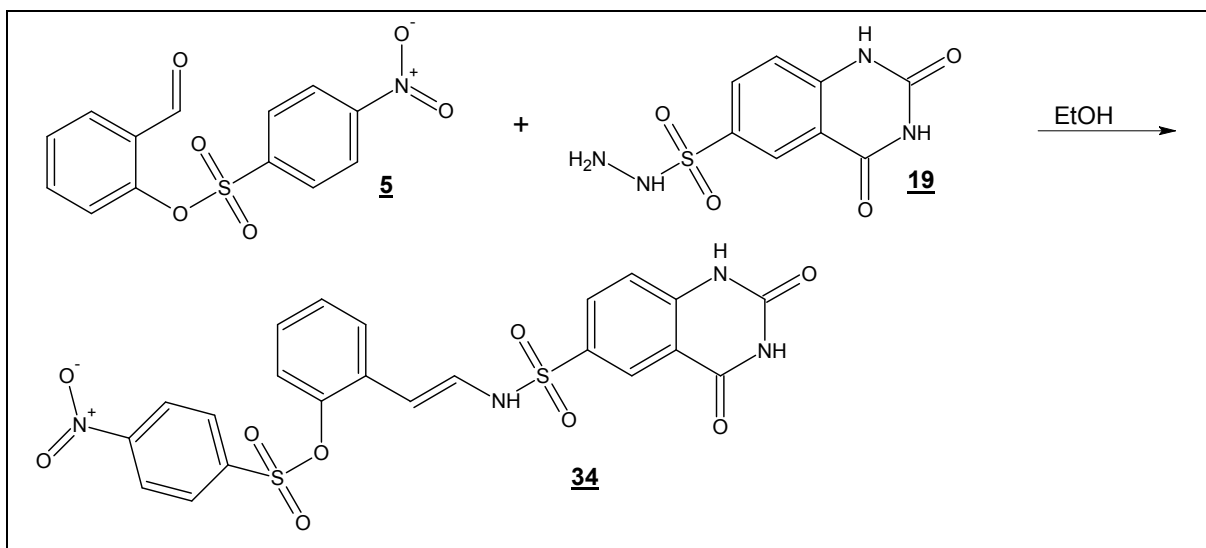
Rf (etilacetat/heksan=1/3): na startu

M: 505,504 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.33 (d, 1H, J=8.4 Hz, Ar-H), 7.58 (d, 2H, J=8.7 Hz, Ar-H), 7.83 (d, 2H, J=8.7 Hz, Ar-H), 7.90 (s, 1H, CH=N), 8.10 (m, 1H, Ar-H), 8.18 (d, 2H, J=8.9 Hz, Ar-H), 8.37 (m, 1H, Ar-H), 10.70 (s, 1H, CO-NH), 11.43 (s, 1H, =N-NH-SO₂), 11.54 (s, 2H, CO-NH-CO-NH) ppm.

MS (EI): m/z (%): 505 (M⁺, 27), 441 (100)

4.3.9 Sinteza 2-(2-((2,4-dioekso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolil)sulfonil)amino)etenil)fenil 4-nitrobenzensulfonata (**34**)



150,0 mg (0,488 mmol) 2-formilfenil 4-nitrobenzensulfonata (**5**) in 125,0 mg (0,488 mmol) 2,4-dioekso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolinsulfonohidrida (**19**) smo raztopili v 10 mL etanola. Reakcijsko zmes smo segrevali pri temperaturi vrenja preko noči. Naslednji dan smo odparili polovica topila pod znižanim tlakom, da pospešimo nastanek oborine, ter bučko pustili stati 24 ur pri sobni temperaturi. Nastalo oborino smo prefiltrirali s presesavanjem in sprali s hladnim etanolom.

Izkoristek: 86 %

Elementna sestava: C₂₁H₁₅N₅O₉S₂

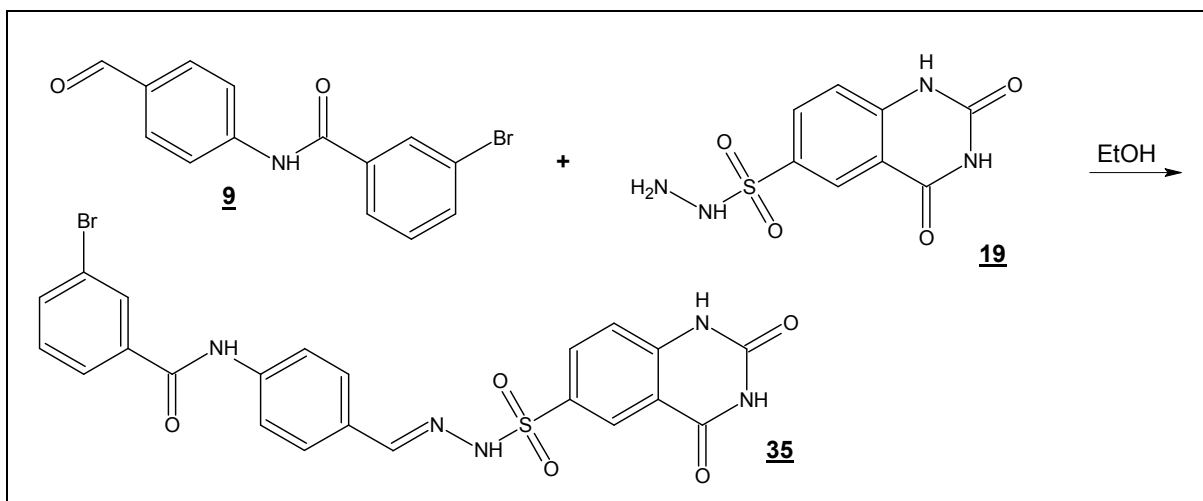
Rf (etilacetat): 0,80

T_{tališča}: 161-164 °C

M: 545,504 gmol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.25 (s, 1H, Ar-CH), 7.42 (d, J=8.3 Hz, 2H, Ar-H), 7.63 (s, 1H, Ar-CH), 7.74 (d, 2H, J=8.3 Hz, Ar-CH), 7.81 (d, 2H, J=8.4 Hz, Ar-H), 7.98 (m, 1H, Ar-H), 8.09 (m, 1H, Ar-H), 8.34 (m, 1H, Ar-H), 8.62 (m, 1H, CH=N), 11.54 (s, 2H, CO-NH-CO-NH), 11.67 (s, 1H, =N-NH-SO₂) ppm.

