

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO

KARMEN ROBNIK

**SINTEZA IN VREDNOTENJE REDUCIRANIH ANALOGO  
5-BENZILIDENTIAZOLIDIN-4-ONOV KOT POTENCIALNIH INHIBITORJEV  
LIGAZE MurD**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF REDUCED ANALOGUES OF  
5-BENZYLIDENTHIAZOLIDIN-4-ONES AS POTENTIAL INHIBITORS OF  
MurD LIGASE**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem izdelala na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm., in somentorstvom asist. Tihomirja Tomašiča, mag. farm. Spektroskopske in elementne analize so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo, Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo ter na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. In vitro testiranja na encimih Mur so opravili na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

### **Zahvala**

Ob tej priložnosti bi se rada zahvalila doc. dr. Luciji Peterlin Mašič, mag. farm., za posredovano strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomskega dela. Posebej velika zahvala gre asist. Tihomirju Tomašiču, mag. farm., za ves trud, potrpežljivost in strokovno pomoč ter za podarjeno znanje in izkušnje.

Najlepša hvala tudi vsem ostalim s Katedre za farmacevtsko kemijo, ki so mi med izdelavo diplomskega dela kakorkoli pomagali.

Na koncu pa bi se rada zahvalila še svoji družini in prijateljem, ki so mi v času študija stali ob strani in mi nudili moralno podporo.

### **Izjava**

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelala sama, pod mentorstvom doc. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm., in somentorstvom asist. Tihomirja Tomašiča, mag. farm.

Karmen Robnik

Ljubljana, december 2009

Predsednica komisije: prof. dr. Mirjana Gašperlin

Član komisije: doc. dr. Iztok Grabnar

# VSEBINA

<b>POVZETEK</b> .....	8
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>SEZNAM OKRAJŠAV</b> .....	10
<b>1. UVOD</b> .....	12
<b>1.1. PROTIMIKROBNE UČINKOVINE</b> .....	12
<b>1.2. REZISTENCA BAKTERIJ NA PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE</b> .....	13
1.2.1. <i>MOŽNOST ŠIRJENJA REZISTENCE IN NJEN IZVOR</i> .....	13
1.2.2. <i>MEHANIZMI REZISTENCE NA PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE</i> .....	14
1.2.3. <i>ZMANJŠEVANJE RESISTENCE NA ANTIBIOTIKE</i> .....	14
<b>1.3. BAKTERIJSKA CELIČNA STENA</b> .....	15
1.3.1. <i>CELIČNA STENA PO GRAMU POZITIVNIH IN PO GRAMU NEGATIVNIH BAKTERIJ</i> .....	15
<b>1.4. PEPTIDOGLIKAN</b> .....	17
1.4.1. <i>ZGRADBA PEPTIDOGLIKANA</i> .....	17
1.4.2. <i>BIOSINTEZA PEPTIDOGLIKANA</i> .....	18
1.4.2.1. <i>SINTEZA PREKURZORJEV V CITOPLAZMI</i> .....	18
1.4.2.2. <i>KROG LIPIDNEGA NOSILCA</i> .....	20
1.4.2.3. <i>PREČNO POVEZOVANJE</i> .....	20
<b>1.5. LIGAZE MUR</b> .....	21
1.5.1. <i>Ligaza MurD</i> .....	23
1.5.2. <i>Ligaza MurE</i> .....	24
<b>1.6. INHIBITORJI LIGAZ MUR</b> .....	26
1.6.1. <i>INHIBITORJI LIGAZE MurD</i> .....	26
1.6.2. <i>INHIBITORJI LIGAZE MurE</i> .....	29
1.6.3. <i>DUALNI INHIBITORJI LIGAZ MurD IN MurE</i> .....	30
<b>2. NAMEN DELA</b> .....	31
<b>3. MATERIALI IN METODE</b> .....	33
<b>3.1. MATERIALI</b> .....	33
<b>3.2. METODE</b> .....	33
<b>4. EKSPERIMENTALNI DEL</b> .....	35

4.1.	REAKCIJSKE SHEME.....	35
4.2.	SPLOŠNI POSTOPKI.....	38
4.3.	SINTEZA SPOJIN S KRAJŠO VERIGO MED HETEROCIKLOM IN D-GLU.....	40
4.3.1.	Sinteza (R)-dimetil 2-aminopentandioata (01) .....	40
4.3.2.	Sinteza (Z)-5-(4-karboksibenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-ona (02) .....	40
4.3.3.	Sinteza (Z)-5-(3-karboksibenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-ona (03) .....	41
4.3.4.	Sinteza (R,Z)-dimetil 2-(4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-iliden)metil) benzamido) pentandioata (04) .....	42
4.3.5.	Sinteza (R,Z)-dimetil 2-(3-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-ilidene)metil)benzamido) pentandioata (05) .....	43
4.3.6.	Sinteza Hantzsch-evega ester (dietil 2,6-dimetil-1,4-dihidropiridin- 3,5-dikarboksilata)..	44
4.3.7.	Sinteza (2R)-dimetil 2-(4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)benzamido) pentandioata (07) .....	44
4.3.8.	Sinteza (2R)-dimetil 2-(3-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)benzamido) pentandioata (08) .....	46
4.3.9.	Sinteza (2R)-2-(4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)benzamido) pentanidijске kisline (09) .....	47
4.3.10.	Sinteza (2R)-2-(3-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)benzamido) pentanidijске kisline (10) .....	48
4.3.11.	Sinteza (R,Z)-dimetil 2-(3-((2,4-dioksotiazolidin-5-ilidene)metil)benzamido) pentandioata (11) .....	49
4.3.12.	Sinteza (R)-dimetil 2-((3-oksobenzil)-2,4-oksotiazolidindiona) aminopentandionata (12).....	50
4.3.13.	Sinteza (2R)-2-(3-((2,4-dioksotiazolidin-5-il)metil)benzamido) pentandijске kisline (13) .....	51
4.4.	SINTEZA SPOJIN Z DALJŠO VERIGO MED HETEROCIKLOM IN D-GLU.....	53
4.4.1.	Sinteza (Z)-5-(4-nitrobenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-ona (14) .....	53
4.4.2.	Sinteza (Z)-5-(3-nitrobenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-ona (15) .....	54
4.4.3.	Sinteza 5-(3-nitrobenzil)-2-tioksotiazolidin-4-ona (16).....	54
4.4.4.	Sinteza 5-(4-nitrobenzil)-2-tioksotiazolidin-4-ona (17) .....	55
4.4.5.	Sinteza 5-(3-aminobenzil)-2-tioksotiazolidin-4-ona (18) .....	56
4.4.6.	Sinteza 5-(4-aminobenzil)-2-tioksotiazolidin-4-ona (19) .....	57
4.4.6.	Sinteza 4-((3-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil) benzojske kisline (20) .....	58

4.4.7.	<i>Sinteza (2R)-dimetil 2-(4-((3-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil)benzamido)pentandioata (21)</i> .....	59
4.4.8.	<i>Sinteza (2R)-dimetil 2-(3-formilbenzamido)pentan-1,5-dioata (23)</i> .....	61
4.4.9.	<i>Sinteza (2R)-dimetil 2-(3-((4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil)benzamido)pentandioata (24)</i> .....	62
4.4.10.	<i>Sinteza (2R)-2-(4-((3-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil)benzamido)pentandiojske kisline (25)</i> .....	64
4.4.11.	<i>Sinteza (2R)-2-(3-((4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil)benzamido)pentandiojske kisline (26)</i> .....	65
4.4.12.	<i>Sinteza 5-(4-nitrobenziliden)tiazolidin-2,4-diona (27)</i> .....	66
4.4.13.	<i>Sinteza 5-(4-nitrobenzil)-2,4-tiazolidindion (28)</i> .....	67
4.4.14.	<i>Sinteza 5-(4-aminobenzil)tiazolidin-2,4-diona (29)</i> .....	68
4.4.15.	<i>Sinteza 4-((4-((2,4-dioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil) benzojske kisline (30)</i> ...	69
4.4.16.	<i>Sinteza (2R)-dimetil 2-(4-((4-((2,4-dioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil)benzamido)pentandioata (31)</i> .....	70
4.4.17.	<i>Sinteza (2R)-2-(4-((4-((2,4-dioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil)benzamido)pentandiojske kisline (32)</i> .....	72
<b>5.</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b> .....	<b>74</b>
5.1.	<b>SINTEZA NOVIH POTENCIALNIH INHIBITORJEV ENCIMOV MURD IN MURE S 5-BENZILTIAZOLIDIN-4-ONSKIM FRAGMENTOM</b> .....	<b>75</b>
5.1.1.	<i>Uvedba zaščitne skupine na D-glutaminsko kislino</i> .....	75
5.1.2.	<i>Knoevenagelova kondenzacija</i> .....	75
5.1.3.	<i>Redukcija dvojne vezi s Hantzsch-evim esterom</i> .....	76
5.1.4.	<i>Reducija nitro v amino skupino</i> .....	77
5.1.5.	<i>Tvorba amidne vezi z EDC/HOBt metodo</i> .....	77
5.1.6.	<i>Tvorba amidne vezi s TBTU</i> .....	78
5.1.7.	<i>Tvorba sekundarnih aminov z metodo reduktivnega aminiranja</i> .....	79
5.1.8.	<i>Alkalna hidroliza estra</i> .....	80
5.2.	<b>REZULTATI BIOLOŠKIH TESTIRANJ</b> .....	<b>80</b>
<b>6.</b>	<b>SKLEP</b> .....	<b>86</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATURA</b> .....	<b>87</b>

**KAZALO SLIK**

Slika 1: Glavna ciljna mesta delovanja antibiotikov.....	12
Slika 2: Biokemijski mehanizmi rezistence na protibakterjske učinkovine (številke so mehanizmi razloženi v besedilu).....	14
Slika 3: Primerjava celične stene G <sup>+</sup> (a) in G <sup>-</sup> (b) bakterij. ....	16
Slika 4: Zgradba N-acetilmuramil-N-acetilglukozamin-tetrapeptid monomera. ....	17
Slika 5: Prečne povezave peptidoglikanskih vlaken. ....	18
Slika 6: Sinteza UDP-N-acetilmuramilpentapeptida. ....	19
Slika 7: Shematski prikaz biosinteze peptidoglikana.....	21
Slika 8: 3D struktura Mur ligaz.....	22
Slika 9: Tvorba peptidne vezi preko tetraedričnega intermedata. ....	23
Slika 10: Reakcija, ki jo katalizira encim MurD. ....	23
Slika 11: Prostorski prikaz strukture MurD.....	24
Slika 12: Reakcija, ki jo katalizira encim MurE.....	25
Slika 13: Prostorski prikaz strukture MurE. ....	26
Slika 14: Fosfinatni inhibitorji encima MurD.....	26
Slika 15: Novejši fosfinatni inhibitorji encima MurD.....	27
Slika 16: Načrtovanje inhibitorjev encima MurD na osnovi poenostavitve substrata. ....	28
Slika 17: Stereoizomera novega N-sulfonamidnega inhibitorja encima MurD. ....	28
Slika 18: Predstavnik benzilidenrodaninskih inhibitorjev MurD.....	29
Slika 19: Peptidosulfonamidni inhibitor MurE. ....	29
Slika 20: Rodaninski inhibitor ligaze MurE. ....	30
Slika 21: Predstavnik dualnih inhibitorjev MurD in MurE.....	30
Slika 22: Struktura barvila malahitno zeleno.....	34
Slika 23: Mehanizem Knoevenagelove kondenzacije. ....	76
Slika 24: Sinteza amidne vezi z uporabo EDC in HOBt.....	78
Slika 25: Struktura TBTU.....	79
Slika 26: Mehanizem reduktivnega aminiranja.....	79
Slika 27: Alkalna hidroliza estra. ....	80
Slika 28: Kristalna struktura kompleksa MurD-inhibitor V.....	84
Slika 29: a) Superpozicija inhibitorja V (rumen) in R,R-izomera 26 (siv); b) Superpozicija inhibitorja V (rumen) in R,S-izomera 26 (zelen). ....	85

## KAZALO SHEM

Shema 1: <i>Sinteza reduciranih analogov 5-benzilidenrodaninov in 5-benzilidentiazolidin-2,4-dionov s krajšo verigo med heterociklom in D-Glu (spojine 09, 10 in 13)</i> .....	35
Shema 2: <i>Sinteza reduciranih analogov 5-benzilidenrodaninov in 5-benzilidentiazolidin-2,4-dionov z daljšo verigo med heterociklom in D-Glu (spojini 26 in 32)</i> .....	36
Shema 3: <i>Sinteza reduciranih analogov 5-benzilidenrodaninov z daljšo verigo med heterociklom in D-Glu (spojina 25)</i> .....	37

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: <i>Prikaz aktivnosti znanih 5-benzilidentiazolidin-4-onskih inhibitorjev ligaz MurD in MurE</i> .....	74
Preglednica II: <i>Rezultati bioloških testiranj potencialnih inhibitorjev na encimih MurD in MurE</i> .....	81
Preglednica III: <i>Primerjava aktivnosti 5-benzilidentiazolidin-4-onov in 5-benziltiazolidin-4-onov</i> .....	83

## POVZETEK

Hiter razvoj in širjenje odpornosti na protimikrobne učinkovine predstavljata danes resen problem pri zdravljenju mikrobnih infekcij. V bitki za preživetje je pomembno razvijati nove protibakterijske učinkovine in iskati nove tarče protibakterijskega delovanja. Pri tem je ključnega pomena dobro poznavanje biokemijskih procesov v celici mikroorganizmov. Peptidoglikan, ki je esencialna komponenta bakterijske celične stene, je pomembna tarča za načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin. Pri njegovi biosintezi sodelujejo tudi encimi iz družine ligaz Mur, ki predstavljajo novejšje in v veliki meri še neizkoriščene tarče za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. V družino teh encimov spadata tudi encim MurD (UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanin:D-glutamat ligaza), ki katalizira pripenjanje D-glutaminske kisline na UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanin in encim MurE (UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamat:*mezo*-diaminopimelat ali UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanil-D-glutamat:L-lizin ligaza), ki katalizira pripenjanje *mezo*-diaminopimelinske kisline ali L-lizina.

V okviru diplomske naloge smo na osnovi poznavanja odnosa med strukturo in delovanjem znanih inhibitorjev encimov MurD in MurE sintetizirali serijo šestih novih potencialnih inhibitorjev s 5-benziltiazolidin-2,4-dionskim in 5-benzil-2-tiooksotiazolidin-4-onskim ogrodjem, ki naj bi strukturno oponašali produkt encima MurD in substrat encima MurE ter na ta način inhibirali omenjena encima. Vse sintetizirane spojine smo tudi biokemijsko ovrednotili na encimu MurD in eno na encimu MurE, vendar nobena spojina ni izkazovala inhibitorne aktivnosti oziroma je bila ta zelo šibka. Cilj diplomske naloge je bil proučiti vpliv redukcije dvojne vezi pri benzilidenskih inhibitorjih ligaze MurD.

Dobljeni rezultati širijo znanje o načrtovanju, sintezi in povezavi med strukturo in delovanjem (SAR) inhibitorjev sinteze bakterijske celične stene.



## ABSTRACT

Today, the fast development and spreading of bacterial resistance to antimicrobial agents represents a serious problem in treating microbial infections. In the survival of the fittest man has to constantly develop new antibacterial drugs and search for new targets of antibacterial action. Good knowledge of biochemical processes in the bacterial cell is of crucial importance. Peptidoglycan, which is an essential component of bacterial cell wall, is the most appropriate target for the design of new antibacterial drugs. The synthesis of peptidoglycan is catalyzed by a family of enzymes, Mur ligases, which represent novel and still underexploited targets for development of new antimicrobial compounds.

We focused our research on two crucial enzymes, involved in intracellular steps of peptidoglycan biosynthesis, called UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate ligase (MurD), that catalyzes the addition of D-glutamic acid to UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanine, and UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate:meso-diaminopimelate or UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate:L-lysine ligase (MurE), that catalyzes the addition of meso-diaminopimelic acid or L-lysine to UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate.

Based on the known structures of previously reported MurD and MurE inhibitors, we synthesized a series of six new potential inhibitors with 5-benzylthiazolidin-2,4-dione and 5-benzyl-2-tioxothiazolidine-4-one scaffold, which were designed as MurD product and MurE substrate analogues.

All of the synthesized compounds were biochemically evaluated on MurD ligase, but unfortunately none of them showed significant inhibitory activity.

The results of our study broaden the knowledge about synthesis and structure-activity relationship (SAR) of inhibitors of bacterial cell wall synthesis.

## SEZNAM OKRAJŠAV

<b>δ</b>	kemijski premik
<b>Ac</b>	acetyl
<b>ADP</b>	adenozindifosfat
<b>AMP</b>	adenozinmonofosfat
<b>Ar</b>	aromatski
<b>ATP</b>	adenozintrifosfat
<b>d</b>	dublet
<b>dd</b>	dublet dubleta
<b>Ddl</b>	D-alanil-D-alanin ligaza
<b>DKM</b>	diklorometan
<b>DMSO</b>	dimetilsulfoksid
<b>DNK</b>	deoksiribonukleinska kislina
<b>EDC</b>	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
<b>EI</b>	elektronska ionizacija
<b>ESI</b>	elektrosprej ionizacija
<b>FAD</b>	flavin-adenin-dinukleotid
<b>G -</b>	po Gramu negativen
<b>G +</b>	po Gramu pozitiven
<b>GlcNAc</b>	<i>N</i> -acetilglukozamin
<b>GlmU</b>	<i>N</i> -acetilglukozamin-1-fosfat- uridiltransferaza
<b>HOBt</b>	1-hidroksibenzotriazol
<b>IC<sub>50</sub></b>	koncentracija inhibitorja, ki zmanjša aktivnost encima za polovico
<b>IR</b>	infrardeča spektroskopija
<b><i>J</i></b>	sklopitvena konstanta
<b>Lipid I</b>	MurNAc-(pentapeptid) pirofosforil undekaprenol
<b>Lipid II</b>	GlcNAc-MurNAc-(pentapeptid)-pirofosforil undekaprenol
<b>M</b>	molarost (mol/L)
<b>m</b>	multiplet
<b>Me</b>	metilna skupina

<b>mezo-A2pm</b>	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
<b>MF</b>	mobilna faza
<b>MIK</b>	minimalna inhibitorna koncentracija
<b>MraY</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-pentapeptid fosfotransferaza
<b>MRSA</b>	na meticilin odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>MS</b>	masna spektrometrija
<b>MurA</b>	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruviltransferaza
<b>MurB</b>	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza
<b>MurC</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat-alanin ligaza
<b>MurD</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat ligaza
<b>MurE</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat- <i>mezo</i> -diaminopimelat ligaza
<b>MurF</b>	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat- <i>mezodiaminopimelat</i> - D-Alanin-D-Alanin ligaza
<b>MurNAc</b>	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
<b>mw</b>	mikrovalovi
<b>NADP+</b>	nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat
<b>NMM</b>	<i>N</i> -metilmorfolin
<b>NMR</b>	jedrska magnetna resonanca
<b>P<sub>i</sub></b>	pirofosfat
<b>PRSP</b>	na penicilin rezistenten <i>Streptococcus pneumoniae</i>
<b>q</b>	kvartet
<b>R<sub>f</sub></b>	retencijski faktor
<b>s</b>	singlet
<b>SF</b>	stacionarna faza
<b>t</b>	triplet
<b>TBTU</b>	N,N,N',N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)-uronijev tetrafluoroborat
<b>THF</b>	tetrahidrofuran
<b>TPK</b>	tankoplastna kromatografija
<b>TMS</b>	tetrametilsilan
<b>UDP</b>	uridindifosfat
<b>UMA</b>	UDP- <i>N</i> -acetil-muramoil-L-alanin
<b>UMAG</b>	UDP- <i>N</i> -acetil-muramoil-L-alanin-D-glutaminska kislina

# 1. UVOD

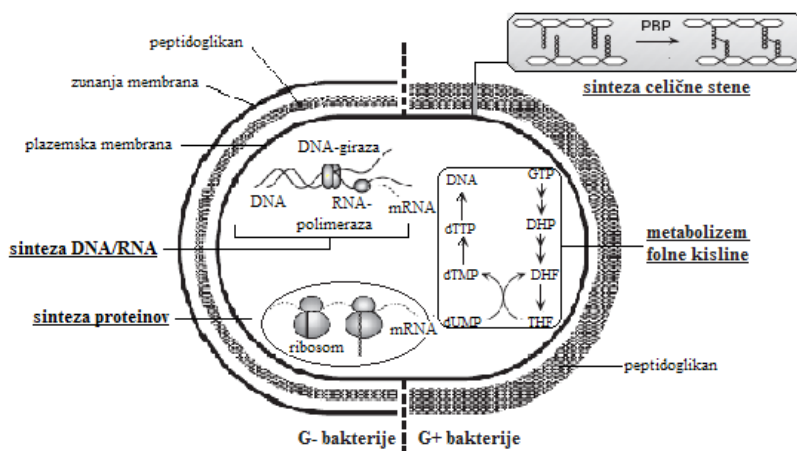
## 1.1. PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

Protimikrobne učinkovine so spojine naravnega ali sinteznega izvora z bakteriostatičnim ali baktericidnim delovanjem, ki zavirajo rast patogenih organizmov, medtem ko gostitelju ne povzročajo škode. Značilnost protimikrobnih učinkovin je, da deluje po principu selektivne toksičnosti. To pomeni, da je zmožen ubiti ali prizadeti tuj organizem, ki vdre v telo, ne da bi prizadel gostujoči organizem. Mehanizmi delovanja antibiotikov izkoriščajo biokemične razlike med bakterijo in gostujočim organizmom (1).