4.3.10 Sinteza 3-bromo-N-[4-({2-[(2,4-dioksa-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolil)sulfonil]hidrazono}metil)fenil]benzamid (35)



150,0 mg (0,304 mmol) 3-bromo-N-(4-formilfenil)benzamida (**9**) in 125,0 mg (0,304 mmol) 2,4-dioksa-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolinsulfonohidrazida (**19**) smo raztopili v 10 mL etanola. Reakcijsko zmes smo segrevali pri temperaturi vrenja preko noči. Po ohladitvi smo s presesavanjem odfiltrirali nastalo belo oborino.

Izkoristek: 90 %

Elementna sestava: C₂₂H₁₆BrN₅O₅S

Rf (etilacetat): 0,70

T_{tališča}: 251-254 °C

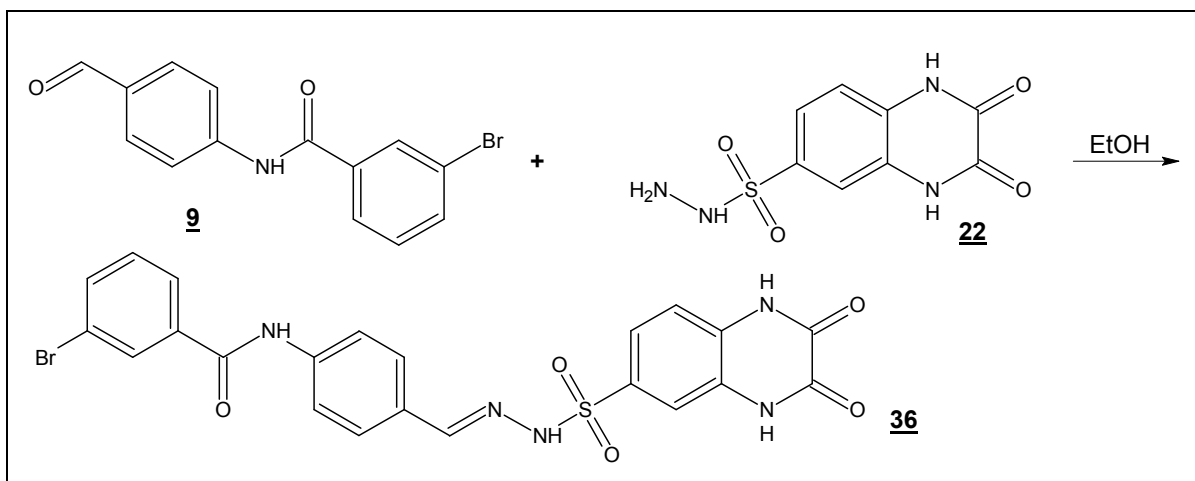
M: 542,363 gmol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.31 (m, 2H, Ar-CH), 7.53 (m, 1H, Ar-H), 7.85 (m, 3H, Ar-H), 7.97 (m, 3H, Ar-CH) 8.09 (m, 1H, Ar-H), 8.13 (m, 1H, CH=N), 8.35 (m, 1H, Ar-CH), 10.47 (s, 1H, CO-NH), 11.41 (s, 1H, =N-NH-SO₂), 11.53 (s, 2H, CO-NH-CO-NH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 505 (27), 489 (100)

IR (KBr): 3338, 3214, 3058, 2819, 2361, 1740, 1679, 1619, 1518, 1440, 1368, 1325, 1176, 1040, 956, 832, 713, 683, 584 cm⁻¹.

4.3.11 Sinteza 3-bromo-N-[4-((2-[(2,3-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinoksalinil) sulfonil]hidrazono)metil)fenil]benzamida (**36**)



150,0 mg (0,304 mmol) 3-bromo-N-(4-formilfenil)benzamida (**9**) in 125,0 mg (0,304 mmol) 2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinazolinsulfonohidrazida (**22**) smo raztopili v 10 mL etanola. Reakcijsko zmes smo segrevali pri temperaturi vrenja preko noči. Po ohladitvi smo s presesavanjem odfiltrirali nastalo rumeno oborino.

Izkoristek: 100 %

Elementna sestava: C₂₂H₁₆BrN₅O₅S

Rf (etilacetat): na startu

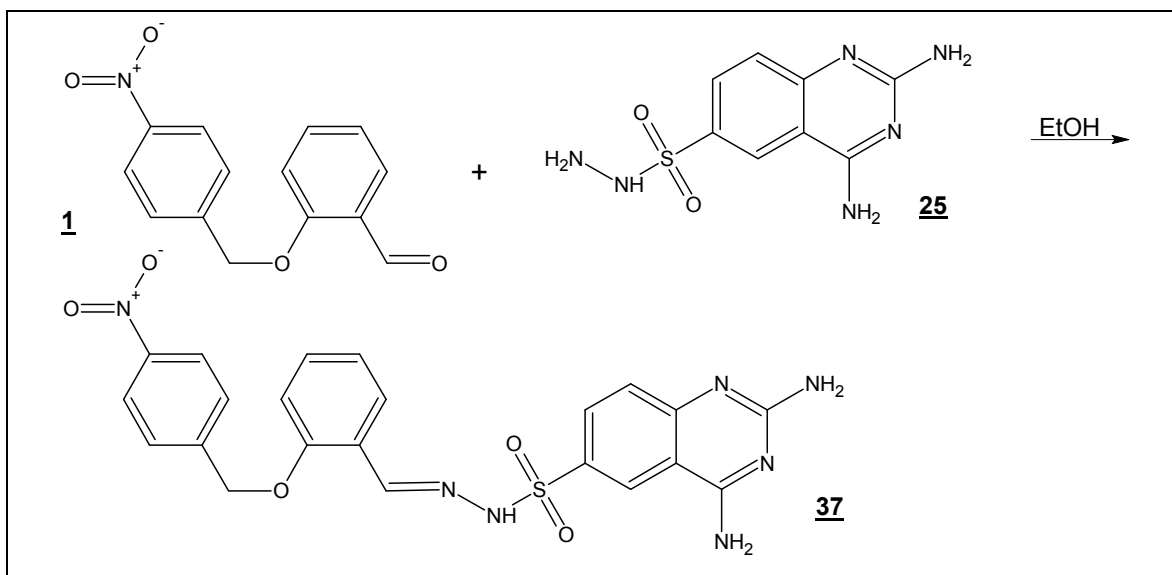
T_{tališča}: 260-263 °C

M: 542,363 gmol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 7.25 (d, 2H, J=8.4 Hz, Ar-CH), 7.55 (m, 4H, Ar-H), 7.90 (m, 5H, Ar-H), 8.15 (s, 1H, CH=N), 8.34 (s, 1H, CO-NH), 10.58 (s, 1H, =N-NH-SO₂), 12.13 (s, 2H, CO-NH-CO-NH) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 566 (MNa⁺, 62), 311 (100)

4.3.12 Sinteza 2,4-diamino-N'-({2-[(4-nitrobenzil)oksi]fenil}metiliden)-6-kinazolinsulfonohidrazida (**37**)



150,0 mg (0,583 mmol) 2-[(4-nitrobenzil)oksi]benzaldehyda (**1**) in 148,3 mg (0,583 mmol) 2,3-dioxi-1,2,3,4-tetrahidro-6-kinoksalinsulfonohidrazida (**25**) smo raztopili v 10 mL etanola. Reakcijsko zmes smo segrevali pri temperaturi vrenja preko noči. Po ohladitvi smo s presesavanjem odfiltrirali nastalo rumeno oborino.