Antibiotiki so sekundarni metaboliti več vrst mikroorganizmov, ki v majhnih količinah inhibirajo rast mikroorganizmov. V širšem pomenu mednje štejemo tudi polysintezne derivate učinkovin naravnega izvora. Sintezno pridobljene sulfonamide in 4-kinolone, uvrščamo med kemoterapevtike. S kemično modifikacijo naravnih antibiotikov lahko razširimo spekter delovanja, povečamo stabilnost in učinkovitost, zmanjšamo toksičnost in izboljšamo farmakokinetične lastnosti (2, 3).

Glede na mehanizem delovanja protimikrobne učinkovine razdelimo na (*Slika 1*):

- inhibitorje biosinteze bakterijske celične stene ( $\beta$ -laktamski in glikopeptidni antibiotiki itd.),
- inhibitorje biosinteze proteinov (aminoglikozidni in makrolidni antibiotiki, tetraciklini, kloramfenikol),
- inhibitorje sinteze nukleinske kisline (sulfonamidi, trimetoprim, kinoloni),
- antibiotike s vplivom na funkcijo celične membrane (polimiksini) (1, 2).



**Slika 1:** Glavna ciljna mesta delovanja antibiotikov.

## 1.2. REZISTENCA BAKTERIJ NA PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE

V štiridesetih letih 20. stoletja je z razvojem številnih protibakterijskih učinkovin prišlo do revolucije na področju zdravljenja bakterijskih infekcij, ki je dramatično zmanjšala umrljivost zaradi okužb z bakterijami. Vendar pa se je v skladu z načelom evolucije, da se organizmi genetsko prilagajajo na spremembe v okolju, pojavila tudi odpornost mikroorganizmov na protimikrobne učinkovine (1).

Odpornost ali rezistenca je sposobnost mikroorganizmov, da v prisotnosti antibiotika preživijo oz. se še naprej razmnožujejo. Rezistenca je lahko intrinzična (naravna) ali ekstrinzična (pridobljena). Naravna odpornost je navadno specifična za določeno vrsto ali rod bakterij in odraža genetsko, strukturno ter fiziološko stanje bakterij (npr. bakterija nima prijemašča za določen antibiotik in je zato nanj odporna). Pridobljena odpornost pa je posledica prevelike in napačne rabe antibiotikov, prevelikih odmerkov, nesmotrne uporabe širokospektralnih antibiotikov in pomanjkljive bolnišnične higijene. Navadno je na začetku prisotna le pri nekaterih sevih znotraj vrste, ki so bili podvrženi selektivnim pritiskom, kasneje pa se širi z bakterije na bakterijo, lahko tudi s prenosom bakterij med ljudmi. Izraža se kot mutacija na različnih genih ter kot izguba ali pridobitev genetskih informacij. Rezistenca bakterij na toksične učinke protimikrobnih učinkovin se z lahkoto razvija tako v laboratorijih kot na klinikah in predstavlja naraščajočo nevarnost za zdravje ljudi (2).

### 1.2.1. MOŽNOST ŠIRJENJA REZISTENCE IN NJEN IZVOR

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

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

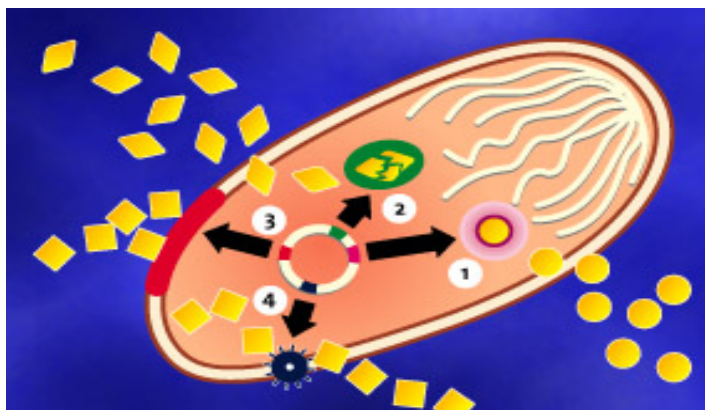
Rezistenco lahko razdelimo tudi glede na izvor, pri čemer ločimo genetsko in negenetsko obliko. Spremembe v genomu bakterije lahko potekajo na kromosomu mikroba in jih imenujemo mutacije (delecije, insercije, inverzije, duplikacije), lahko pa se spremembe pojavijo na izvenkromosomskih determinantah v obliki plazmidov ali transpozonov (4). Prenos genetskega materiala, tj. rezistentnih genov, med bakterijami poteka s procesom, ki

ga imenujemo rekombinacija in zajema tri različne načine prenosa: transformacijo (direktno privzetje bakteriji tuje DNK), transdukcijo (prenos s pomočjo vektorjev, največkrat bakteriofagov) in konjugacijo (prenos DNK preko spolnega pilusa) (1, 2, 5).

### 1.2.2. MEHANIZMI REZISTENCE NA PROTIBAKTERIJSKE UČINKOVINE

Na nivoju biokemijskih mehanizmov je razvoj rezistence posledica:

- tvorbe encimov, ki hidrolizirajo (*Slika 2*; mehanizem 1) ali spremenijo (*Slika 2*; mehanizem 2) antibiotik ( $\beta$ -laktamaze inaktivirajo peniciline, acetiltransferaze kloramfenikol, fosforilaze aminoglikozide ),
- spremembe encima, ki ga protimikrobna učinkovina inhibira (npr.: posledica spremembe dihidrofolat reduktaze je izguba afinitete do trimetoprima),
- zmanjšane vnosa antibiotika v celico (posledica inhibicije tvorbe porinov je zmanjšan vnos hidrofilnih antibiotikov) (*Slika 2*; mehanizem 3) ali zmanjšane akumulacije antibiotika v bakteriji. Bakterija lahko izčrpava protimikrobno učinkovino iz celice (aktivni transport tetraciklinov iz bakterij) (*Slika 2*, mehanizem 4),
- spremembe vezavnega mesta za antibiotik (npr.: zaradi mutacije se spremeni vezavno mesto za peniciline (penicilin-vezavni proteini - PBP) (1, 6).



**Slika 2:** Biokemijski mehanizmi rezistence na protibakterijske učinkovine

(številke so mehanizmi razloženi v besedilu).

### 1.2.3. ZMANJŠEVANJE REZISTENCE NA ANTIBIOTIKE

Razvoj rezistence je dodatno pospešila pretirana uporaba antibiotikov brez tehtnega razloga pri ljudeh in njihova uporaba za profilakso in pospeševanje rasti pri živalih (6). Širjenje rezistence je tako možno upočasniti s kontroliranim predpisovanjem antibiotikov, izboljšanjem higienskih razmer v bolnišnicah in omejevanjem gibanja bolnikov (7).

Velika hitrost, s katero se bakterije razmnožujejo in posledično razširjajo odpornost na antibiotike, postaja vedno večji problem in hkrati gonilna sila za razvoj novih protimikrobnih učinkovin. Farmacevtska industrija se bori proti rezistenci z odkrivanjem novih učinkovin, ki ciljajo na povsem nova prijemališča znotraj bakterije, s kemijskim modificiranjem že obstoječih antibiotikov in z razvijanjem inhibitorjev encimov, ki spreminjajo protimikrobne učinkovine. Na tržišče neprestano prihajajo nova zdravila, ki so uporabna v boju proti rezistentnim mikroorganizmom, hkrati pa se pojavljajo novi sevi rezistentnih bakterij, kar zahteva razvoj vedno novih protimikrobnih učinkovin (8).

### 1.3. BAKTERIJSKA CELIČNA STENA

Bakterijska celična stena je kompleksna struktura, ki je zelo močna in rigidna ter sestavljena iz makromolekul, ki jih drugje v naravi ne najdemo. Prav tako je ne najdemo pri vseh bakterijah, a je kljub temu zelo pomembna celična struktura.

Med njene funkcije, ki so pomembne za preživetje mikroorganizma, štejemo:

- vzdrževanje celične oblike,
- zaščita bakterije pred okoljem (encimi gostitelja),
- zaščita pred spremembami osmotskega tlaka v okolju in kompenzacija razlike v osmotskem tlaku med notranjostjo celice in zunanjim okoljem,
- zagotavljanje selektivne prepustnosti (je semipermeabilna),
- sodelovanje pri rasti in delitvi celice.

Za življenje bakterij je nujna njihova celovitost, zato med najpomembnejše sestavne dele bakterijske celične stene štejemo peptidoglikan ali murein, ki omogoča trdnost, hkrati pa tudi zagotavlja preživetje bakterije v močno hipotoničnem mediju, saj bi v nasprotnem primeru prišlo do nabrekanja in lize celice (9).

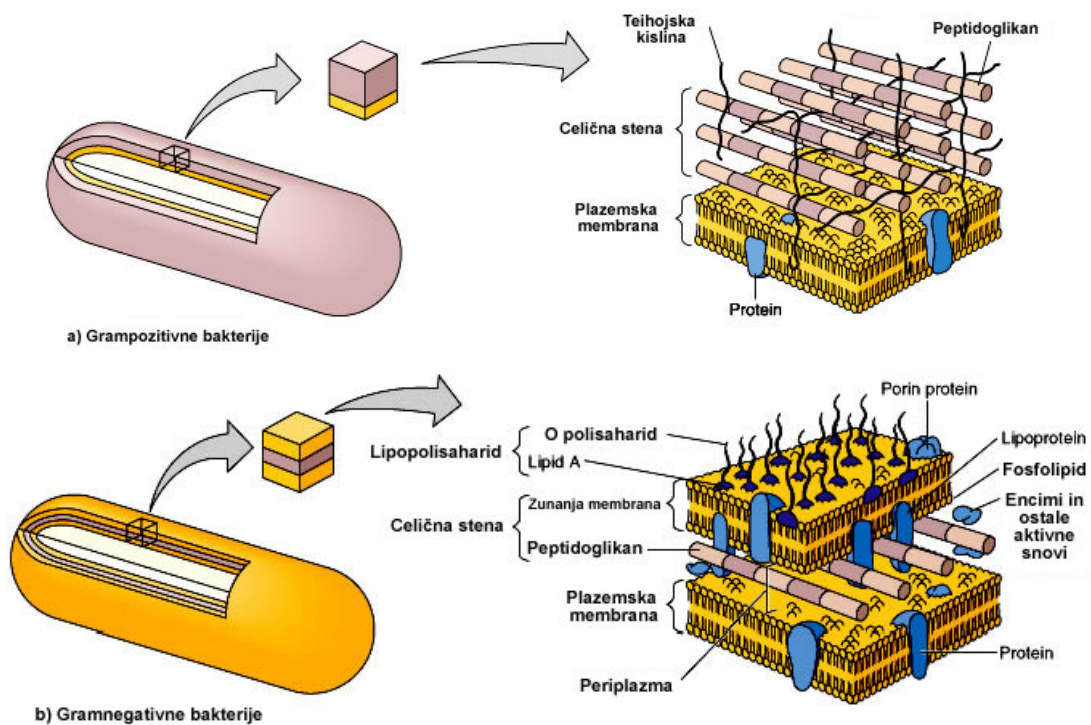
#### 1.3.1. CELIČNA STENA PO GRAMU POZITIVNIH IN PO GRAMU NEGATIVNIH BAKTERIJ

Bakterije delimo na osnovi zgradbe celične stene na po Gramu pozitivne (G+) in po Gramu negativne (G-) (*Slika 3*) (10). Barvanje po Gramu temelji na omenjeni razliki, tako da se stena G+ bakterij obarva modro-vijolično, stena G- pa rdeče (1).

Celična stena G+ bakterij je preprosto zgrajena (*Slika 3a*). Zunanjo plast sestavlja skupek karakterističnih ogljikovih hidratov in proteinov, ki skupaj tvorijo antigenske determinante.

Temu sledi tudi do 40 plasti peptidoglikana (2). Celična stena vsebuje tudi anionske polimere - teihojsko in teihuronsko kislino. Slednje prebadajo peptidoglikan in so mestoma kovalentno pritrjene na celično membrano. Teihojska kislina sestoji iz enot glicerolfosfata ali ribitolfosfata, teihuronska kislina pa je polimer s heksuronskimi kislinami. Oba tipa anionskih polimerov vsebujeta fosfatne, hidroksilne in amino skupine in delujeta kot ionsko izmenjevalni sistem (10).

Celična stena po G- organizmov je kompleksnejša in vsebuje več lipidov (Slika 3b). Ponavadi imajo celice še dodatno zunanjo membrano. Zunanji sloj vsebuje kompleksne lipopolisaharide, ki predstavljajo antigenske determinante, poleg tega pa se tukaj nahajajo tudi številni encimi in proteini, med katerimi so pomembni porini. To so transmembranski proteini, ki lahko prepuščajo mnoge majhne molekule, ali pa vsebujejo specifične receptorje in tako v celico spustijo le določene molekule. Zaradi zunanje membrane je prepustnost bakterijske stene zelo zmanjšana. Membrane ne morejo prehajati hidrofilne nenabite molekule z molekulsko maso 600-900, pa tudi zelo lipofilne spojine, kot so barvila, maščobne kisline, detergenti in antibiotiki. Pod tem zunanjim slojem leži plast peptidoglikana, ki mu sledi periplazemski prostor, v katerem se nahajajo  $\beta$ -laktamaze. Sledi s fosfolipidi bogata citoplazemska membrana, v kateri plavajo številni karakteristični proteini z različnimi funkcijami (2, 10).



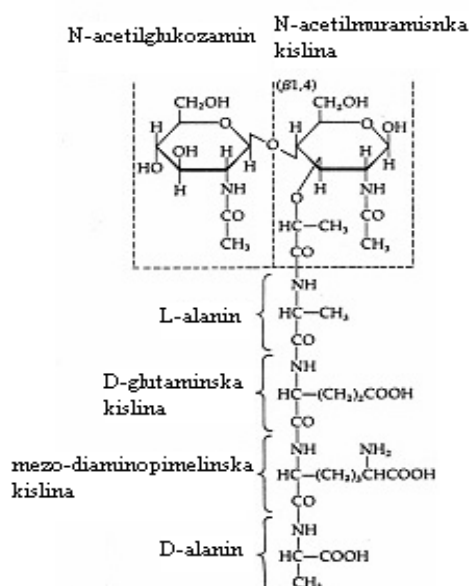
Slika 3: Primerjava celične stene G+ (a) in G- (b) bakterij.



## 1.4. PEPTIDOGLIKAN

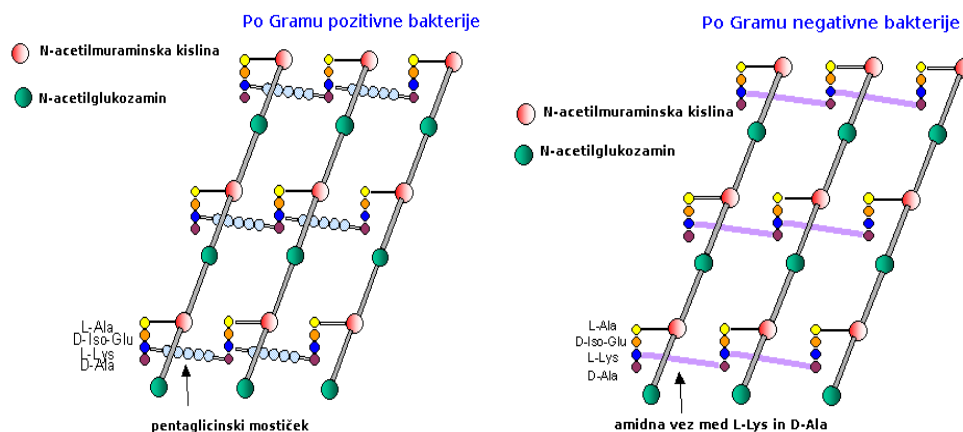
### 1.4.1. ZGRADBA PEPTIDOGLIKANA

Plast peptidoglikana je sestavljena iz serije izmenjujočih se sladkorjev *N*-acetilglukozamina in *N*-acetilmuraminske kisline, ki sta povezana preko 1,4- $\beta$  vezi v dolgo verigo. Na prosto karboksilno skupino laktinlega dela *N*-acetilmuraminske kisline je preko amidne vezi pripeta skupina aminokislin, ponavadi L-alanin-D-glutaminska kislina-*mezo*-diaminopimelinska kislina-D-alanin (*Slika 4*). Največ razlik je v aminokislini na tretjem mestu. Čeprav je *mezo*-diaminopimelinska kislina (*mezo*-A<sub>2</sub>pm) najbolj zastopana aminokislina na tem mestu, lahko najdemo tudi L-lizin, L-ornitin, L-diaminobutanojsko kislino ali L-homoserin.



**Slika 4:** Zgradba *N*-acetilmuramil-*N*-acetilglukozamin-tetrapeptid monomera.

Terminalna D-alanilna enota je pri po G<sup>+</sup> organizmih povezana z lizilno enoto sosednje tetrapeptidne verige preko pentaglicilnega mostička. Pri večini po G<sup>-</sup> in nekaterih po G<sup>+</sup> bakterijah pa nastane prečna povezava neposredno med prosto amino skupino aminokislina na tretjem mestu ene glikanske verige in terminalno karboksilno skupino D-Ala na četrtem mestu sosednje verige (*Slika 5*) (2, 10).



Slika 5: Prečne povezave peptidoglikanskih vlaken.

### 1.4.2. BIOSINTEZA PEPTIDOGLIKANA

Biosinteza peptidoglikana je kompleksen proces, ki je sestavljen iz treh stopenj. V prvi stopnji se v citoplazmi sintetizirajo prekursorji, sledi prenos le-teh do lipidnega nosilca, ki jih prenese čez membrano, v zadnji stopnji pa sledi še prehod prekursorjev v celično steno in vgraditev v že obstoječi peptidoglikan (10).