Izkoristek: 25 %

Elementna sestava: C₂₂H₁₉N₇O₅S

Rf (etilacetat): 0,61

T_{tališča}: 191-194 °C

M: 493,496 g mol⁻¹

¹H NMR (300 MHz, DMSO-d₆): δ 5.31 (s, 2H, Ar-CH₂), 6.43 (s, 2H, NH₂), 6.97 (t, 1H, J=7.5 Hz, Ar-H), 7.11 (d, 1H, J=8.2 Hz, Ar-H), 7.24 (d, 1H, J=8.9 Hz, Ar-H), 7.36 (s, 2H, NH₂), 7.71 (m, 4H, Ar-H), 7.81 (m, 1H, Ar-H), 8.26 (d, 1H, J=8.8 Hz, Ar-H), 8.34 (s, 1H, CH=N) 8.60 (m, 1H, Ar-H), 11.67 (s, 1H, =N-NH-SO₂) ppm.

MS (ESI): m/z (%): 494 (MH⁺, 100)

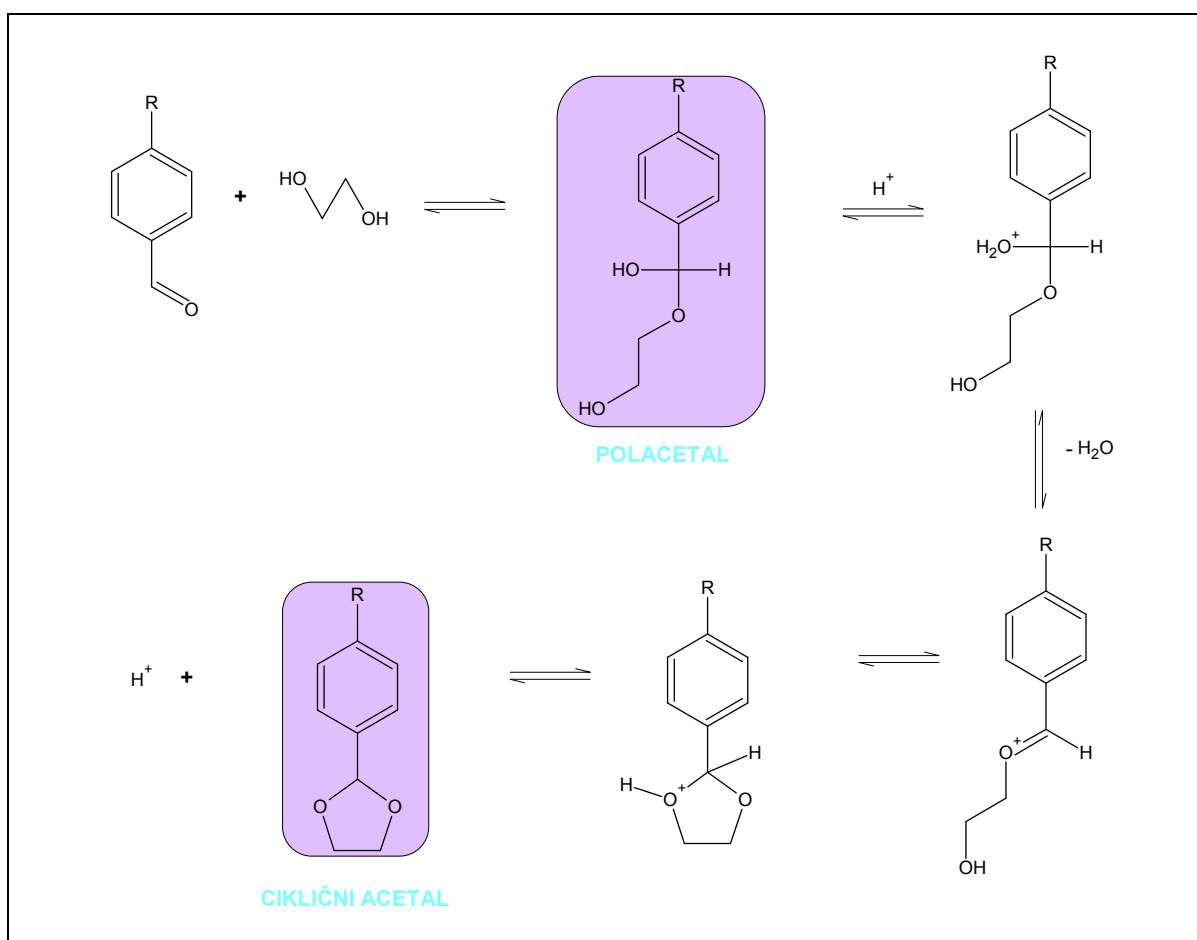
IR (KBr): 3510, 3470, 3346, 3411, 3345, 3137, 2361, 1733, 1668, 1603, 1564, 1445, 1344, 1253, 1171, 1133, 1054, 971, 905, 835, 697, 643, 598 cm⁻¹.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

V diplomski nalogi smo uspešno sintetizirali 12 končnih spojin, ki naj bi bili nizkomolekularni inhibitorji encima MurC. 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 aldehydne skupine 4-formilbenzojske kisline (2, 7)



Slika 13: Mehanizem nastanka cikličnega acetala

Aldehydno skupino smo zaščitili s pomočjo etilenglikola pri čemer je nastal ciklični acetal. Pri reakciji najprej poteče polarna adicija pri čemer nastane polacetal in sicer se OH skupina etilenglikola adira na karbonilno skupino. Nato sledi druga stopnja reakcije, ki je

kislinsko katalizirana, tu najprej poteče dehidracija in nato adicija druge OH skupine etilenglikola. Kot produkt reakcije nastane ciklični acetal (slika 13) (30,31).

Pri reakciji uporabimo katalizator *p*-toluensulfonsko kislino (PTSA), ki sproži potek reakcije. Poteče ravnotežna reakcija, ki jo želimo pomakniti v smer nastajanja produkta, zato uporabimo molekularna sita, ki vežejo nastalo vodo pri reakciji. Po poteku reakcije smo molekularna sita odfiltrirali in matičnici, ki vsebuje naš produkt dodali 10 % vodno raztopino citronske kisline, s čimer smo odstranili prebitek PTSA in etilenglikola. V vodni fazi je ostalo tudi nekaj našega produkta, zato smo izvedeli reekstrakcijo z organskima topiloma etilacetatom in heksanom.