Poznavanje posameznih stopenj biosinteze peptidoglikana je pomembno za načrtovanje novih učinkovitih kemoterapevtikov.

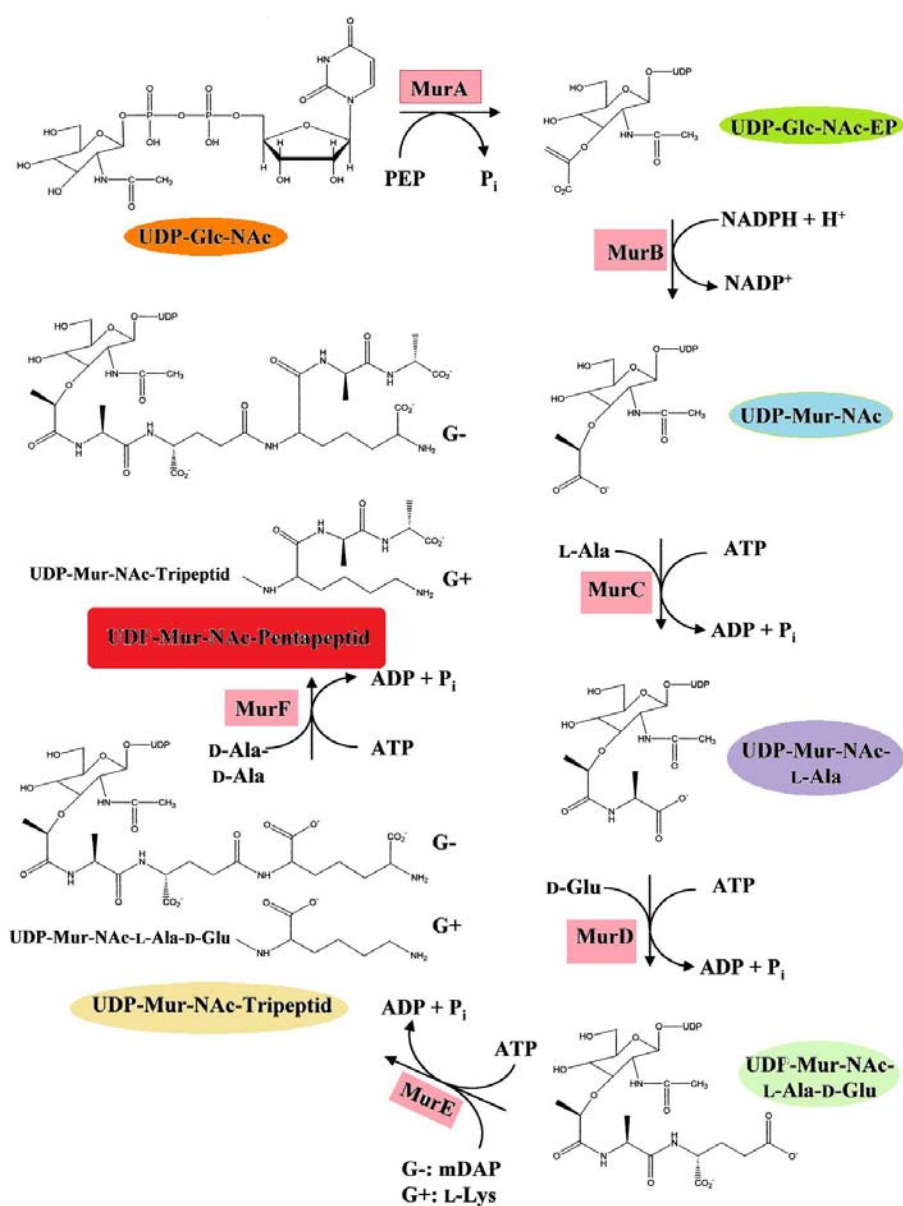
#### 1.4.2.1. SINTEZA PREKURZORJEV V CITOPLAZMI

V prvi stopnji biosinteze iz fruktoze-6-fosfata v treh korakih nastane glukozamin-1-fosfat. Ta se v naslednji stopnji s pomočjo encima *N*-acetilglukozamin-1-fosfat-uridiltransferaze (GlmU) pretvori v uridin difosfat (UDP) *N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc). Gre za prenos acetilne skupine iz uridina ob prisotnosti acetilkoencima A in uridin trifosfata (UTP). Sledi pretvorba UDP-GlcNAc v UDP-*N*-acetilmuraminsko kislino (UDP-MurNAc). Prvi del, kjer pride do prenosa enolpiruvata iz fosfoenolpiruvata (PEP) na 3-hidroksi skupino UDP-GlcNAc, katalizira encim MurA (UDP-*N*-acetilglukozamin-piruvil transferaza). Prenos poteka preko tetraedričnega intermediata, produkt pa je UDP-GlcNAc enolpiruvat. V drugem delu ob prisotnosti NADPH in FAD poteče redukcija enolpiruvatne skupine do D-laktata, pri čemer nastane UDP-MurNAc. Katalizator te reakcije je encim MurB (UDP-*N*-acetilenol-piruvil-glukozamin reduktaza) (11).

Istočasno v citoplazmi poteka sinteza D-aminokislin (prisotne le v prokariontih), in sicer na dva načina: z racemizacijo  $\alpha$ -ogljikovega atoma L-aminokislina (to katalizira ustrezna

aminokislinska racemaza) ali pa s stereoselektivno redukcijo  $\beta$ -keto kisline. Po obeh poteh tako nastanejo D-Ala, D-Glu in *mezo*-A2pm (10).

Končni citoplazemski prekursor biosinteze peptidoglikana, UDP-MurNAc pentapeptid, nastane tako, da se na prosto karboksilno skupino UDP-MurNAc preko amidne vezi postopoma veže pet aminokislin. Najprej se veže L-Ala (reakcijo katalizira MurC), sledi vezava D-Glu (katalizator je MurD), nato pa še pripenjanje *mezo*-A2pm pri G- ali L-Lys pri G+ bakterijah (s pomočjo encima MurE). Preostala dva D-Ala preostanka se dodata kot dipeptid D-Ala-D-Ala, in sicer v reakciji, ki jo katalizira encim MurF. Ta dipeptid nastane iz L-Ala s pomočjo alaninske racemaze, ki najprej L-Ala pretvori v D-Ala, nato pa ustreznostna ligaza (D-alanil-D-alanin ligaza - Ddl) katalizira nastanek dipeptida (Slika 6) (5).



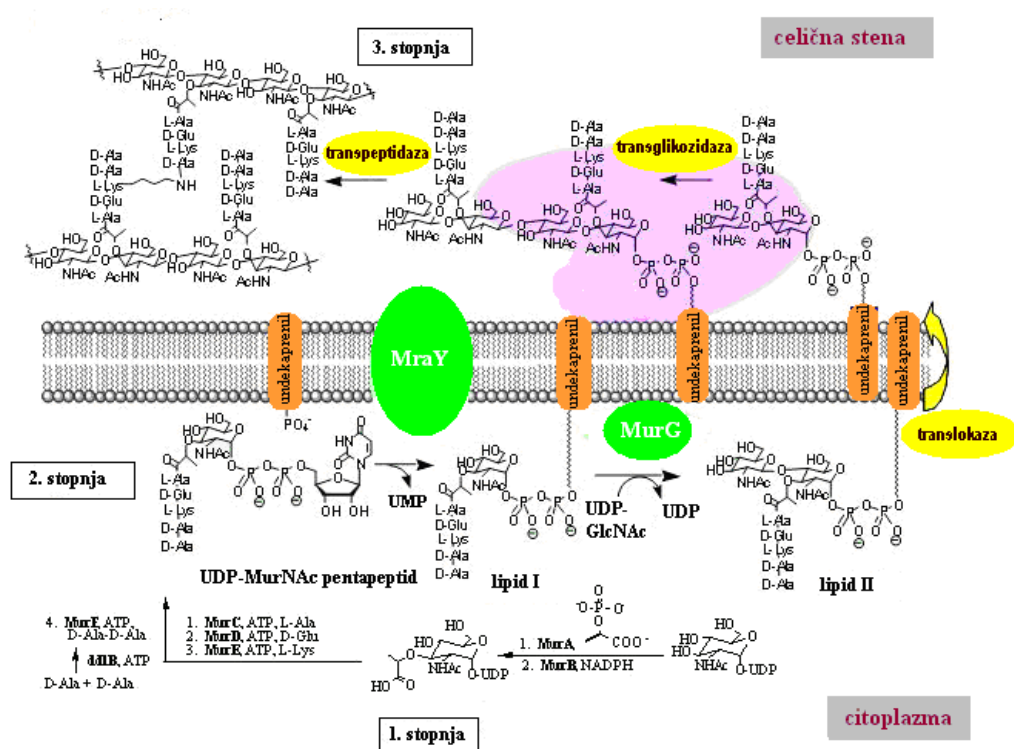
Slika 6: Sinteza UDP-N-acetilmuramilpentapeptida.

#### 1.4.2.2. KROG LIPIDNEGA NOSILCA

Druga faza sinteze, t.i. krog lipidnega nosilca poteka na citoplazemski membrani. Gre za prenos gradnikov peptidoglikana preko celične membrane. V prvi stopnji se UDP-MurNAc-pentapeptid s pomočjo fosfo-*N*-acetilmuramoil-pentapeptid translokaze (MraY) poveže s fosforiliranim lipidnim nosilcem (undekaprenol-fosfatom, ki je sestavljen iz 55 C-atomov), s katerim ostane povezan do konca cikla. Nastalo strukturo imenujemo tudi Lipid I. Pri tem se sprosti uridin monofosfat in nastane difosfo-*N*-acetilmuramoilpentapeptid. To reakcijo katalizira encim translokaza (MurG). V naslednji stopnji se na Lipid I pripne še UDP-*N*-acetylglukozaminska enota in tako nastane struktura imenovana Lipid II. Pri tem nastaja 1,4- $\beta$  glikozidna vez, njen nastanek pa katalizira *N*-acetylglukozamin transferaza. UDP-MurNAc-pentapeptid, ki predstavlja osnovno gradbeno enoto peptidoglikana, se nato prenese na zunanjo stran bakterijske membrane, kar imenujemo translokacija, katere mehanizem je še vedno neznan (1, 10). Sledi tvorba glikozidnih povezav med disaharidnimi enotami že izgrajenega peptidoglikana, premreženje peptidnih delov in odcepitev lipidnega prenašalca od izgrajenega peptidoglikana. Nato poteče še regeneracija undekaprenol-fosfata s specifičnim encimom pirofosforilazo, kar omogoči vstop lipidnega nosilca v nov cikel (5, 10).

#### 1.4.2.3. PREČNO POVEZOVANJE

V zadnji stopnji poteče še transpeptidacija sosednjih stranskih verig. Pri tem se encimi transpeptidaze najprej vežejo na D-Ala-D-Ala enoto pentapeptidne verige, nakar se pretrga peptidna vez med D-Ala ostankoma in odcepi terminalni D-Ala (odcepi pa se lahko tudi predzadnji D-Ala). Pri tem sproščena energija se porabi pri tvorbi prečne vezi. Preko novo nastale peptidne vezi med karboksilno skupino preostalega D-Ala in prosto amino skupino na ostanku *mezo*-A<sub>2</sub>pm ali L-Lys sosednje regije peptidoglikana se torej nastajajoči glikan poveže s peptidoglikanom celične stene (*Slika 7*) (10).

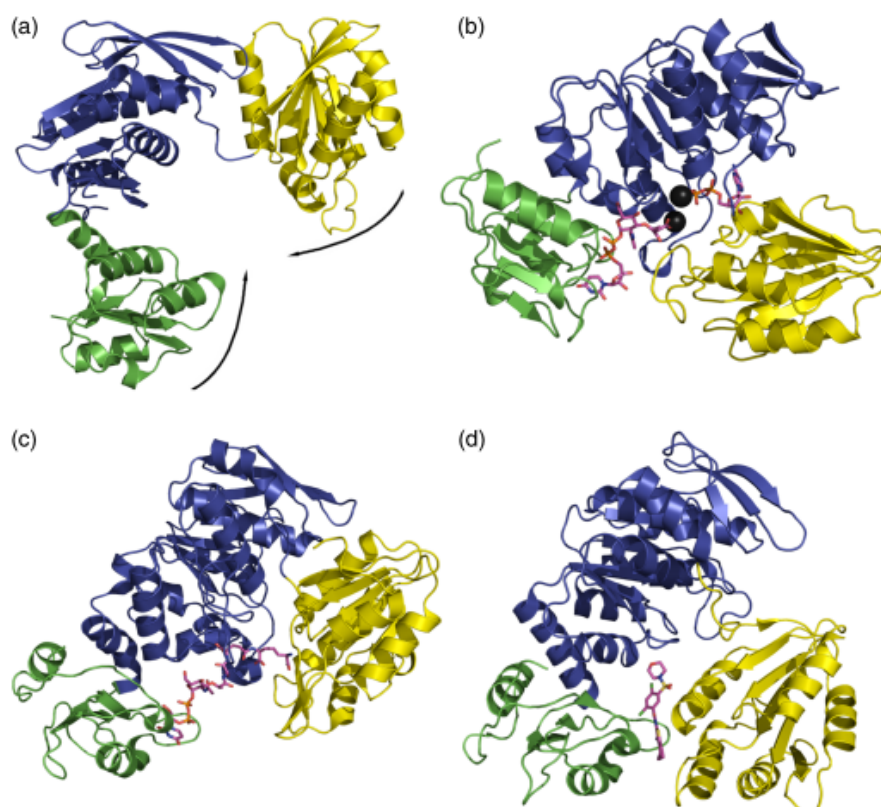


Slika 7: Shematski prikaz biosinteze peptidoglikana.

## 1.5. LIGAZE MUR

Biosinteza osnovnega peptidoglikanskega gradnika v citoplazmi je kot tarča za protibakterijske učinkovine še zelo slabo izkoriščena. Za nobenega od encimov vpletenih v te stopnje, razen naravnega antibiotika fosfomicina kot inhibitorja MurA, še ne poznamo terapevtsko uporabnih inhibitorjev. Ligaze MurC, MurD, MurE in MurF so od adenozin trifosfata (ATP) odvisni, visoko specifični encimi, ki so prisotni samo v bakterijah. Mur encimi izkazujejo med posameznimi bakterijskimi vrstami visoko stopnjo podobnosti v aminokislinskem zaporedju. Iz tega razloga lahko pričakujemo, da bo imel dober inhibitor Mur encimov širok spekter delovanja (5, 10, 12, 13).

Mur encimi imajo več skupnih lastnosti: spadajo v isto naddružino encimov, delujejo po enakem mehanizmu in so sestavljeni iz treh domen: N-terminalne, centralne in C-terminalne domene. N-terminalna domena je odgovorna za vezavo UDP prekursorja, centralna za vezavo ATP, C-terminalna pa za vezavo aminokislina, ki jo encim veže na UDP substrat (Slika 8) (11).

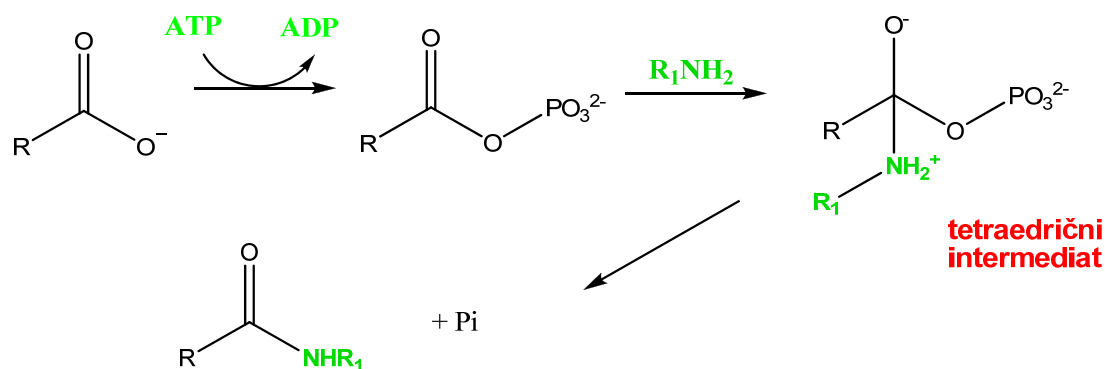


**Slika 8:** 3D struktura Mur ligaz – (a) MurC, odprta struktura brez liganda; (b) MurD, zaprta struktura v kompleksu z UDP-MurNAc-L-Ala, ADP in  $Mg^{2+}$ ; (c) MurE, zaprta struktura v kompleksu z UDP-MurNAc-L-Ala- $\gamma$ -D-Glu-*mezo*-A2pm); (d) MurF, zaprta struktura v kompleksu z sulfonamidnim inhibitorjem (4).

Ligaze Mur spadajo v skupino od ATP odvisnih ligaz, ki s pomočjo hidrolize ATP aktivirajo karboksilno skupino substrata (UDP prekursorja). To lahko storijo na 2 načina:

- ATP se hidrolizira do adenzin difosfata (ADP) in anorganskega fosfata (Pi),
- ATP se hidrolizira do adenzin monofosfata (AMP) in anorganskega pirofosfata (PPi).

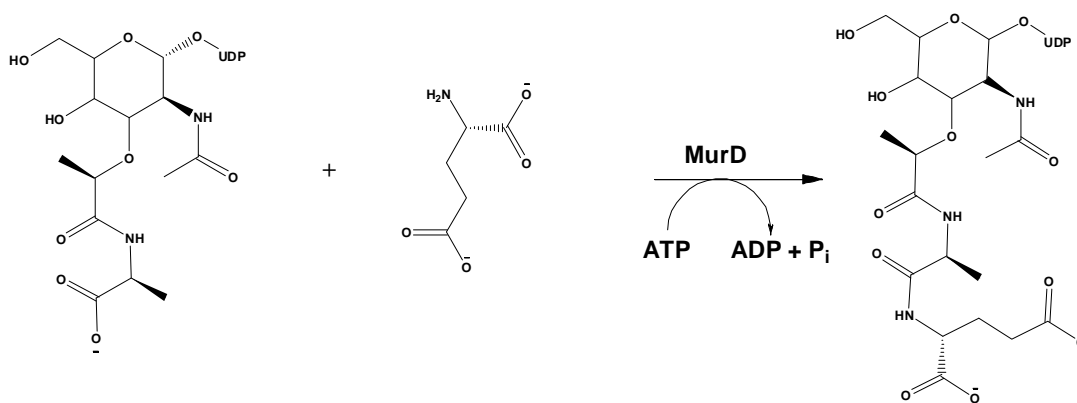
Ligaze Mur so tipični predstavniki prve skupine. Katalizirajo nastanek peptidne vezi ob istočasni hidrolizi ATP do ADP in Pi.  $\gamma$ -Fosfatna skupina ATP-ja aktivira karboksilno skupino substrata, pri čemer nastane acilfosfatni intermedat. Tega nukleofilno napade aminska skupina pripenjajoče se aminokislina, tako da pride do nastanka nestabilnega tetraedričnega intermedata. Sledi eliminacija anorganskega fosfata, pri čemer nastane nova peptidna vez (*Slika 9*) (12).



Slika 9: Tvorba peptidne vezi preko tetraedričnega intermedijata.