5.1.2 Odstranitev zaščite z aldehidne skupine (4)

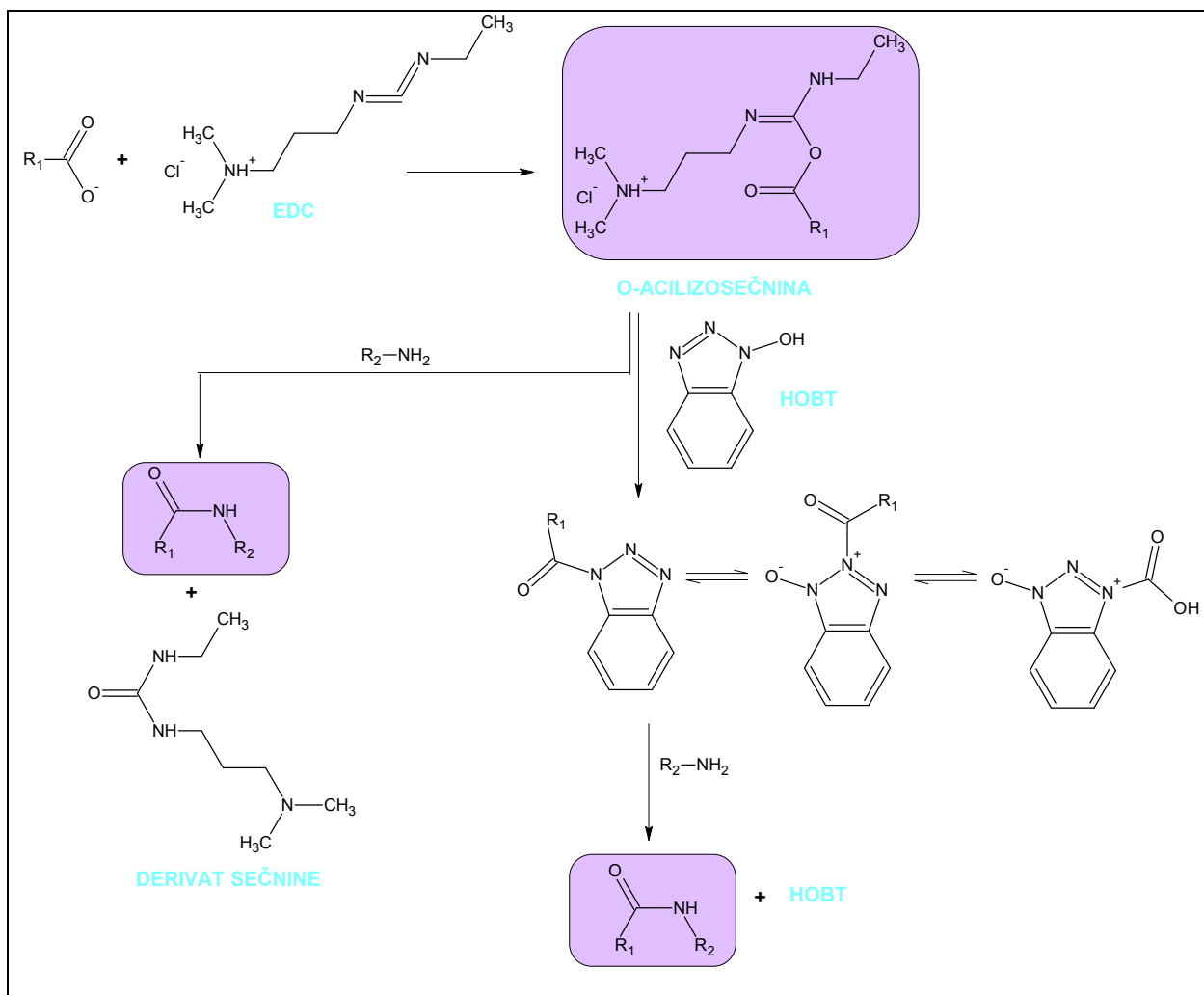
Nastalo zaščito v obliki 1,3-dioksolana smo odstranili v kislem mediju. Reakcijo smo izvedli tako, da smo substrat raztopili v metanojski kislini in dodali kapljico prečiščene vode, ki je potrebna, da poteče proces hidrolize. Reakcija je potekla po istem mehanizmu le v obratni smeri kot nastanek polacetalov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

5.1.3 Tvorba amidne vezi (3)

Karbodiimidna metoda spada med najpogostejše metode za tvorbo amidne vezi. Tu se amidna vez tvori z uporabo 1-hidroksibenzotriazol hidrata (HOBT) in 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimida (EDC). Poteče nukleofilna substitucija na karbonilnem C-atomu. Primarna aminska skupina reagenta kot nukleofil napade elektrofilni C-atom karboksilne kisline, nato pa pride do izstopa OH⁻ skupine karboksilne kisline.

EDC je reagent, odgovoren za aktivacijo karboksilne kisline (pride do tvorbe aktiviranega estra), ki sama po sebi ni dovolj reaktivna za reakcijo z amini. Z nastankom aktiviranega estra se poveča elektrofilnost karbonilnega C-atoma in s tem olajša nukleofilni napad, hkrati pa olajša izstop OH skupine. Nastali karboksilatni anion se veže na protoniran karbodiimid in nastane zelo reaktivna O-acilizosečnina. Ta reagira z aminsko skupino, pri čemer nastaneta peptid ter derivat sečnine.

Reakcijski zmesi dodamo tudi HOBT, da zmanjša nastanek stranskih produktov (N-acilsečnine) s premestitvijo acilne skupine iz O na N. Ta reagent z O-acilizosečnino tvori aktivirane benzotriazolne estre, pri katerih poteče aminoliza veliko hitreje (slika 14). HOBT tako prepreči oziroma zmanjša obseg neželenih premestitev, ciklizacij, racemizacij in tvorbe simetričnih anhidridov, s čimer poveča izkoristek reakcije (32).