### 1.5.1. Ligaza MurD

Ligaza MurD (UDP-*N*-acetilmuramoil-L-alanin:D-glutamat ligaza) katalizira pripenjanje druge aminokisljine, D-Glu, na substrat UDP-MurNAc-L-Ala (UMA) (Slika 10). Za svoje delovanje potrebuje dva magnezijeva iona, eden sodeluje pri vezavi ATP-ja, drugi pa je potreben za nastanek acilnega intermedijata (11). Študije so pokazale, da se na MurD najprej veže ATP, nato UMA, nazadnje pa D-Glu. Produkt encima MurD je UDP-MurNAc-L-Ala-D-Glu (UMAG) (14). S pomočjo rentgenske kristalografije so odkrili, da se encim MurD nahaja v treh različnih konformacijah - dveh »odprtih« in eni »zaprti«, ki nastane, ko se ob vezavi substrata zapre C-terminalna domena.



Slika 10: Reakcija, ki jo katalizira encim MurD.

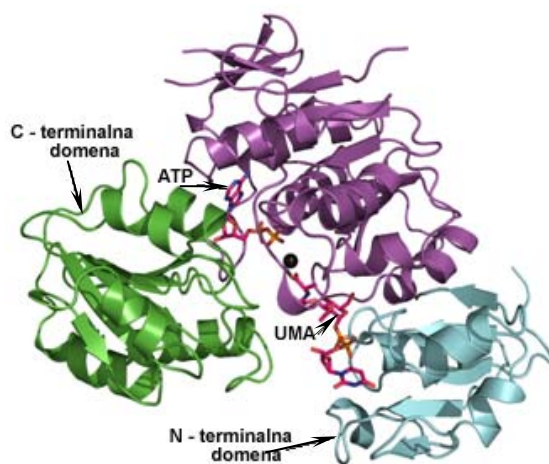
### Struktura encima MurD

Tridimenzionalna kristalna struktura encima MurD iz *E. coli* je bila prva opisana 3D kristalna struktura katerega koli encima iz družine ligaz Mur. Danes je poznanih 6 kristalnih struktur encima MurD v kompleksih s substrati, produkti in inhibitorji (15).

Encim MurD je sestavljen iz treh domen (Slika 11):

- N-terminalne domene: sestavljena je iz petih paralelnih  $\beta$ -struktur, ki jih obdajajo 4  $\alpha$ -vijačnice; ta domena ima dinukleotid-vezavno področje (Rossmannovo zvitje) in veže UDP del sladkornega substrata,
- Centralne domene: sestavlja jo šest paralelnih  $\beta$ -struktur, ki jih obdaja sedem  $\alpha$ -vijačnic in tri manjše antiparalelne  $\beta$ -strukture. Je ATP vezavna domena, obenem pa veže tudi preostali del substrata,
- C-terminalne domene: v sredini domene je pet paralelnih in ena antiparalelna  $\beta$ -struktura, obdaja pa jih 5  $\alpha$ -vijačnic; ima Rossmannovo zvitje in na substrat veže D-Glu preostanek (15).

Centralna in C-terminalna domena sta strukturno podobni v vseh ligazah Mur, zato se ti encimi med seboj razlikujejo predvsem po N-terminalni domeni. N-terminalna domena MurD je homologna N-terminalni domeni encima MurC, le da mora za pravilno umestitev daljšega substrata razširiti špranjo med prvo in drugo domeno, in sicer tako, da N-terminalno domeno zasuka stran od ATP-vezavnega mesta oziroma centralne domene za približno  $30^\circ$  (16).

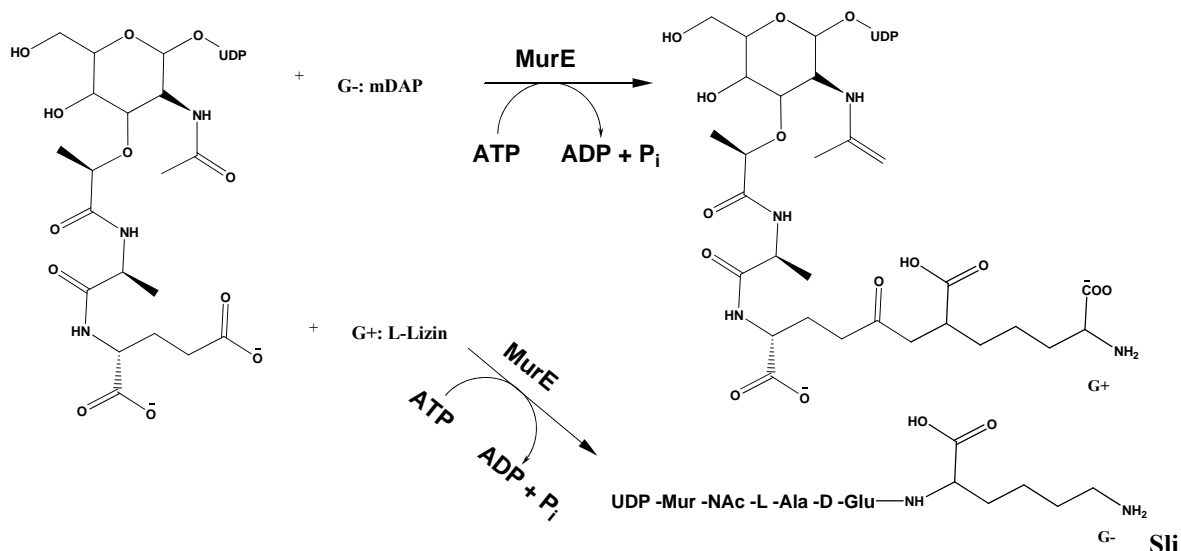


Slika 11: Prostorski prikaz strukture MurD.

### 1.5.2. Ligaza MurE

Ligaza MurE katalizira pripenjanje tretje aminokislina, *mezo*-A2pm (pri večini G- bakterij) ali L-Lys (pri G<sup>+</sup> bakterijah), na substrat UMAG, kar vodi do nastanka UDP-MurNAc-tripeptida (UMT) (Slika 12). MurE ligaza je zelo specifična in v pentapeptid vgradi le omenjeni aminokislini, saj tako lahko zagotovi pravilno premreženje peptidoglikana v kasnejših stopnjah njegove izgradnje (11, 17).





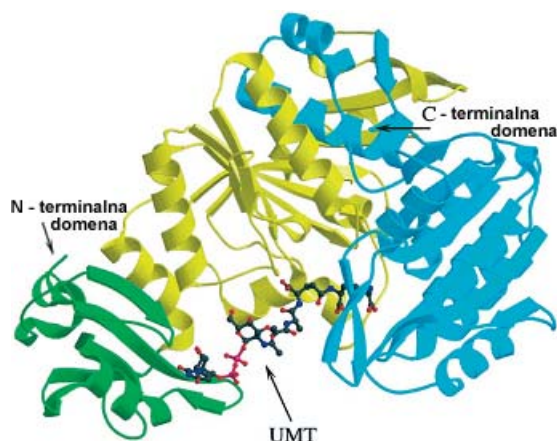
ka 12: Reakcija, ki jo katalizira encim MurE.

### Struktura encima MurE

Danes je znana kristalna struktura encima v kompleksu s substratom, ki je bila izolirana iz *E. coli* (Slika 13). Encim je sestavljen iz treh domen, od katerih sta dve zelo podobni domenam encima MurD:

- N-terminalne domene: sestavljena je iz 5  $\beta$ -struktur, ki jo obdajata 2  $\alpha$ -vijačnici in zajema aminokislino od 1 do 88,
- Centralne domene: sestavljena je iz 6 centralnih paralelnih  $\beta$ -struktur, ki jih obkroža 7  $\alpha$ -vijačnic. Vsebuje tudi vezavno mesto za ATP. Obsega aminokislino od 90 do 338,
- C-terminalne domene: zgrajena je iz 6 paralelnih  $\beta$ -struktur in 1 antiparalelne, obdaja pa jih 5  $\alpha$ -heliksov. Ta domena vsebuje tudi Rossmannovo zvitje (5, 18).

Produkt se veže v področje, ki se nahaja med vsemi tremi domenami. Pri tem se med UMT in encimom vzpostavijo večinoma van der Waalsove interakcije.



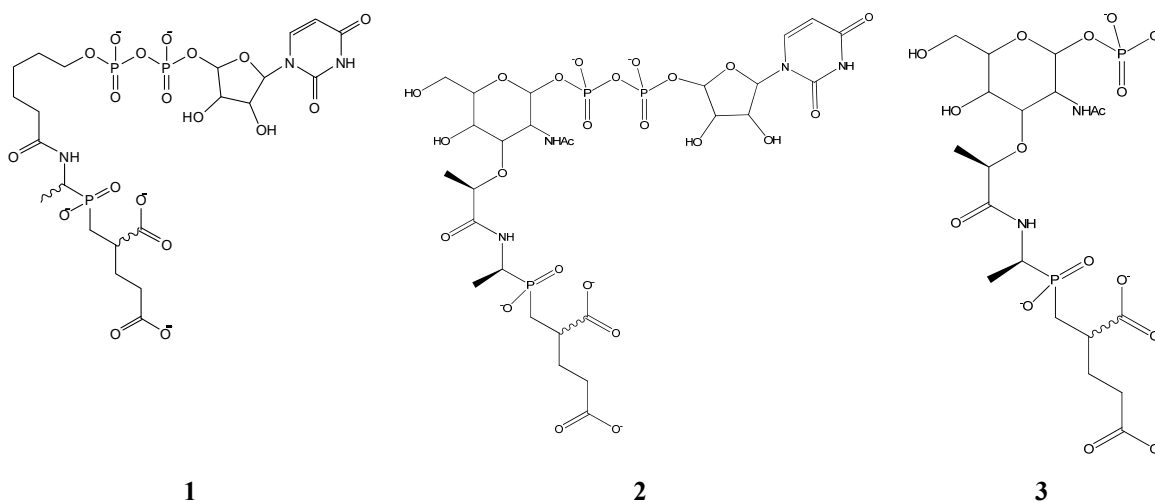
Slika 13: Prostorski prikaz strukture MurE.

## 1.6. INHIBITORJI LIGAZ MUR

### 1.6.1. INHIBITORJI LIGAZE MurD

#### 1. Fosfinatni inhibitorji

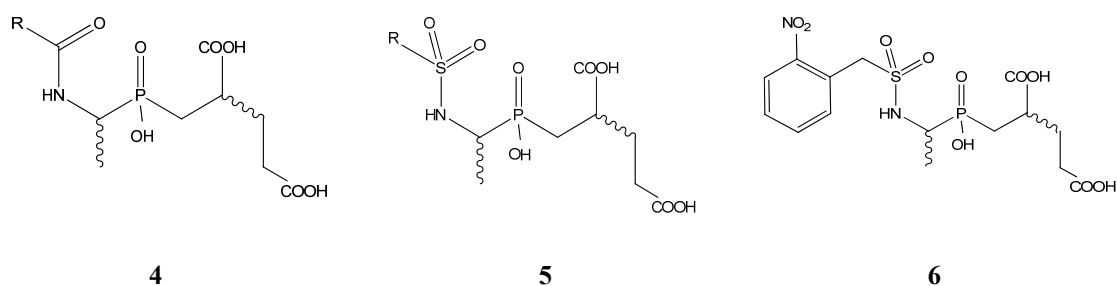
Leta 1998 so odkrili prve učinkovite inhibitorje encima MurD, ki posnemajo tetraedrični intermediat, ki nastane v aktivnem mestu encima v času reakcije. Spojina **1** je inhibitor MurD z  $IC_{50} = 680$  nM (Slika 14) in ima na mestu tvorbe amidne vezi fosfinatni analog prehodnega stanja in alifatsko verigo kot zamenjavo za *N*-acetilmuraminsko kislino.



Slika 14: Fosfinatni inhibitorji encima MurD.

Istega leta so sintetizirali tudi fosfinatne inhibitorje tetraedričnega stanja (*Slika 14*), pri čemer so upoštevali hipotezo, da *N*-acetilmuraminska kislina veliko doprinese k jakosti inhibicije, zato so jo ohranili kot del strukture. Spojino **2** z  $IC_{50} = 4$  nM so izbrali za spojino vodnico. Ugotovili so, da prisotnost muraminske kisline in prisotnost prednostne absolutne konfiguracije na enem stereogenem centru povečata jakost za več kot 3 velikostne razrede. Fosfatna skupina (spojina **3**,  $IC_{50} = 20$  nM) je bistvena, saj v primerjavi s terminalno hidroksilno skupino poveča inhibitorno aktivnost za več kot 4 velikostne razrede (19).

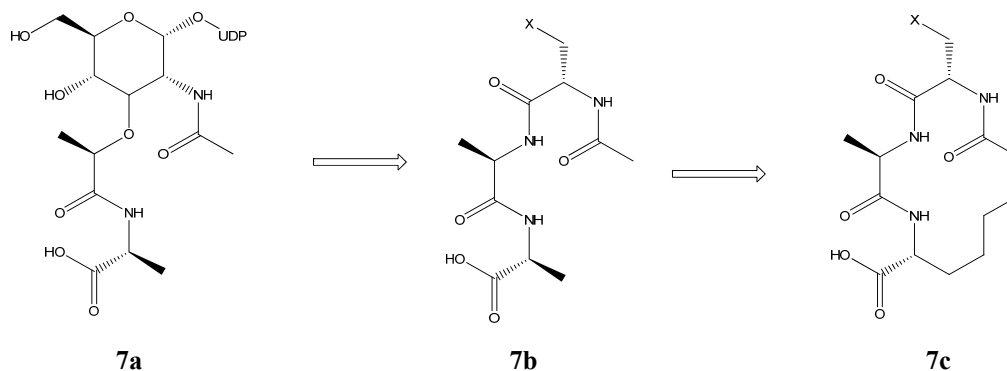
Leta 2005 so sintetizirali nove fosfinatne inhibitorje encima MurD. Izhajali so iz strukture iz leta 1999, ki je imela dobro inhibitorno aktivnost. Najprej so poiskali zamenjave za sladkorni in D-laktoilni ostanek in tako dobili amidne (spojina **4**) in sulfonamidne (spojina **5**) fosfinate (*Slika 15*), od katerih so bili najbolj učinkoviti nitrobenzilsulfonilni derivati (spojina **6**,  $IC_{50} = 78 \pm 19$   $\mu$ M) (20).



Slika 15: Novejši fosfinatni inhibitorji encima MurD.

## 2. Makrociklični inhibitorji

S pomočjo kristalne strukture encima MurD v kompleksu s substratom so leta 2003 razvili nov razred inhibitorjev. Odkrili so prisotnost hidrofobnega žepa v bližini vezavnega mesta in ugotovili, da je možno izpustiti znaten del sladkornega dela in hkrati ohraniti možnost interakcije z aktivnim mestom encima. Poenostavljeni strukturi **7b** (*Slika 16*) so povečali učinkovitost z vgraditvijo lipofilnega distančnika, ki je povezal *N*-acetilno skupino in L-Ala substrata. Tako so dobili makrociklično strukturo **7c** (21).

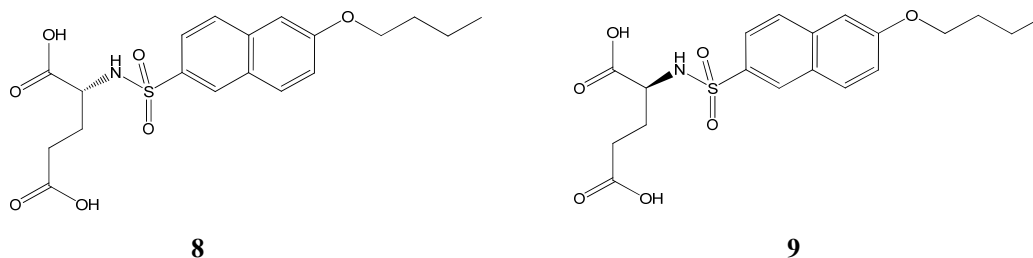


Slika 16: Načrtovanje inhibitorjev encima MurD na osnovi poenostavitve substrata.

### 3. Inhibitorji, ki vsebujejo glutaminsko kislino

#### a) *N*-sulfonamidni derivati glutaminske kisline

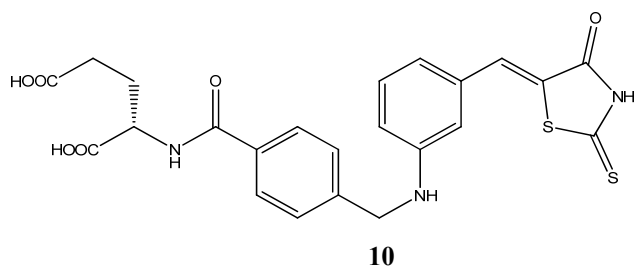
Leta 2007 so sintetizirali novo skupino nizkomolekularnih mimetikov prehodnega stanja. Potrdili so hipotezo, da je D-Glu fragment potencialnega inhibitorja ključen za njegovo delovanje. Na podlagi te ugotovitve je bila sintetizirana serija sulfonamidnih derivatov D-Glu (Slika 17) in njenih derivatov. Preverjali so tudi vpliv stereokemije Glu in zato sintetizirali in testirali še njen L-stereoizomer. Ugotovili so, da imata tako L kot D derivat inhibitorno aktivnost, slednja je pri L derivatu približno 2,5-krat nižja (22).



Slika 17: Stereoizomera novega *N*-sulfonamidnega inhibitorja encima MurD.

#### b) Benzilidenrodanini

Rodanini so že znani inhibitorji različnih encimov, med drugimi tudi  $\beta$ -laktamaze in encima MurC. Zato so na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo sintetizirali spojine s 5-benziliden-2-tioksotiazolidin-4-onsko in 5-benzilidentiazolidin-2,4-dionsko strukturo. Izhajali so iz spojine s kinazolinsko strukturo, pri čemer so kinazolinski obroč zamenjali z zgoraj omenjenima strukturama. Ugotovili so, da imata L-Glu in D-Glu derivat spojine **10** (Slika 18) približno enako afiniteto do encima MurD za razliko od *N*-sulfonamidnih inhibitorjev **8** in **9** (23).



**Slika 18:** Predstavniki benzilidenrodaninskih inhibitorjev MurD.

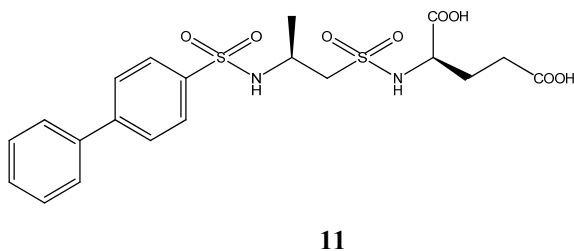
### 1.6.2. INHIBITORJI LIGAZE MurE

#### 1. Analogi diaminopimelinske kisline

Leta 1996 je skupina raziskovalcev v Franciji načrtovala, sintetizirala in testirala obsežno serijo spojin s potencialnim inhibitorskim delovanjem na encim MurE, ki naj bi posnemale substrat, *mezo*-A<sub>2</sub>pm, se vezale v vezavno mesto za ta substrat in tako inhibirale MurE. Med sintetiziranimi spojinami so bili različni derivati lantionina, različne heterociklične spojine ter substituirani derivati 2-aminopimelinske kisline. Kot najbolj obetavni so se izkazali substituirani derivati A<sub>2</sub>pm (26).

#### 2. Peptidosulfonamidi

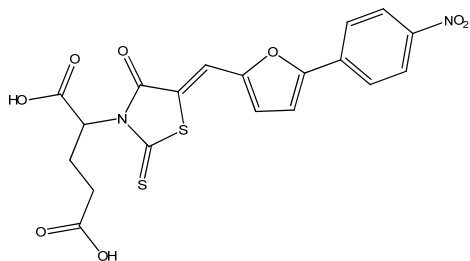
Leta 2006 so sintetizirali nove potencialne inhibitorje encima MurD, ki pa so pokazali dobro inhibitorsko aktivnost tudi na encim MurE. Prišli so do spojine **11** (*Slika 19*), ki ima IC<sub>50</sub> v mikromolarnem območju in bi zato lahko bila obetavna spojina za nadaljnje študije. Najverjetneje je, da peptidosulfonamidi inhibirajo MurE kot substratni analogi (22).



**Slika 19:** Peptidosulfonamidni inhibitor MurE.

### 3. Derivati rodanina

S pomočjo virtualnega rešetanja komercialno dostopnih spojin so odkrili nov inhibitor MurE, spojino **12**, ki vsebuje rodaninski skelet in glutaminsko kislino z  $IC_{50} = 61 \mu M$ . (Slika 20) (27).

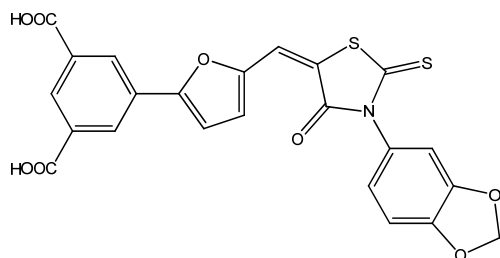


**12**

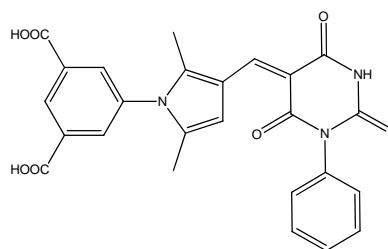
**Slika 20:** Rodaninski inhibitor ligaze MurE.

#### 1.6.3. DUALNI INHIBITORJI LIGAZ MurD IN MurE

Z virtualnim rešetanjem so na osnovi strukture inhibitorjev z glutaminsko kislino dobili nove dualne inhibitorje ligaz MurD in MurE, ki so derivati benzen-1,3-dikarboksilne kisline (Slika 21). Spojina **13** inhibira MurD z  $IC_{50} = 270 \mu M$  in MurE z  $IC_{50} = 32 \mu M$ , spojina **14** pa zavira MurD z  $IC_{50} = 690 \mu M$  in MurE z  $IC_{50} = 89 \mu M$  (17).



**13**



**14**

**Slika 21:** Predstavnika dualnih inhibitorjev MurD in MurE.

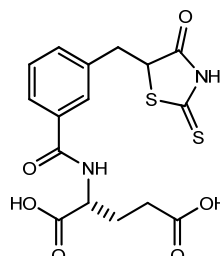
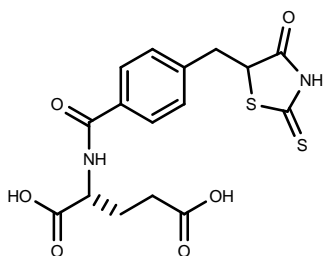
## 2. NAMEN DELA

V okviru diplomske naloge bomo poskušali sintetizirati nove potencialne inhibitorje ligaz MurD in MurE, ki sodelujeta v znotrajceličnih stopnjah biosinteze monomernih gradnikov peptidoglikana. Izhajali bomo iz znanih inhibitorjev ligaze MurD, ki so bili sintetizirani in biološko ovrednoteni na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo Univerze v Ljubljani. Sintetizirali bomo serijo spojin s 5-benziltiazolidin-4-onskim ogrodjem, ki imajo v primerjavi z znanimi 5-benzilidentiazolidin-4onskimi inhibitorji MurD reducirano eksociklično dvojno vez. S sintezo teh spojin bomo razširili poznavanje povezave med strukturo in delovanjem inhibitorjev MurD tiazolidin-4-onskega tipa. Pri tem nas predvsem zanima, kako redukcija dvojne vezi vpliva na inhibicijo tarčnih encimov. Sintetizirane spojine bomo tudi biološko ovrednotili v *in vitro* encimskih testih in rezultate podali v obliki rezidualnih aktivnosti (RA). V primeru aktivnih spojin (RA < 50 %) pa bomo določili tudi IC<sub>50</sub> vrednosti.

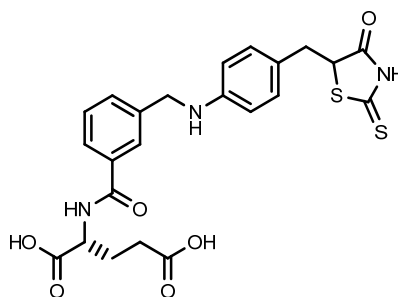
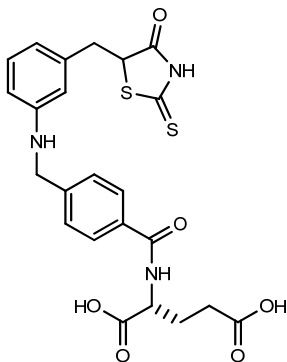
Načtovane spojine lahko razdelimo v naslednje sklope:

a. Derivati z rodaninskim skeletom

- Spojine s krajšo verigo med heterociklom in D-Glu

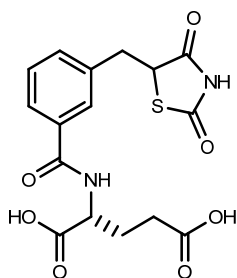


- Spojine z daljšo verigo med heterociklom in D-Glu

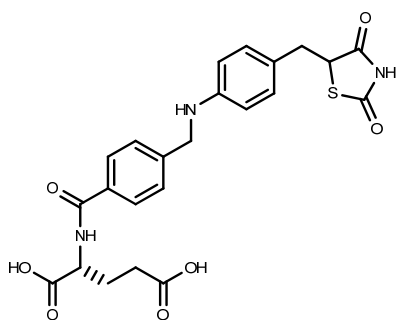


## b. Derivati s tiazolidin-2,4-dionskim skeletom

- Spojine s krajšo verigo med heterociklom in D-Glu



- Spojine z daljšo verigo med heterociklom in D-Glu





## 3. MATERIALI IN METODE

### 3.1. Materiali

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev (Acros, Aldrich, Fluka, Kemika, Merck).

### 3.2. Metode

#### Določevanje tališča

Tališča smo določali s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica in so nekorrigirana.

#### Kromatografske metode

Za izvedbo tankoplastne kromatografije smo uporabljali TPK plošče Kieselgel 60 F<sub>254</sub> (Merck, Nemčija) z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem in različne mobilne faze. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko pri valovni dolžini 254 nm.

Za čiščenje produktov s kolonsko kromatografijo smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel z velikostjo delcev 0,063-0,200 mm (Merck, Nemčija) in različne mobilne faze. Za čiščenje produktov s flash kolonsko kromatografijo smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm (Merck, Nemčija) in različne mobilne faze.

#### Spektroskopske metode

##### Jedrska magnetna resonanca (NMR)

NMR spektri so bili posneti na Bruker Advance DPX<sub>300</sub> spektrometru pri 300,13 MHz v DMSO-d<sub>6</sub> in CDCl<sub>3</sub> s TMS kot internim standardom v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

##### Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti na spektrometru Varian-MAT 311 A z EI ali ESI tehniko na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

### Infrardeča spektroskopija (IR)

IR spektre smo posneli na spektrofotometru Perkin Elmer 1600 FT-IR na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

### Elementna analiza

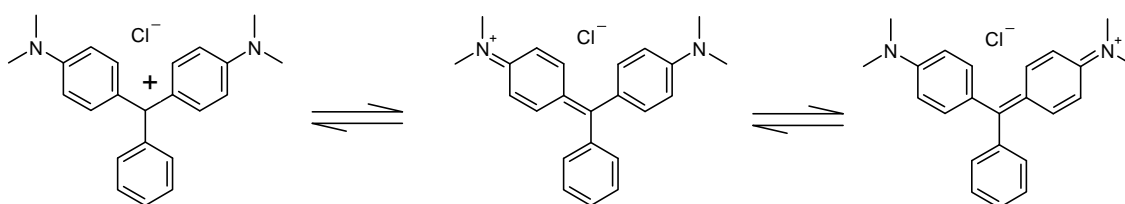
Elementne analize ogljika, vodika in dušika so bile opravljene z analizatorjem Perkin Elmer 240 C na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani.

### **Mikrovalovni reaktor**

Za nekatere sinteze smo uporabili mikrovalovni reaktor CEM Discover z IR načinom merjenja temperature.

### **Biološko testiranje**

Teste inhibicije encimov MurD in MurE je izvedla asist. dr. Andreja Kovač, mag. farm. Encim MurD katalizira reakcijo med UMA in D-Glu ob prisotnosti ATP, ki pri tem razpade na ADP in fosfat. Nastanek fosfata določamo spektrofotometrično pri 650 nm posredno preko tvorbe obarvanega kompleksa z malahitno zelenim (*Slika 22*). Katalitično aktivnost encimov ovrednotimo na podlagi množine fosfata, ki nastane pri reakciji, pri čemer mora biti množina nastalega fosfata v linearnem območju umeritvene krivulje za fosfat. Ob dodatku inhibitorja se katalitična aktivnost encima zniža, zato je množina nastalega fosfata manjša v primerjavi s kontrolo brez inhibitorja. Učinkovitost inhibitorja izrazimo z rezidualno aktivnostjo (RA), ki predstavlja razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti inhibitorja in aktivnostjo encima brez navzočnosti inhibitorja (29).



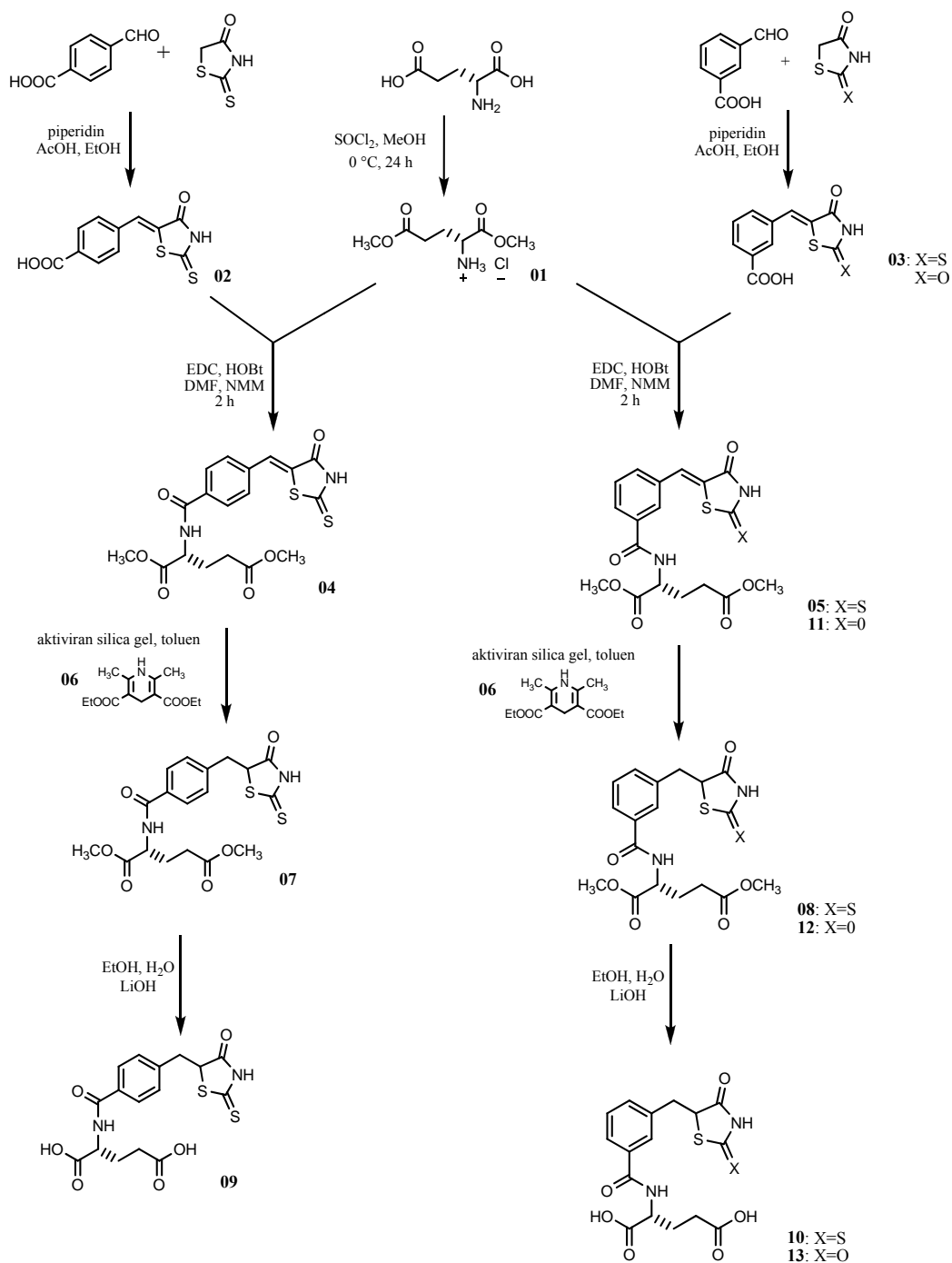
**Slika 22:** Struktura barvila malahitno zeleno.

### **Nomenklatura in risanje spojin**

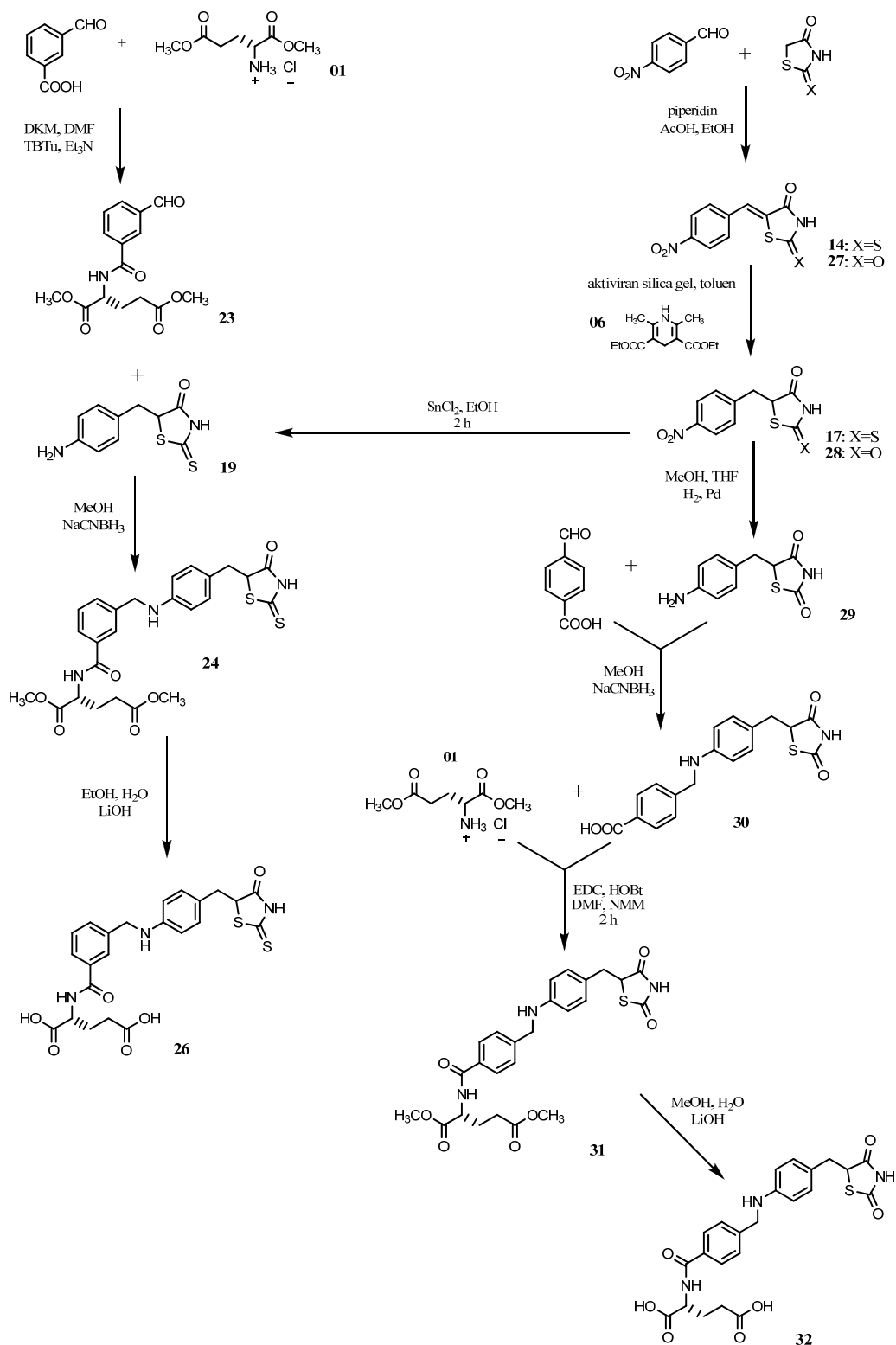
Za risanje struktur spojin in za njihovo poimenovanje smo uporabljali računalniški program ChemDraw Ultra 11.0 (Cambridge Soft).

## 4. EKSPERIMENTALNI DEL

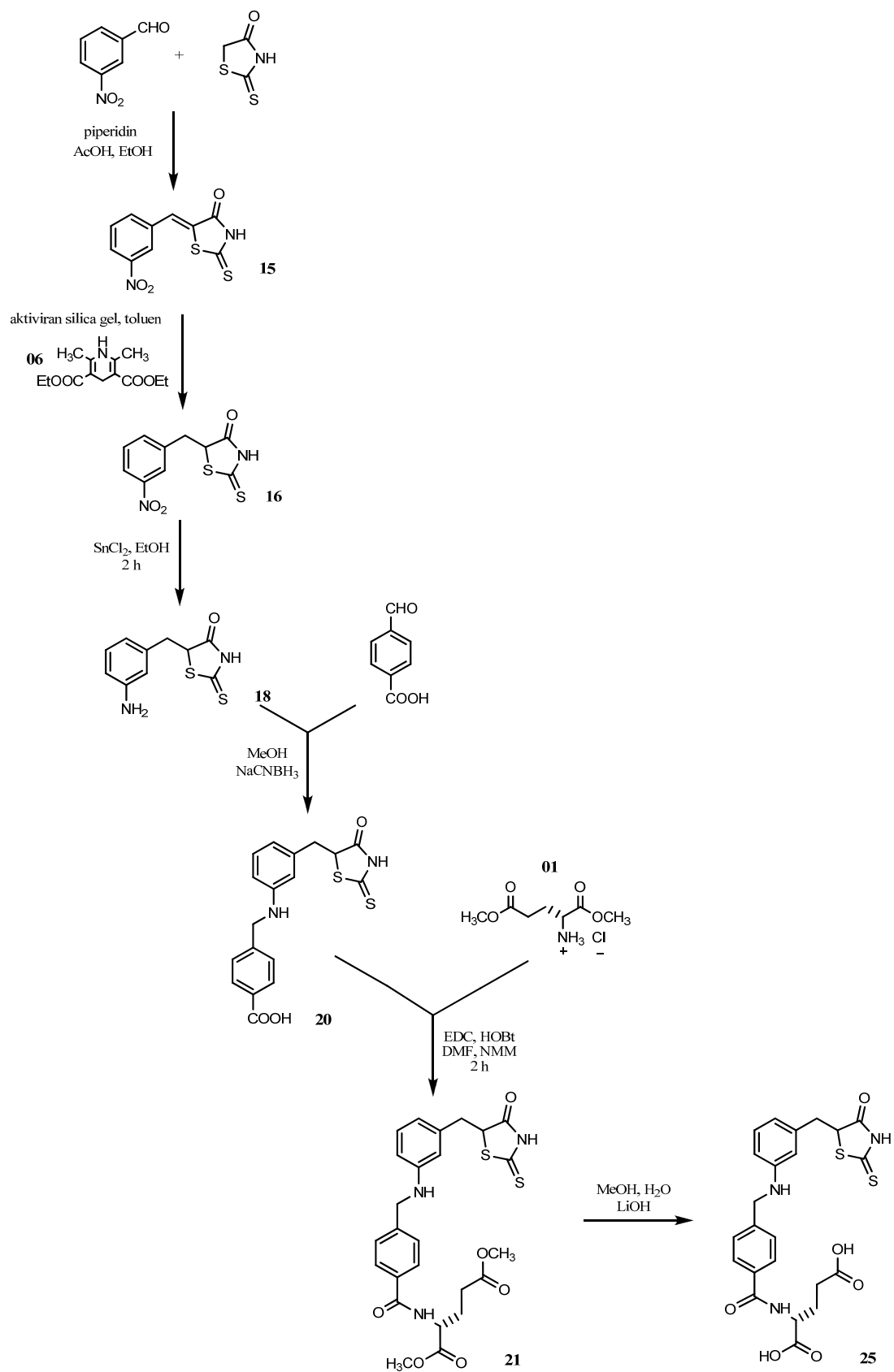
### 4.1. REAKCIJSKE SCHEME



**Shema 1:** Sinteza reduciranih analogov 5-benzilidenrodaninov in 5-benzilidientiazolidin-2,4-dionov s krajšo verigo med heterociklom in D-Glu (spojine 09, 10 in 13).