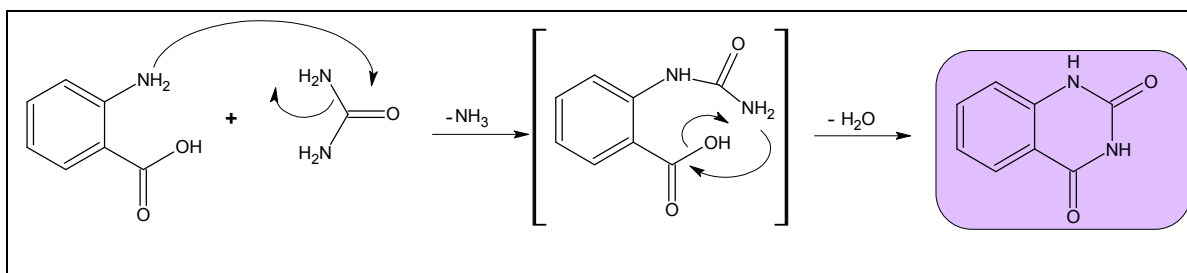
Slika 14: Mehanizem tvorbe peptidne vezi z uporabo EDC in HOBT

Amidno vez smo s karbodiimidno metodo pripravili v spojini **3**. Pri reakciji smo izhajali iz spojine **2**, ki ima aldehydno skupino zaščiteno v obliki cikličnega acetala. Na odščiteno karboksilno skupino spojine **2** smo s pomočjo EDC in HOBT pripeli primarni amin. Spojino **2** smo najprej raztopili v diklorometanu, nato smo dodali enako množino reagentov EDC in HOBT, ter trietilamin. Trietilamin ima vlogo baze, ki je potrebna za pretvorbo karboksilne skupine v karboksilatni anion. Pred izolacijo spojine, smo po 24

5.1.5 Sinteza kinazolin-2,4(1H, 3H)-diona (17)

Kondenzacija (adicija s sledečo eliminacijo) kinazolin-2,4(1H, 3H)-diona iz 2-aminobenzojske kisline in sečnine poteka pri povišani temperaturi. Pri tem NH_2 skupina 2-aminobenzojske kisline kot nukleofil napade elektrofilni C-atom sečnine, temu sledi izstop NH_2 skupine. Prosta NH_2 skupina acikličnega ureida nato napade karbonylni C-atom, poteče intramolekularna ciklizacija z izstopom molekule vode (slika 16).

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. Sol se tvori med kislom amidno vezjo (NH-CO) v heterociklu in med dodanimi hidroksilnimi ioni (OH^-) baze. Po nakisanju z 1M HCl je izpadla oborina, ki smo jo prekrystalizirali iz metanola in vode.

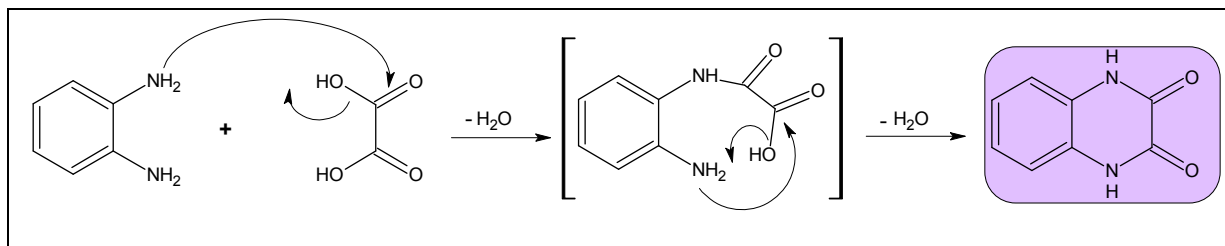


Slika 16: Mehanizem nastanka kinazolin-2,4(1H, 3H)-diona

5.1.6 Sinteza 1,4-dihidro-2,3-kinoksalindiona (20)

Kondenzacija (adicija s sledečo eliminacijo) 1,4-dihidro-2,3-kinoksalindiona iz 2-aminofenilamina in oksalne kisline poteka pri povišani temperaturi. Pri tem NH_2 skupina 2-aminofenilamina kot nukleofil napade elektrofilen C-atom oksalne kisline, temu sledi izstop OH skupine. Prosta NH_2 skupina nastalega intermediata nato napade karbonylni C-atom, poteče intramolekularna ciklizacija z izstopom molekule vode (slika 17).

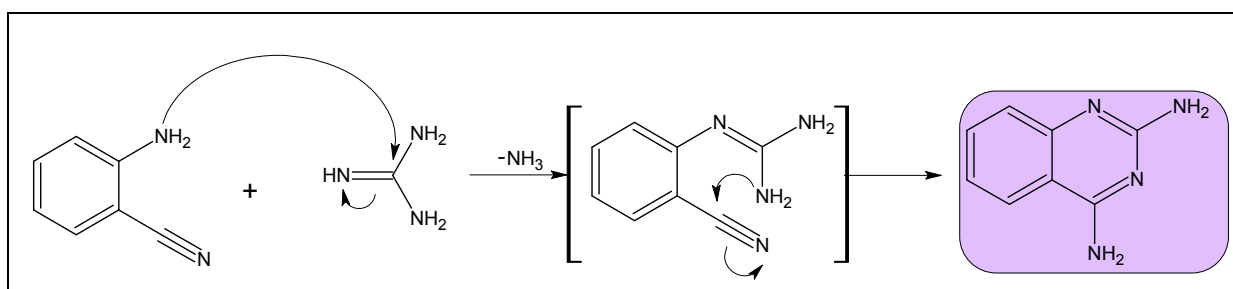
Po poteku reakcije smo zmesi dodali vodo in reakcijsko bučko postavili v hladilnik. Izpadla je oborina, ki smo jo odfiltrirali.



Slika 17: Mehanizem nastanka 1,4-dihidro-2,3-kinoksalindiona

5.1.7. Sinteza 2,4-kinazolindiamina (23)

V prvi stopnji smo najprej *in situ* pripravili natrijev etilat, tako da smo v absolutni etanol dodajali na koščke narezan natrij. Ker je reakcija zelo eksotermna, jo izvedemo na ledeni kopeli. Ko ves natrij zreagira z absolutnim etanolom (etanol mora biti brezvoden saj Na z vodo eksplozivno reagira) dodamo gvanidinijev klorid. Natrijev etilat je zelo močna baza, ki odcepi HCl od gvanidina, tako da dobimo prosti gvanidin in sol NaCl. Iz nastale reakcijske zmesi odfiltriramo gvanidin in ga na koncu prekrizalziramo iz etanola. Izoliranemu gvanidinu dodamo 2-aminobenzonitril in reakcijsko bučko opremimo z vodnim povratnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko. Kondenzacija (adicija s sledečo eliminacijo) poteka pri povišani temperaturi. Pri tem NH_2 skupina 2-aminofenilamina napade elektrofilen C-atom gvanidina, temu sledi izstop NH_2 skupine. Prosta NH_2 skupina nastalega intermediata nato napade C-atom CN skupine, poteče intramolekularna ciklizacija (slika 18).



Slika 18: Mehanizem nastanka 2,4-kinazolindiamina

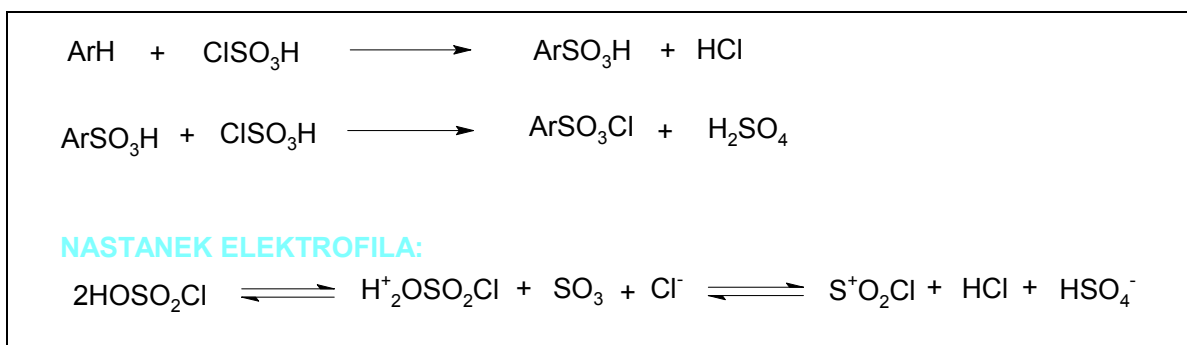
5.1.8 Priprava aromatskih sulfonohidrazidov (13, 16, 22, 19, 25)

V prvi stopnji smo sintetizirali aromatske sulfonilkloride. Spojine 12, 15, 18 in 21 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 množinski 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 19).

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 pri temperaturah, ki so nižja od vrelišča 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.

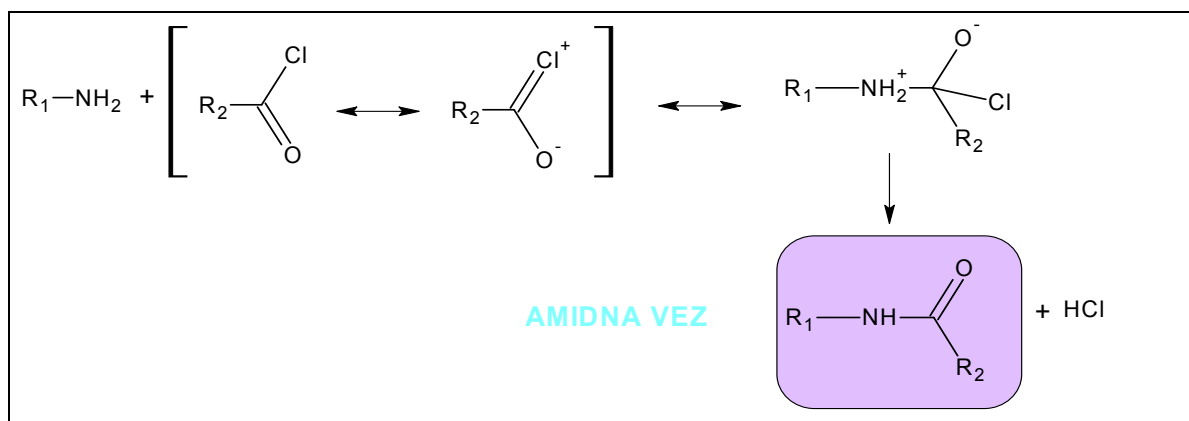
Po poteku reakcije smo dobro ohlajeno vsebino bučke zlili na led in tako izolirali spojine **12**, **15**, **18**, **21**. Pri tem smo prebitno klorsulfonsko kislino hidrolizirali z vodo v žveplovo (VI) kislino in HCl, sproščena toplota pa se je porabila za taljenje ledu. Če bi se temperatura zmesi dvignila, bi sulfonilklorid hidroliziral do sulfonske kisline.



Slika 19: Klorosulfoniranje aromatskega obroča in nastanek elektrofila

V drugi stopnji smo sintetizirali aromatske sulfonohidrazide. 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 po mehanizmu nukleofilne substitucije.

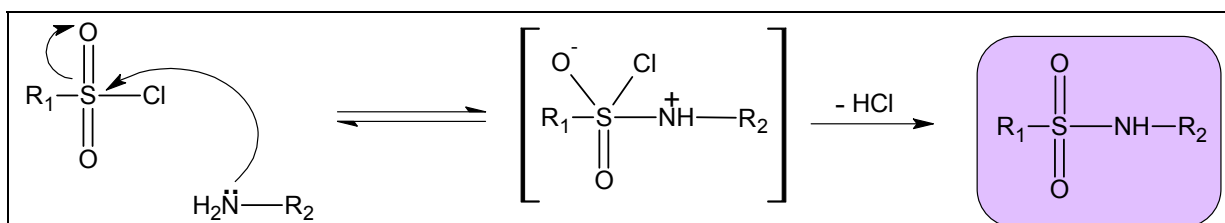
5.1.9 Pripenjanje različnih substituentov na prosto aminske skupino (6, 9, 10)



Slika 20: Mehanizem nastanka amidne vezi med aminom in kislinskim kloridom

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 pri spojinah 9 in 10. Reakcijo poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije. Nukleofilna NH_2 skupina s prostim elektronskim parom napade elektrofilen C-atom. Nato sledi izstop dobro izstopajoče skupine, v našem primeru klorida (slika 20).

Pripenjanje sulfonilklorida, ki smo ga izvedli pri sintezi spojine 6, prav tako poteka po mehanizmu nukleofilne substitucije (slika 21).