**Shema 2:** Sinteza reduciranih analogov 5-benzilidenrodaninov in 5-benzilidientiazolidin-2,4-dionov z daljšo verigo med heterociklom in D-Glu (spojini 26 in 32).



**Shema 3:** Sinteza reduciranih analogov 5-benzilidenrodaninov z daljšo verigo med heterociklom in D-Glu (spojina **25**).

## 4.2. Splošni postopki

### a) *Splošni postopek za Knoevenaglovo kondenzacijo*

Rodanin ali tiazolidin-2,4-dion (1 mmol) dispergiramo v etanolu v 10-mililitrski viali za mikrovalovni reaktor in med mešanjem dodamo ustrezni aldehyd (1 mmol), piperidin (0,1 mmol) in ledocet (0,1 mmol). Vialo zapremo s septumom ter segrevamo z mikrovalovnim reaktorjem pri naslednjih pogojih:  $T = 150^{\circ}\text{C}$ ,  $p = 20.0\text{ bar}$ ;  $P = 100\text{ W}$ ; run time = 5 min; hold time = 25 min. Po segrevanju vialo čez noč pustimo v hladilniku, da iz reakcijske zmesi izpadejo kristali in nato oborino odfiltriramo z odsesavanjem ter speremo s hladnim etanolom.

### b) *Splošni postopek za redukcijo dvojne vezi*

Ustrezni 5-benzilidentiazolidin-4-on (1 mmol) suspendiramo v toluenu in prepriamo z argonom (5 minut), da izpodrinemo kisik. Nato dodamo Hantzsch-ev ester (dietil 2,6-dimetil-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilat) (1,3 mmol) in aktiviran (pred uporabo ga segrevamo 5 h pri  $120^{\circ}\text{C}$ ) silica gel (1 g/1 mmol). Bučko opremimo s povratnim hladilnikom in jo ovijemo z alu folijo (zaščita pred svetlobo). Reakcijsko zmes segrevamo pri  $100^{\circ}\text{C}$  preko noči. Toplo suspenzijo nato filtriramo in speremo s toluenom in EtOAc. Matičnico uparimo do suhega, trdni preostanek pa kristaliziramo iz toluena. V kolikor kristali ne izpadejo, odparimo topilo in preostanek raztopimo v EtOAc. Organsko fazo speremo z 1M HCl (3x30 mL), nasičeno vodno raztopino NaCl (1x30 mL) in sušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ . Topilo odparimo pod znižanim tlakom, preostanek pa čistimo s kolonsko kromatografijo (MF=DKM:MeOH=40:1).

### c) *Splošni postopek za redukcijo aromatske nitro skupine s kositrovim (II) kloridom*

Izhodno nitro spojino (1 mmol) raztopimo v etanolu in dodamo  $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (5 mmol). Reakcijsko zmes segrevamo pri temperaturi refluxa 2 h. Po končani reakciji topilo odparimo pod znižanim tlakom, suh preostanek pa raztopimo v ustrezni količini nasičene vodne raztopine  $\text{NaHCO}_3$  in ekstrahiramo z EtOAc (3-4x). Organsko fazo sušimo z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in topilo odparimo pod znižanim tlakom.

***d) Splošni postopek za reduktivno aminiranje***

Izhodni amin (1 mmol) raztopimo v MeOH in dodamo 3- ali 4-formilbenzojsko kislino (1 mmol). Po eni uri dodamo še NaCNBH<sub>3</sub> (1.3 mmol) in mešamo pri sobni temperaturi preko noči. Nato odparimo topilo pod znižanim tlakom in surov produkt raztopimo v ustrezni količini nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub>. Vodno fazo najprej ekstrahiramo z EtOAc (1x). Nato jo nakisamo do pH=2 z 1M HCl in ekstrahiramo z EtOAc (3x). Združene organske faze sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtriramo in topilo odparimo pod znižanim tlakom. Produkt kristaliziramo iz MeOH.

***e) Splošni postopek za tvorbo amidne vezi z EDC/HOBt metodo***

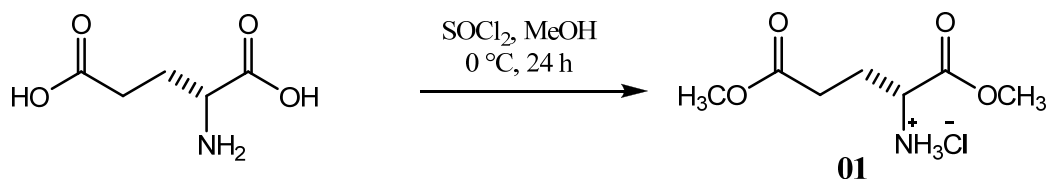
H-D-Glu(OMe)-OMe HCl (1 mmol) raztopimo v majhni količini DMF in ohladimo na ledeni kopeli na 0 °C. Nato dodamo HOBt (1,3 mmol) ob stalnem mešanju in ustrezen derivat rodanina oz. tiazolidin-2,4-diona (1 mmol). Nato z NMM uravnamo pH na 8. Nazadnje dodamo še EDC (1,2 mmol) in mešamo 2 dni pri sobni temperaturi. Po končani reakciji topilo odparimo pod znižanim tlakom in produkt raztopimo v EtOAc ter speremo z 10% citrsko kislino (3x), z nasičeno vodno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (3x) ter z nasičeno vodno raztopino NaCl (1x). Organsko fazo nato sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in filtriramo. Topilo odparimo pod znižanim tlakom in produkt čistimo s kolonsko kromatografijo.

***f) Splošni postopek za hidrolizo metilnih estrov***

Metilni ester (1 mmol) raztopimo v mešanici topil MeOH ali EtOH in H<sub>2</sub>O (1:1, 10 mL) in dodamo LiOH (4 mmol, 2.2 M) ter mešamo pri sobni temperaturi preko noči. MeOH oz EtOH odparimo pod znižanim tlakom in vodni preostanek speremo z etrom in EtOAc. Nato vodno fazo nakisamo z 1M HCl do pH=1-2 in ekstrahiramo z EtOAc (3x) ter organsko fazo sušimo z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Topilo odparimo pod znižanim tlakom.

### 4.3. Sinteza spojin s krajšo verigo med heterociklom in D-Glu

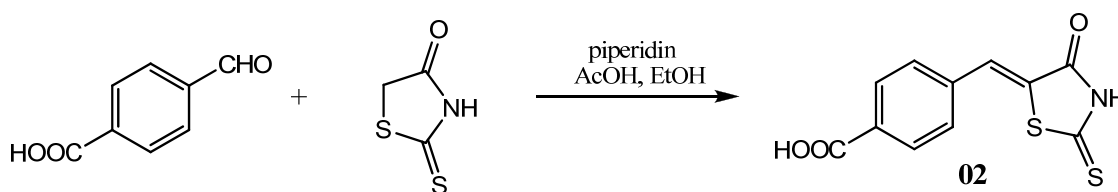
#### 4.3.1. Sinteza (*R*)-dimetil 2-aminopentandioata (01)



MeOH (50 ml) smo ohladili na 0° C na ledeni kopeli in počasi po kapljicah dodajali SOCl<sub>2</sub> (74.82 mmol, 5.5 mL) tekom 15 min. Nato smo dodali D-Glu (34.01 mmol, 5.00 g) in reakcijsko zmes mešali 24 ur pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo prelili z etrom in ga odfiltrirali z odsesavanjem. Dobili smo 6,825 g (32,27 mmol) belo obarvanega produkta H-D-Glu(OMe)-OMe HCl.

Elementna sestava	C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>4</sub>	M = 175,18 g/mol
Opis	Bela kristalinična spojina	
Izkoristek	94,88 %	
Rf	0,00 (MF = DKM:MeOH = 9:1)	
Tališče	138- 141° C	tališče po literaturi (30): 140-143° C

#### 4.3.2. Sinteza (*Z*)-5-(4-karboksibenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-ona (02)



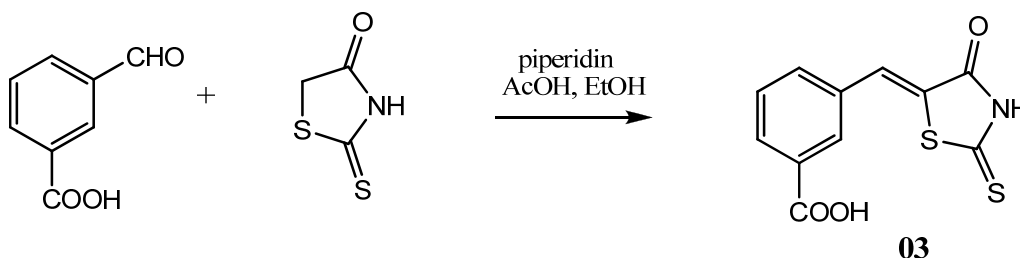
Spojino **02** smo sintetizirali iz rodanina (500 mg, 3.75 mmol) in 4-formilbenzojske kisline (563 mg, 3.75 mmol) po Splošnem postopku za Knoevenaglovo kondenzacijo. Reakcijo smo ponovili trikrat in dobili 2.58 g (9.74 mmol) rjave kristalinične spojine.

Elementna sestava	C <sub>11</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	M = 265,31 g/mol
Opis	rjava kristalinična spojina	
Izkoristek	86,57%	



Rf	0.59 (MF = DKM:MeOH = 7:1 + AcOH)
Tališče	259-262° C tališče po literaturi (30): 307-309 °C
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 7.68 (s, 1H, Ar-CH); 7.71 (d, 2H, <i>J</i> = 8.4 Hz, Ar-H-2,6); 8.06 (d, 2H, <i>J</i> = 8.4 Hz, Ar-H-3,5); 13.21 (s, 1H), 13.92 (s, 1H)
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3025; 1690; 1608; 1475; 1411; 1290; 1245; 1181; 1002; 836; 768; 690; 659; 517

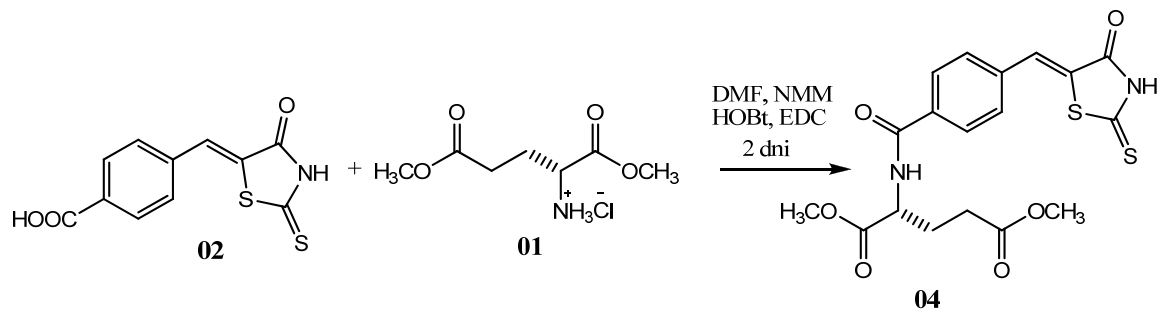
#### 4.3.3. Sinteza (Z)-5-(3-karboksibenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-ona (03)



Spojino **03** smo sintetizirali iz rodanina (355 mg, 2.67 mmol) in 3-formilbenzojske kisline (400 mg, 2.67 mmol) po Splošnem postopku za Knoevenaglovo kondenzacijo. Dobili smo 647 mg (2.44 mmol) rumene kristalinične spojine.

Elementna sestava	C <sub>11</sub> H <sub>7</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	M = 265,31 g/mol
Opis	rumena kristalinična spojina	
Izkoristek	91,33 %	
Rf	0.23 (MF = DKM:MeOH = 9:1)	
Tališče	243-246° C	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm] = 7.67 (t, 1H, <i>J</i> = 7.8 Hz, Ar-H-5); 7.72 (s, 1H, Ar-CH); 7.86 (d, 1H, <i>J</i> = 7.8 Hz, Ar-H-6); 8.03 (d, 1H, <i>J</i> = 7.8 Hz, Ar-H-4); 8.13 (s, 1H, Ar-H-2); 13.29 (s, 1H); 13.90 (s, 1H)	
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3006; 1692; 1610; 1596; 1478; 1424; 1299; 1280; 1232; 1199; 1069; 934; 908; 789; 756; 670; 657; 552; 525	

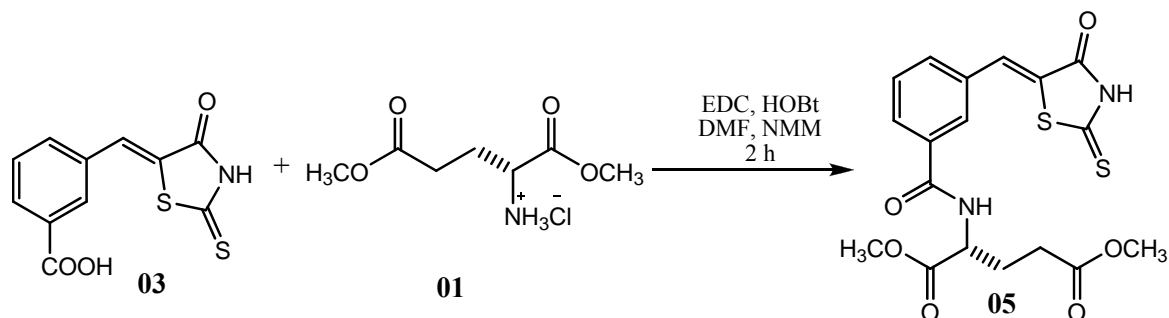
**4.3.4. Sinteza (*R,Z*)-dimetil 2-(4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-iliden)metil)benzamido) pentandioata (04)**



Spojino **04** smo sintetizirali iz H-D-Glu(OMe)-OMe HCl (1.50 g, 5.654 mmol) in spojine **02** (1.196 g, 5.654 mmol) po Splošnem postopku za tvorbo amidne vezi z EDC/HOBt metodo. Dobili smo 613 mg (1.453 mmol) rumeno oranžne kristalinične spojine.

Elementna sestava	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	M = 422,48 g/mol
Opis	Rumeno oranžna kristalinična spojina	
Izkoristek	25,70%	
Rf	0.25 (MF = DKM:MeOH = 20:1)	
Tališče	159-162° C	
[α] <sub>D</sub>	- 2,6° (c = 3 mg/ml, DMSO)	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 1.96-2.20 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 2.45-2.52 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> , signal se delno prekriva s signalom za DMSO-d <sub>5</sub> ); 3.59 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 3.66 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 4.45-4.52 (m, 1H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 7.71 (d, 3H, Ar-H-2,6 + Ar-CH); 8.01 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Ar-H-3,5), 8.91 (d, 1H, J = 7,5 Hz, CONH ); 13.88 (s, 1H, CONHCS)	
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3270; 3117; 2954; 2851; 1735;1634; 1612; 1541; 1501; 1437; 1340; 1275; 1231; 1183; 1059; 1002; 926; 855; 779; 714; 677; 566; 543; 491	

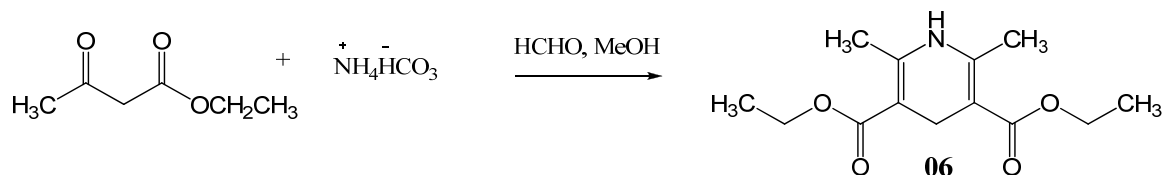
**4.3.5. Sinteza (*R,Z*)-dimetil 2-(3-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-ilidene)metil)benzamido)pentandioata (05)**



Spojino **05** smo sintetizirali iz H-D-Glu(OMe)-OMe HCl (399 mg, 1.887 mmol) in spojine **03** (500 mg, 1.887 mmol) po Splošnem postopku za tvorbo amidne vezi z EDC/HOBt metodo. Dobili smo 266 mg (0.629 mmol) rumeno oranžne kristalinične spojine.

Elementna sestava	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	M = 422,48 g/mol
Opis	rumeno oranžna kristalinična spojina	
Izkoristek	33,36 %	
Rf	0.60 (MF = DKM:MeOH = 9:1)	
Tališče	171-174° C	
[α] <sub>D</sub>	+ 10,42° (c = 3,07 mg/ml)	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 1.96-2.21 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 2.46-2.51 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), signal se delno prekriva s signalom za DMSO-d <sub>5</sub> ); 3.59 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 3.67 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 4.46-4.54 (m, 1H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 7.63-7.68 (m, 2H, Ar-CH, Ar-H-5); 7.77 (d, 1H, J = 7.8 Hz, Ar-H-6); 7.98 (d, 1H, J = 7.8 Hz, Ar-H-4); 8.06 (s, 1H, Ar-H-2); 8.89 (d, 1H, J = 7.4 Hz,); 13.88 (s, 1H, CSNHCO)	
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3305; 3203; 1737; 1708; 1640; 1608; 1542; 1481; 1434; 1332; 1278; 1258; 1234; 1183; 1060; 1018; 898; 812; 756; 683; 520	

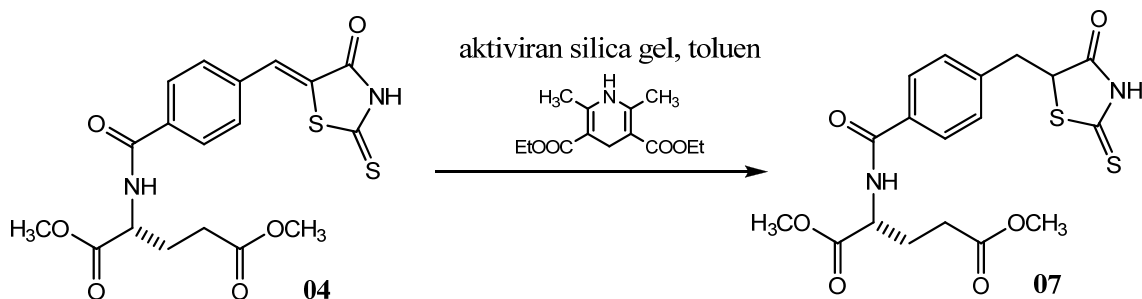
#### 4.3.6. Sinteza Hantzsch-evega ester (dietil 2,6-dimetil-1,4-dihidropiridin-3,5-dikarboksilata)



Etilacetoacetat (64 ml, 0.5 mol), amonijev hidrogenkarbonat (19.75 g, 0.25 mmol) in formaldehid (16.2 ml, 0.2 mol) smo raztopili v MeOH (60 ml) in segrevali najprej 1 uro pri 60 °C ter nato še pol ure pri 80 °C. Po končani reakciji smo bučko ohladili in suspenzijo filtrirali z odsesavanjem ter nastale kristale sprali z MeOH. Dobili smo 21,05 g rumenih kristalov spojine **06**.

Elementna sestava	C <sub>13</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>4</sub>	M = 253 g/mol
Opis	rumena kristalinična spojina	
Izkoristek	41,77 %	
Rf	0.33 (MF = DKM:MeOH = 40:1)	
Tališče	179-182° C	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 1.90 (t, 6H, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 2.11 (s, 6H, CH <sub>3</sub> ); 3.11 (s, 2H, CH <sub>2</sub> ); 4.02-4.10 (dd, 4H, J = 6.9 Hz, OCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ); 8.26 (s, 1H, NH)	

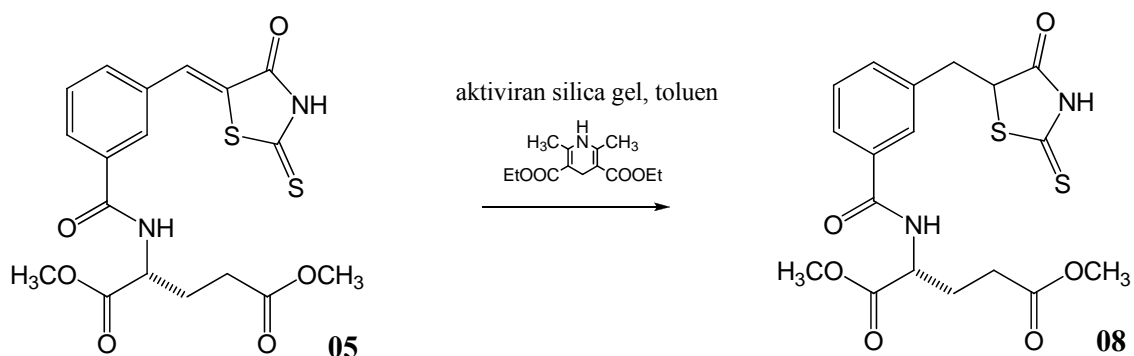
#### 4.3.7. Sinteza (2R)-dimetil 2-(4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)benzamido)pentandioata (07)



Spojino **07** smo sintetizirali iz spojine **04** (600 mg, 1.42 mmol) po Splošnem postopku za redukcijo dvojne vezi. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF=DKM:MeOH=40:1) in dobili 303 mg (0,714 mmol) rumene trdne spojine.

Elementna sestava	$C_{18}H_{20}N_2O_6S_2$	M = 424,49 g/mol		
Opis	rumena trdna spojina			
Izkoristek	50,27 %			
Rf	0.32 (MF = DKM:MeOH = 20:1)			
Tališče	55-58° C			
$[\alpha]_D$	+ 8,5° (c = 3.0 mg/ml, DMSO)			
$^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )	$\delta$ [ppm] = 1.97-2.18 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 2.44 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> , signal se delno prekriva s signalom za DMSO- $d_5$ ); 3.23-3.28 (dd, 1H, AB sistem, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH, signal se delno prekriva s signalom za H <sub>2</sub> O); 3.43 (dd, 1H, AB sistem, J = 4.9 Hz, J = 14.1 Hz, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH); 3.58 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 3.65 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 4.42-4.49 (m, 1H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 5.08 (dd, 1H, J = 4.9 Hz, J = 8.6 Hz, SCHCO); 7.35 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Ar-H-2,6); 7.82 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Ar-H-3,5); 8.73 (d, 1H, J = 7.4 Hz, CONH); 13.18 (s, 1H, CONHCS)			
IR (KBr)	$\nu$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3355; 3199; 3026; 2953; 2927; 2853; 2363; 2345; 2136; 1737; 1645; 1614; 1570; 1537; 1503; 1438; 1338; 1295; 1221; 1186; 1103; 1072; 1019; 985; 921; 850; 757; 707; 668			
MS (ESI+)	m/z (%) = 425.1 ([M+H] <sup>+</sup> , 38); 250.0 (100); 77 (97)			
ELEMENTNA		% C	% H	% N
ANALIZA	Izračunano	50.93	4.75	6.60
$C_{18}H_{20}N_2O_6S_2$	Ugotovljeno	51.21	4.66	6.52

#### 4.3.8. Sinteza (2*R*)-dimetil 2-(3-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)benzamido)pentandioata (08)

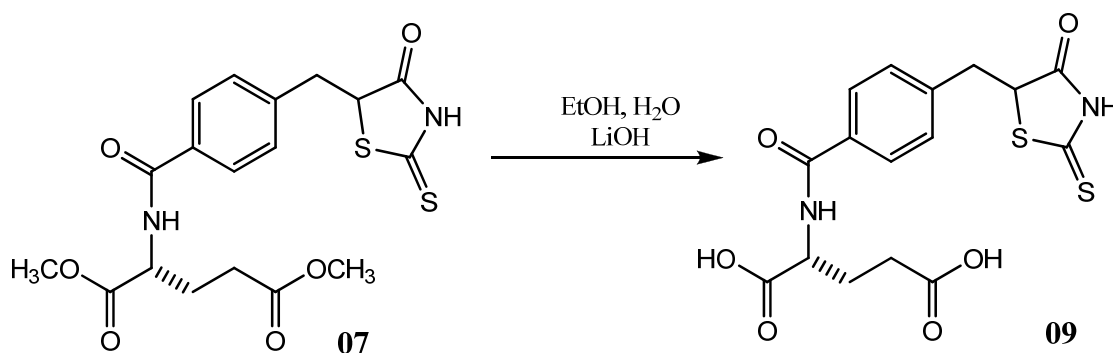


Spojino **08** smo sintetizirali iz spojine **05** (200 mg, 0,474 mmol) po Splošnem postopku za redukcijo dvojne vezi. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF=DKM:MeOH=20:1) in dobili 122 mg (0,287 mmol) rumene trdne spojine.

Elementna sestava	$\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$	$M = 424,49 \text{ g/mol}$
Opis	rumena trdna spojina	
Izkoristek	60,63 %	
Rf	0.57 (MF = DKM:MeOH = 9:1)	
Tališče	59-62° C	
$[\alpha]_{\text{D}}$	+ 7,86° (c = 2,8 mg/ml, DMSO)	
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- $d_6$ )	$\delta$ [ppm] = 1.95-2.19 (m, 2H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2$ ); 2.45 (t, 2H, $J = 7.5 \text{ Hz}$ , $\text{CHCH}_2\text{CH}_2$ , signal se delno prekriva s signalom za DMSO- $d_5$ ); 3.25 (dd, 1H, AB sistem, $J = 9.1 \text{ Hz}$ , $J = 14.1 \text{ Hz}$ , $H_A$ od $\text{Ar-CH}_2\text{CH}$ ); 3.45 (dd, 1H, AB sistem, $J = 4.7 \text{ Hz}$ , $J = 14.1 \text{ Hz}$ , $H_B$ od $\text{Ar-CH}_2\text{CH}$ ); 3.59 (s, 3H, $\text{OCH}_3$ ); 3.65 (s, 3H, $\text{OCH}_3$ ); 4.43-4.51 (m, 1H, $\text{CHCH}_2\text{CH}_2$ ); 5.04-5.09 (m, 1H, SCHCO); 7.43-7.45 (m, 2H, Ar-H-5,6); 7.76-7.79 (m, 2H, Ar-H-2,4); 8.73 (d, 1H, $J = 7.4 \text{ Hz}$ , NHCO); 13.20 (s, 1H, CONHCS)	
IR (KBr)	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3412; 2952; 2851; 2346; 2280; 1736; 1639; 1585; 1534; 1483; 1437; 1295; 1184; 1102; 1069; 921; 812; 749; 727; 695; 674; 535; 479	

MS (ESI+)	m/z (%) = 425.1 ( $[M+H]^+$ , 33); 250.0 (100)			
ELEMENTNA		% C	% H	% N
ANALIZA	Izračunano	50.93	4.75	6.60
$C_{18}H_{20}N_2O_6S_2$	Ugotovljeno	51.22	5.09	6.65

#### 4.3.9. Sinteza (2R)-2-(4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)benzamido) pentanidiojske kisline (09)

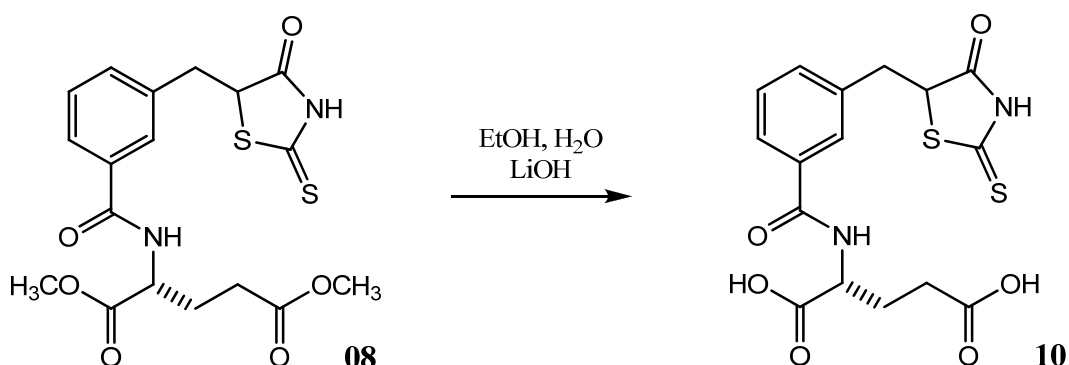


Spojino **09** smo sintetizirali iz spojine **07** (200 mg, 0.472 mmol) po Splošnem postopku za hidrolizo metilnih estrov. Dobili smo 172 mg (0.434 mmol) rumene kristalinične spojine.

Elementna sestava	$C_{16}H_{16}N_2O_6S_2$	M = 396,44 g/mol
Opis	rumena kristalinična spojina	
Izkoristek	92,02 %	
Rf	0.00 ((MF = DKM:MeOH = 3:1)	
Tališče	59-62° C	
$[\alpha]_D$	+ 2,81° (c = 3,2 mg/ml, DMSO)	
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- $d_6$ )	$\delta$ [ppm] = 1.88-2.15 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 2.36 (t, 2H, J = 7.4 Hz, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 2.93-3.47 (m, 2H, Ar-CH <sub>2</sub> CH); 3.63-3.71 (m, 0.5H, SCHCO); 4.36-4.43 (m, 1H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 5.06-5.10 (m, 0.5H, SCHCO); 7.35 (d, 2H, J = 8.1 Hz, Ar-H-2,6); 7.79-7.84 (m, 2H, Ar-H-3,5); 8.53-8.58 (m, 1H, NHCO); 12.45 (br s, 2H, COOH); 13.17 (br s, 1H, CONHCS)	

IR (KBr)	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3547; 3414; 3361; 3287; 3119; 2999; 2954; 2851; 2346; 2286; 1664; 1616; 1576; 1543; 1482; 1420; 1400; 1356; 1300; 1283; 1237; 1206; 1161; 1123; 1074; 988; 962; 904; 883; 860; 801; 786; 720; 691; 683; 624; 602; 577; 550; 513; 480			
MS (ESI+)	m/z (%) = 397.1 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 17); 77.0 (100)			
HR-MS za $\text{C}_{16}\text{H}_{17}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$	izračunan: 397.0528, izmerjen: 397.0515			
ELEMENTNA ANALIZA		% C	% H	% N
$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$	Izračunano	48.47	4.07	7.07
	Ugotovljeno	44.63	4.23	4.53

#### 4.3.10. Sinteza (2R)-2-(3-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)benzamido)pentanidijске kisline (10)



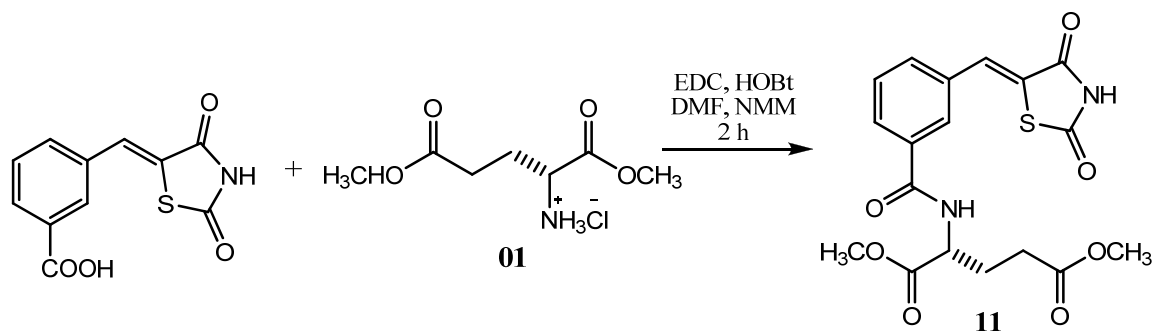
Spojino **10** smo sintetizirali iz spojine **08** (90 mg, 0.212 mmol) po Splošnem postopku za hidrolizo metilnih estrov. Dobili smo 72 mg (0.182 mmol) rumene kristalinične spojine.

Elementna sestava	$\text{C}_{16}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$	M = 396,44 g/mol
Opis	rumena kristalinična spojina	
Izkoristek	85,67 %	
Rf	0.00 (MF = DKM:MeOH = 9:1)	
Tališče	55-58° C	
$[\alpha]_D$	+ 6,39° (c = 3,13 mg/ml, DMSO)	



<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 1.91-2.13 (m, 2H, CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> ); 2.36 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CH-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> ); 2.92-3.48 (m, 2H, Ar-CH <sub>2</sub> CH); 3.64-3.72 (m, 0.5H, SCHCO); 4.37-4.45 (m, 1H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 5.04-5.10 (m, 0.5H, SCHCO); 7.37-7.44 (m, 2H, Ar-H-5,6); 7.72-7.80 (m, 2H, Ar-H-2,4); 8.54-8.60 (m, 1H, NHCO); 12.47 (br s, 2H, COOH)			
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3414; 2371; 2346; 2079; 1718; 1638; 1618; 1560; 1542; 1483; 1420; 1212; 1101; 1074; 813; 748; 610; 475			
MS (ESI-)	m/z (%) = 395 ([M-H] <sup>-</sup> , 71); 354.1 (100)			
HR-MS za C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	izračunan: 395.0372, izmerjen: 395.0376			
ELEMENTNA ANALIZA		% C	% H	% N
C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	Izračunano	48.47	4.07	7.07
	Ugotovljeno	49.40	4.70	5.06

#### 4.3.11. Sinteza (*R,Z*)-dimetil 2-(3-((2,4-dioxotiazolidin-5-ilidene)metil)benzamido)pentandioata (11)

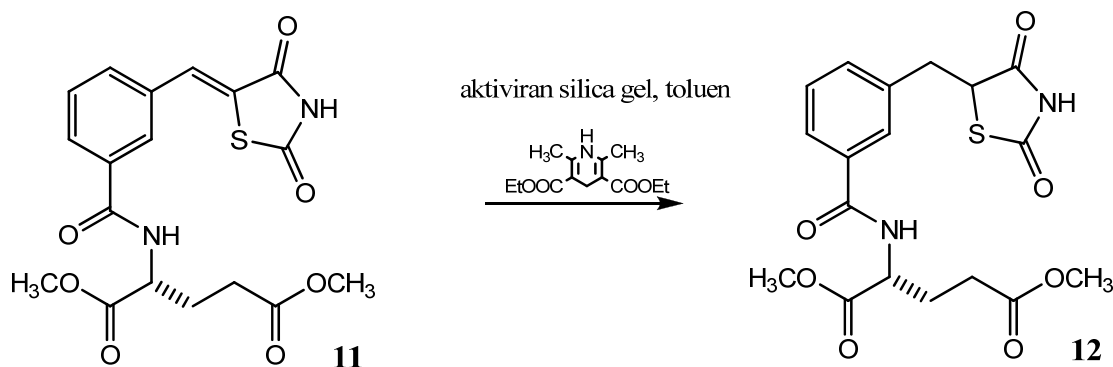


Spojino **11** smo sintetizirali iz H-D-Glu(OMe)-OMe HCl (340 mg, 1.605 mmol) in 3-karboksi-5-benzilidentiazolidin-2,4-diona (400 mg, 1.605 mmol) po Splošnem postopku za sintezo amidne vezi z EDC/HOBt metodo. Dobili smo 214 mg (0,527 mmol) umazano bele kristalinične spojine.

Elementna sestava	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S	M = 406,41g/mol
Opis	umazano bela kristalinična spojina	
Izkoristek	32,83 %	

Rf	0.41 (MF = DKM:MeOH = 9:1)
Tališče	159-162° C
[ $\alpha$ ] <sub>D</sub>	+ 7,79° (c = 2,8 mg/ml, DMSO)
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	$\delta$ [ppm] = 1.99-2.18 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 2.47-2.50 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> , signal se delno prekriva s signalom za DMSO-d <sub>5</sub> ); 3.59 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 3.67 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 4.46-4.53 (m, 1H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 7.63 (t, 1H, <i>J</i> = 7.8 Hz, Ar-H-5); 7.72 (s, 1H, ArCH); 7.75 (d, 2H, <i>J</i> = 7.8 Hz, Ar-H-6); 7.92 (d, 1H, <i>J</i> = 7.8 Hz, Ar-H-4); 8.07 (s, 1H, Ar-CH); 8.86 (d, 1 H, <i>J</i> = 7.4 Hz, CONH); signal za CONHCO ni viden.
IR (KBr)	$\nu$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3301; 3197; 3044; 2778; 1746; 1714; 1642; 1541; 1481; 1436; 1298; 1257; 1217; 1145; 1017; 812; 762; 689; 631; 604; 527

#### 4.3.12. Sinteza (*R*)-dimetil 2-((3-oksobenzil)-2,4-oksotiazolidindiona) aminopentandionata (**12**)

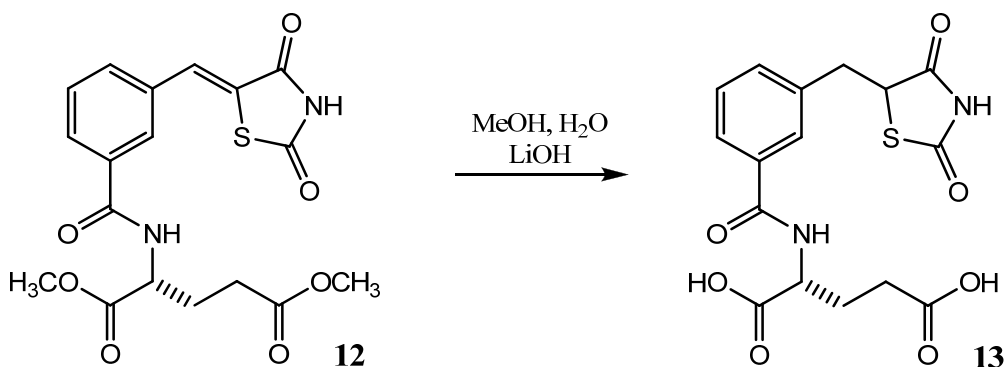


Spojino **12** smo sintetizirali iz spojine **11** (170 mg, 0.419 mmol) po Splošnem postopku za redukcijo dvojne vezi. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF=DKM:MeOH=40:1) in dobili 143 mg (0,350 mmol) rumeno oranžne trdne spojine.