Slika 21: Mehanizem nastanka sulfonamidne vezi med aminom in sulfonilkloridom

5.1.10 Pripenjanje sulfonohidrazidov (26- 37)

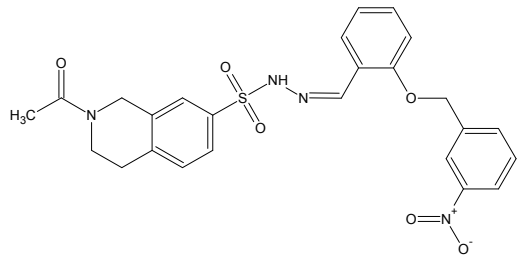
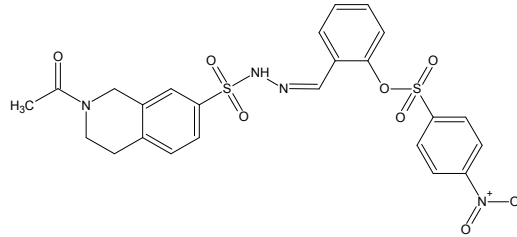
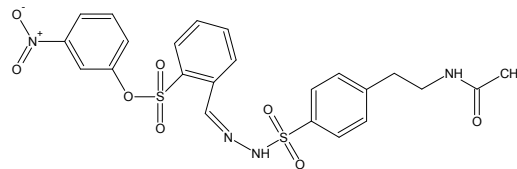
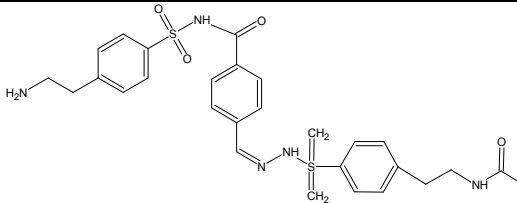
Ta reakcija predstavlja zadnjo stopnjo v sinteznem postopku naših spojin. Gre za reakcijo med aminske skupino sulfonohidrazidov in prosto aldehidno skupino večih različnih spojin. Poteče adicija primarne amino skupine na prosto karbonilno skupino s sledečo eliminacijo vode. K reagentom smo dodali absolutni etanol, ki je predstavljal dobre pogoje za izvedbo reakcije, saj je v večini primerov po koncu reakcije izpadla oborina, ki

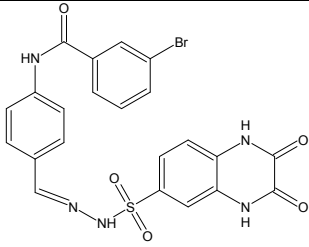
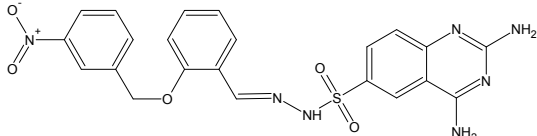
smo jo odfiltrirali s presesavanjem. Tako smo pripravili spojine **26**, **27**, **28**, **29**, **30**, **31**, **32**, **33**, **34**, **35**, **36** in **37**.

5.2 Rezultati biokemičnega testiranja spojin

Del sintetiziranih končnih spojin smo biokemijsko ovrednotili na encim MurC . Rezultati so zbrani v preglednici VIII.

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

Oznaka spojine	Struktura	Mm (g mol^{-1})	Konc. (μM)	RA% MurC
26		508,547		Se ne topi v DMSO
27		558,586		Se ne topi v DMSO
28		546,575	500	89
30		571,671	500	56 precipitacija

36		542,363		Se ne topi v DMSO
37		493,496	500	71 precipitacija

Preglednica VI: Rezultati testiranja inhibitorne aktivnosti na encim MurC

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 inhibitorni učinkovitosti novih spojin. Metoda z malahitnim zelenim poteka z določevanjem fosfata, ki nastane pri reakciji katalizirani z encimom. Manjša kot je RA, v večji meri inhibitor pri dani koncentraciji upočasnjuje 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.

Spojini **30** in **37** sta interagirali s testom (interakcije so lahko potekle s fosfatom ali z malahitnim zelenim) med njegovim izvajanjem, zato RA vrednosti nismo mogli določiti. 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. Spojinam **26**, **27** in **36** nismo mogli določiti RA vrednosti, ker niso bile topne v različnih topilah med njimi tudi ne v topilu DMSO. Spojina **28** ima RA vrednost v mejah eksperimentalne napake (preglednica VI).

Najbolj aktivna spojina, ki smo jo sintetizirali, je bila **30** (RA= 56 % pri 500 μ M), ki je do neke mere upočasnila delovanje encima MurC, vendar pa so tu potekle interakcije s testom. Določeno učinkovitost v manjši meri je izkazala tudi spojina **37** (RA= 71 % pri 500 μ M) a je tudi ta spojina interagirala s testom. Če podrobneje pogledamo spojini **30** in **37** opazimo, da imata obe spojini prosto NH_2 skupino (spojina **30** ima vezano aminoetilno skupino na aromatu, spojina **37** ima vezani dve amino skupini na heterociklu). Posledično

lahko sklepamo, da NH_2 skupina vpliva na aktivnost samega inhibitorja, saj lahko tvori vodikove vezi v aktivnem mestu encima in sicer z aminokislinskimi preostanki. Poleg vrednosti rezidualne aktivnosti predstavlja pomemben podatek tudi koncentracija spojine, pri kateri spojina inhibira določen encim. $500 \mu\text{M}$ koncentracija je prevelika, zato ti dve spojini nista zanimivi za nadaljnje raziskave.

Spojinama **26** in **27** smo naftalenski obroč zamenjali z 1,2,3,4-tetrahidroizokinolinom z namenom povečanja polarnosti. Ker pa nobene spojine nismo mogli raztopiti, ne moremo sklepati, če je za inhibitorno aktivnost nujna naftalenska skupina ali je primerna tudi tetrahidroizokinolinska skupina in ne moremo reči ali je bila ta zamenjava smiselna. Obe spojini tudi vsebujeta NO_2 skupino vezano na para položaju na aromatu, kar tudi lahko vpliva na zmanjšanje topnosti.

6 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo si zastavili načrt, po katerem smo uspešno sintetizirali dvanajst končnih spojin. Za spojino vodnico smo vzeli naftalensulfonski fragment, ki smo ga zamenjali z različnimi polarnejšimi skupinami z namenom povečanja polarnosti oziroma učinkovitosti.

Postopki sinteze so vključevali reakcije zaščite reaktivne aldehydne skupine, tvorbo estra s pomočjo kislinskega klorida, tvorbo amidne vezi s karbodiimidno metodo, odstranitev zaščite aldehydne skupine, sintezo heterociklov, pripravo aromatskih sulfonilkloridov, sintezo hidrazidov in pripenjanje sulfonohidrazidov.

Z ustreznimi analiznimi postopki smo nato dokazali strukturno ustreznost in čistoto spojin in nekaterim od njih z encimsko metodo določili inhibitorno aktivnost na encim MurC.

Naš cilj je bil sintetizirati nove potencialne sulfonohidrazidne inhibitorje s povečano polarnostjo. Tako smo nepolaren naftalenski obroč zamenjali s polarnejšimi skupinami, s to zamenjavo smo pričakovali večjo topnost in posledično večjo učinkovitost. Pri biološkem testiranju se je pojavila dodatna težava, saj končne spojine niso bile topne v topilah. Zaradi tega nismo uspeli pripraviti ustreznih raztopin spojin **26**, **27**, **36**. Spojinama **30** in **37** tudi nismo mogli določiti RA vrednosti in sicer zaradi interakcij s testom. Spojina **28** ima RA vrednost v mejah eksperimentalne napake. Zaradi naštetih težav, ki so se pojavile pri biološkem testiranju, ne moremo dejansko ovrednotiti učinkovitosti sintetiziranih spojin kot novih potencialnih sulfonohidrazidnih inhibitorjev.

LITERATURA

1. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry 5th Ed, Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, 2002: 819-864.
2. Green DW: The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin Ther Targets* 2002; 6: 1-19.
3. Wong CH, Ritter TK: Carbohydrate-Based Antibiotics: A New Approach to Tackling the Problem of Resistance. *Angew Chem Int Ed* 2001; 40, 3508-33.
4. Yoneyama H, Katsumata R: Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development, *Biosci Biotechol Biochem* 2006; 70: 1060-1075
5. Goodman & Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics 10th Ed, The McGrawHill Companies, New York, 2001: 1143-1146.
6. Setti EL, Micetich RG: New Trends in Antimicrobial Development. *Current Medicinal Chemistry*, 1998; 5: 101-113.
7. Gobec S, Urleb U: Inhibitorji sinteze peptidoglikana. *Farm. vestn.*, 1999; 50: 183-193
8. Vollmer W, Blanot D: Peptidoglycane structure and architecture, *Microbiological review*, 2007, 1-19
9. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis, *FEMS Microbiol Rev* II 2008:1-40
10. Scheffers DJ, Pinho GM: Bacterial Cell Wall Synthesis: New insights from Localization Studies, *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; 69: 585-607
11. Van Heijenoort J: Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat. Prod. Rep.*, 2001; 18: 503-519.
12. Katz A, Caufield C: Structure-Based Design Approaches to Cell Wall Biosynthesis Inhibitors. *Current Pharmaceutical Design*, 2003; 9: 857-866
13. Zoeiby AE, Sanachagrin F, Levesque RC: Structure and function of Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol Microbiol* 2003; 47: 1-12
14. Smith CA: Structure, Function and Dynamics in the mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases, *J Mol Biol* 2006; 362: 640-655
15. Hammond SM, Lambert PA, Rycroft AN: The Bacterial Cell Surface, Croom Helm, London & Sydney, Kapitan Szabo publishers. Washington, DC, 1984: 1-28

16. Mol CD, Brooun A, Dougan DR, Higers MT, Tari WL, Wijnands RA, Knuth MW, McRee DE, Swanson RV: Crystal structures of active fully assembled substrate- and product-bound complexes of UDP-N-Acetylmuramic acid:L-alanine ligase (MurC) from *Haemophilus influenzae*. *The Journal of Bacteriology* 2003; 185: 4152-4162
17. Katz AH, Caufield CE: Structure-Based Design Approaches to Cell Wall Biosynthesis Inhibitors, *Current Pharmaceutical Design* 2003; 9: 857-66
18. Clifford D. Mol, Alexei B., Douglas R. D. Et al: Chrystal Structures of Active Fully Assembled Substrate and Product-Bound Complexes of UDP-*N* Acetylmuramic Acid: L-Alanine Ligase (MurC) from *Haemophilus influenzae*. *J. Bacteriol.* 2003; 185: 4152-4162
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. Silver LL: Novel inhibitors of bacterial cell wall synthesis. *Current Opinion in Microbiology* 2003; 6: 431-8.
21. Chen D, Rosenow C, Wang W, Aftab D, Trias J, Zhou J, Patel DV, White RJ, Yuan Z: Pathway screening: Novel technology for identifying inhibitors of MurA-F in a single incubation. Versicor, Inc., Fremont, 1998, F-160
22. Mui Mui Sim, Siew Bee Ng, Buss AD, Crasta SC, Kah Lin Goh, Sue Kim Lee: Benzylidene Rhodanines as novel inhibitors of UDP-N-acetylmuramate/L-alanine ligase. *Bioorg Med Chem Lett* 2002; 12: 697-699
23. Ehmman DE, Demeritt JE, Hull KG, Fisher SL: Biochemical characterization of an inhibitor of *Escherichia Coli* UDP-N-acetilmuramil-L-alanin ligase, *Biochim et Biophys Acta* 2004; 1698: 167-174
24. Zhong L, Gerardo D. F, William H, et al: 2-Phenyl-5,6-dihydro-2H-thieno(3,2-c)-3-ol Derivates as New Inhibitors of Bacterial Cell Wall Biosynthesis. *Bioorg. Med Chem. Lett* 13 2003; 2591-2594.
25. 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, *Mol* 2008; 13: 11-30
26. Alex H. F. Lee and Eric T. Kool: Novel Benzopyrimidines as Widened Analogues of DNA Bases, *J. Org. Chem.* 2005; 70: 132-140

27. Gerd Kaupp and M. Reza Naimi-Jamal: Quantitative Cascade Condensations between *o*-Phenylenediamines and 1,2-Dicarbonyl Compounds without Production of Wastes, *Eur. J. Org. Chem.* 2002;1368-1373
28. Soghra Khabnadideh, Didier Pez, Alexander Musso, Reto Brun, Luis M. Ruiz Perez, Dolores Gonzalez-Pacanowska and Ian H. Gilbert: Design, synthesis and evaluation of 2,4-diaminoquinazolines as inhibitors of trypanosomal and leishmanial dihydrofolate reductase, *Bioorg Med Chem Lett* 2005; 13: 2637-2649
29. Edward F. Elslager, Norman L. Colbry, John Davoll, Marland P. Hutt, Judith L. Johnson, and Leslie M Werbel: Folate Antagonists. 22. Antimalarial and Antibacterial Effects of 2,4-Diamino-6-quinazolinesulfonamides. *J Med Chem Lett* 1984; 27: 1740-1743
30. Tišler M: *Organska kemija*. Tretja, popravljena in dopolnjena izdaja, Državna založba slovenije, 1991: 210-213
31. Hanson JR: *Functional group chemistry*. The Royal Society of chemistry, 2001: 79-91
32. Sewald N, Jakubke HD: *Peptides: Chemistry and Biology*. Wiley-VCH Verlag GmBH, Weinheim 2002:148-150, 184-205

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

DARJA MAVER

**SINTEZA SULFONHIDRAZIDNIH INHIBITORJEV LIGAZ MUR S POVEČANO
POLARNOSTJO**

**SYNTHESIS OF THE SULFONHYDRAZIDE MUR LIGAZES INHIBITORS WITH
ENHANCED POLARITY**

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom doc. dr. Aleša Obreza, mag. farm. Spektroskopske meritve so opravili na Institutu Jožef Stefan v Ljubljani, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani in Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Alešu Obrezu, mag. farm. za vso pomoč, vodenju pri izdelavi diplomske naloge in pridobljeno znanje. Za pomoč se najlepše zahvaljujem tudi sodelavcem Katedre za farmacevtsko kemijo.

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Aleša Obreza, mag. farm.

Darja Maver

**UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO**

DARJA MAVER

**DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE**

Ljubljana, 2009