Elementna sestava	C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S	M = 408,43 g/mol
Opis	rumeno oranžna trdna spojina	
Izkoristek	83,56 %	

R <sub>f</sub>	0.45 (MF = DKM:MeOH = 9:1)			
Tališče	43-46° C			
[α] <sub>D</sub>	+ 4,49° (c = 2,67 mg/ml, DMSO)			
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 1.97-2.17 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 2.45-2.51 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> , signal se delno prekriva s signalom za DMSO-d <sub>5</sub> ); 3.19 (dd, 1H, AB sistem, J = 9.3 Hz, J = 14.1 Hz, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH); 3.46 (dd, 1H, AB sistem, J = 4.4 Hz, J = 14.1 Hz, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH); 3.59 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 3.65 (s, 3H, OCH <sub>3</sub> ); 4.43-4.51 (m, 1H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ); 4.92-4.98 (m, 1H, SCHCO); 7.43-7.45 (m, 2H, Ar-H-5,6); 7.77-7.79 (m, 2H, Ar-H-2,4); 8.73 (d, 1H, J = 7.4 Hz, NHCO); 12.07 (s, 1H, CONHCO)			
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3370; 3052; 2951; 2773; 2351; 2292; 1738; 1694; 1644; 1584; 1531; 1484; 1435; 1304; 1259; 1206; 1161; 1102; 810; 730; 697; 661			
MS (ESI)	m/z (%) = 409.1 ([M+H] <sup>+</sup> , 48); 234.0 (100)			
ELEMENTNA ANALIZA		% C	% H	% N
C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S x ½ H <sub>2</sub> O	Izračunano	51.75	4.79	6.71
	Ugotovljeno	51.46	4.83	6.58

#### 4.3.13. Sinteza (2R)-2-(3-((2,4-dioksotiazolidin-5-il)metil)benzamido)pentandiojske kisline (**13**)

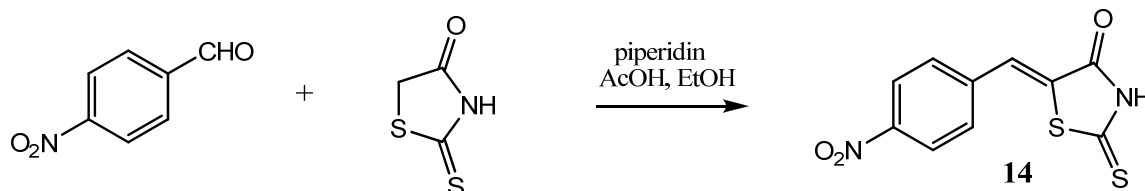


Spojino **13** smo sintetizirali iz spojine **12** (100 mg, 0.245 mmol) po Splošnem postopku za hidrolizo metilnih estrov. Dobili smo 63 mg (0.166 mmol) rumene kristalinične spojine.

Elementna sestava	$C_{16}H_{16}N_2O_7S$	M = 380,44 g/mol		
Opis	rumena kristalinična spojina			
Izkoristek	67,67 %			
Rf	0.00 (MF = DKM:MeOH = 20:1)			
Tališče	54-57° C			
$[\alpha]_D$	+ 6,71° (c = 3,13 mg/ml, DMSO)			
$^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO- $d_6$ )	$\delta$ [ppm] = 1.89-2.16 (m, 2H, CHCH $\underline{H}_2$ CH $\underline{2}$ ); 2.37 (t, 2H, J = 7.4 Hz, CHCH $\underline{2}$ CH $\underline{2}$ ); 3.19 (dd, 1H, AB sistem, J = 9.4 Hz, J = 14.0 Hz, H $_A$ od Ar-CH $\underline{2}$ CH); 3.47 (dd, 1H, J = 4.4 Hz, J = 14.0 Hz, H $_B$ od Ar-CH $\underline{2}$ CH); 4.37-4.45 (m, 1H, CHCH $\underline{2}$ CH $\underline{2}$ ); 4.95 (ddd, 1H, J = 9.4 Hz, J = 4.4 Hz, J = 1.6 Hz, SCHCO); 7.43-7.45 (m, 2H, Ar-H-2,4); 7.77-7.80 (m, 2H, Ar-H-5,6); 8.58 (d, 1H, J = 7.7 Hz, NHCO); 12.07 (s, 1H, CONHCO); 12.40 (s, 2H, COOH)			
IR (KBr)	$\nu$ [ $cm^{-1}$ ] = 3412; 1700; 1654; 1638; 1584; 1534; 1483; 1406; 1328; 1208; 1162; 1100; 1042; 809; 731; 696; 604; 516			
MS (ESI-)	m/z (%) = 381.1 ( $[M+H]^+$ , 85); 236.1 (100)			
HR-MS za $C_{16}H_{17}N_2O_7S$	izračunan: 381.0756, izmerjen: 381.0760			
ELEMENTNA ANALIZA		% C	% H	% N
$C_{16}H_{16}N_2O_7S$ x 1/2 EtOAc ( $C_4H_8O_2$ )	Izračunano	50.89	4.71	6.60
	Ugotovljeno	50.69	5.05	6.60

#### 4.4. Sinteza spojin z daljšo verigo med heterociklom in D-Glu

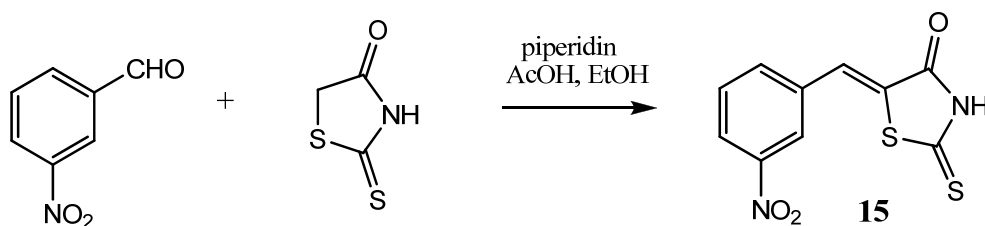
##### 4.4.1. Sinteza (Z)-5-(4-nitrobenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-ona (14)



Spojino **14** smo sintetizirali iz rodanina (500 mg, 3.75 mmol) in 4-nitrobenzaldehida (567 mg, 3.75 mmol) po Splošnem postopku za Knoevenaglovo kondenzacijo. Reakcijo smo ponovili šestkrat in dobili 5,711 g (21,45 mmol) rjavo rdeče kristalinične spojine.

Elementna sestava	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	M = 266,30 g/mol
Opis	rjavo rdeča kristalinična spojina	
Izkoristek	95,33%	
Rf	0.51 (MF = DKM:MeOH = 20:1)	
Tališče	250-253° C	tališče po literaturi (31): 255-256° C
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ[ppm] = 7.74 (s, 1H, ArCH); 7.86 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H-2,6); 8.34 (d, 2H, J = 8.8 Hz, Ar-H-3,5); 13.95 (razširjen s, 1H, CONHCS)	
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3043; 2850; 1717; 1588; 1522; 1446; 1407; 1343; 1285; 1235; 1190; 1060; 1002; 906; 865; 846; 765; 683; 570; 543; 514	

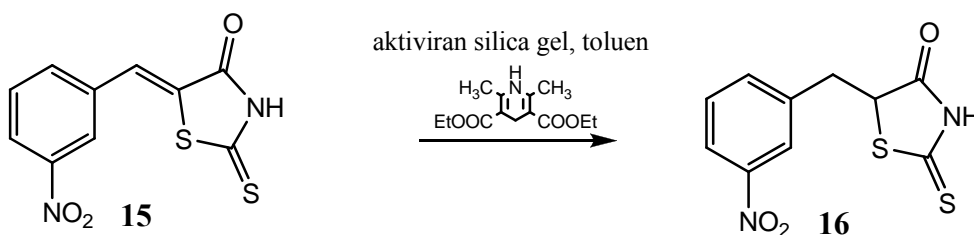
## 4.4.2. Sinteza (Z)-5-(3-nitrobenziliden)-2-tioksotiazolidin-4-ona (15)



Spojino **15** smo sintetizirali iz rodanina (500 mg, 3.75 mmol) in 3-nitrobenzaldehida (567 mg, 3.75 mmol) po Splošnem postopku za Knoevenaglovo kondenzacijo. Reakcijo smo ponovili šestkrat in dobili 5,833 g (21,90 mmol) rumeno rjave kristalinične spojine.

Elementna sestava	$C_{10}H_6N_2O_3S_2$	$M = 266,30 \text{ g/mol}$
Opis	rumeno rjavi kristalinična spojina	
Izkoristek	97,33 %	
Rf	0.41 (MF = DKM:MeOH = 20:1)	
Tališče	263-266° C	tališče po literaturi (31): 269-270° C
$^1\text{H-NMR}$ (300 MHz, DMSO- $d_6$ )	$\delta$ [ppm] = 7.80-7.85 (m, 2H, Ar-H-5 + Ar-CH); 8.00 (d, 1H, $J = 8.1 \text{ Hz}$ , Ar-H-6); 8.30 (ddd, 1H, $J = 8.1 \text{ Hz}$ , $J = 2.0 \text{ Hz}$ , $J = 0.8 \text{ Hz}$ , Ar-H-4); 8.44 (t, 1H, $J = 2.0 \text{ Hz}$ , Ar-H-2); 13.89 (razširjen s, 1H, CONHCS)	
IR (KBr)	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 1697; 1601; 1530; 1405; 1348; 1288; 1225; 1188; 917; 825; 798; 741; 663; 529; 502	

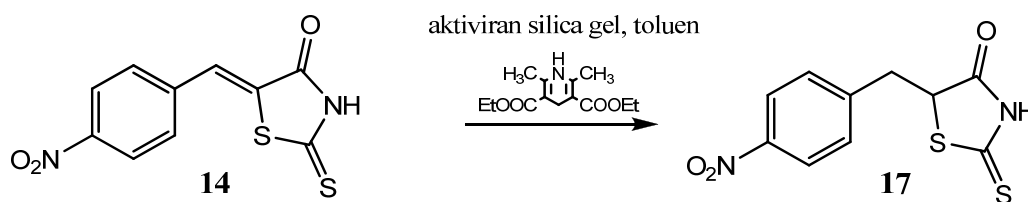
## 4.4.3. Sinteza 5-(3-nitrobenzil)-2-tioksotiazolidin-4-ona (16)



Spojino **16** smo sintetizirali iz spojine **15** (2.00 g, 7.51 mmol) po Splošnem postopku za redukcijo dvojne vezi. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF=DKM:MeOH=40:1) in dobili 1,683 g (6,272 mmol) belo rumene kristalinične spojine.

Elementna sestava	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	M = 268,31 g/mol		
Opis	Belo rumena kristalinična spojina			
Izkoristek	83,50 %			
Rf	0.61 (MF = EtOAc)			
Tališče	165-168° C			
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 3.40 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.1 Hz, <sup>3</sup> J = 7.8 Hz, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.52 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.1 Hz, <sup>3</sup> J = 5.4 Hz, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 5.12 (dd, 1H, J = 8.0 Hz, J = 5.4 Hz, SCHCO), 7.63 (dt, 1H, <sup>3</sup> J = 7.7 Hz, <sup>4</sup> J = 0.8 Hz, Ar-H-5), 7.73 (d, 1H, J = 7.7 Hz, Ar-H-6), 8.12-8.16 (m, 2H, Ar-H-2,4), 13.17 (s, 1H, CSNHCO).			
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3068; 2874; 1718; 1581; 1529; 1454; 1349; 1307; 1269; 1234; 1208; 1103; 1083; 939; 908; 833; 814; 736; 722; 680; 662; 585; 509			
MS (ESI-)	m/z (%) = 267 ([M-H] <sup>-</sup> , 100);			
HR-MS za C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	izračunan: 266.9898, izmerjen: 266.9888			
ELEMENTNA ANALIZA		% C	% H	% N
C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> x 1/20 toluen (C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> )	Izračunano	45.51	3.08	10.26
	Ugotovljeno	45.47	3.14	10.36

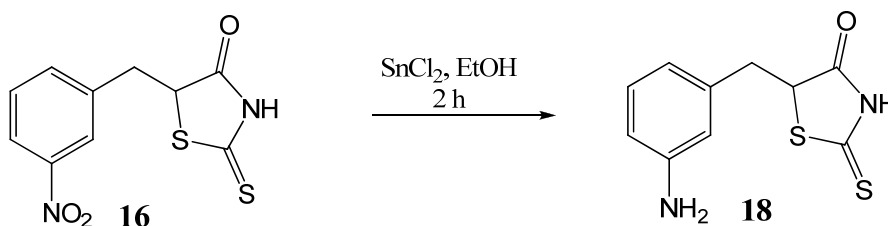
#### 4.4.4. Sinteza 5-(4-nitrobenzil)-2-tioksotiazolidin-4-ona (17)



Spojino **17** smo sintetizirali iz spojine **14** (2.00 g, 7.51 mmol) po Splošnem postopku za redukcijo dvojne vezi. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF=DKM:MeOH=40:1). Reakcijo smo ponovili dvakrat in dobili 2,586 g (9,638 mmol) umazano bele kristalinične spojine.

Elementna sestava	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	M = 268,31 g/mol		
Opis	umazano bela kristalinična spojina			
Izkoristek	64,17 %			
Rf	0.61 (MF = EtOAc); 0.27 (MF = DKM:MeOH = 40:1)			
Tališče	125-128° C			
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 3.38 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.1 Hz, <sup>3</sup> J = 8.3 Hz, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.52 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.1 Hz, <sup>3</sup> J = 5.3 Hz, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 5.12 (dd, 1H, J = 8.3 Hz, J = 5.3 Hz, SCHCO), 7.54 (d, 1H, <sup>3</sup> J = 8.7 Hz, Ar-H-2,6), 8.19 (d, 1H, J = 8.7 Hz, Ar-H-3,5), 13.21 (s, 1H, CSNHCO)			
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 2978; 2932; 1724; 1592; 1559; 1520; 1444; 1369; 1352; 1298; 1223; 1108; 1044; 865; 771; 696; 566			
MS (ESI-)	m/z (%) = 267 ([M-H] <sup>-</sup> , 100)			
HR-MS za C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	izračunan: 266.9898, izmerjen: 266.9890			
ELEMENTNA ANALIZA		% C	% H	% N
C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub> x 3/10 toluen (C <sub>7</sub> H <sub>8</sub> )	Izračunano	49.06	3.51	9.46
	Ugotovljeno	48.96	3.82	9.42

#### 4.4.5. Sinteza 5-(3-aminobenzil)-2-tioksotiazolidin-4-ona (18)

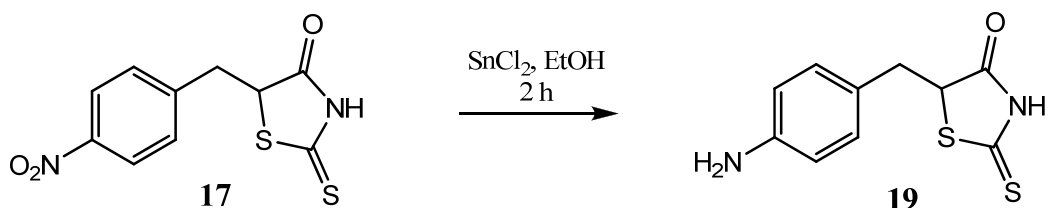




Spojino **18** smo sintetizirali iz spojine **16** (400 mg, 1.49 mmol) po Splošnem postopku za redukcijo aromatske nitro skupine s kositrovim (II) kloridom. Reakcijo smo ponovili trikrat in dobili 1,028 g (4,31 mmol) rumeno rjave trdne spojine.

Elementna sestava	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> OS <sub>2</sub>	M = 238,33 g/mol		
Opis	rumeno rjava trdna spojina			
Izkoristek	96,42 %			
Rf	0.34 (MF = DKM:MeOH = 40:1)			
Tališče	71-74° C			
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 2.96 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.0 Hz, <sup>3</sup> J = 9.7 Hz, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.23 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.0 Hz, <sup>3</sup> J = 4.3 Hz, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 4.93 (dd, 1H, J = 9.7 Hz, J = 4.3 Hz, SCHCO), 6.36-6.46 (m, 3H, Ar-H-2,4,6), 6.95 (t, 1H, J = 7.6 Hz, Ar-H-5), signali za Ar-NH <sub>2</sub> in CSNHCO niso vidni v spektru			
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3414; 2368; 2345; 1618; 1431; 1296; 1254; 1220; 1182; 1066; 863; 778; 723; 618; 475			
MS (ESI-)	m/z (%) = 239 ([M-H] <sup>-</sup> , 30); 77.0 (100), 108 (85)			
HR-MS za C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> N <sub>2</sub> OS <sub>2</sub>	izračunana: 239.0313, izmerjena: 239.0311			
ELEMENTNA ANALIZA		% C	% H	% N
C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> OS <sub>2</sub>	Izračunano	50.36	4.20	11.75
	Ugotovljeno	49.72	4.58	10.80

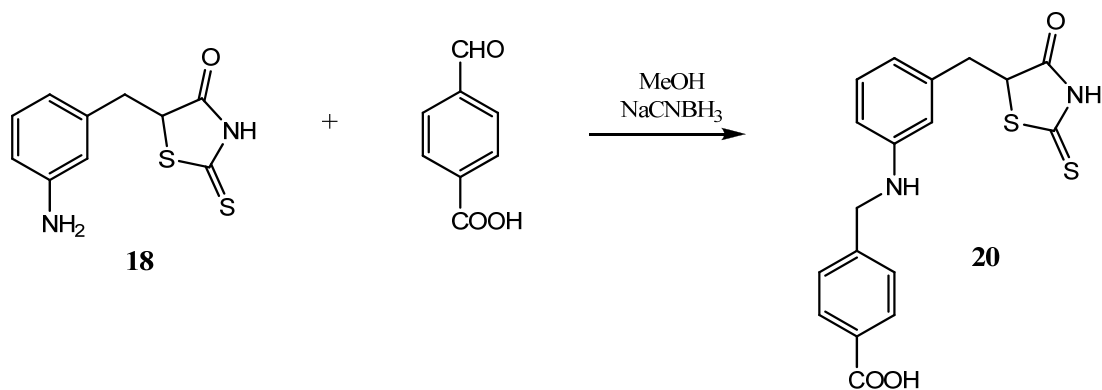
#### 4.4.6. Sinteza 5-(4-aminobenzil)-2-tioksotiazolidin-4-ona (**19**)



Spojino **19** smo sintetizirali iz spojine **17** (700 mg, 2.61 mmol) po Splošnem postopku za redukcijo aromatske nitro skupine. Sledila je prekrystalizacija iz MeOH in dobili smo 119 mg (0,499 mmol) produkta.

Elementna sestava	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> OS <sub>2</sub>	M = 238,33 g/mol		
Opis	Rumeno oranžna kristalinična spojina			
Izkoristek	31,99 %			
Rf	0.21 (MF = DKM:MeOH = 40:1)			
Tališče	174-177° C			
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 2.96 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.2 Hz, <sup>3</sup> J = 9.0 Hz, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.18 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.2 Hz, <sup>3</sup> J = 4.5 Hz, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 4.90 (dd, 1H, J = 9.0 Hz, J = 4.5 Hz, SCHCO), 6.48 (d, 1H, <sup>3</sup> J = 8.4 Hz, Ar-H-3,5), 6.87 (d, 1H, J = 8.4 Hz, Ar-H-2,6), signali za Ar-NH <sub>2</sub> in CSNHCO niso vidni v spektru			
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3355; 3290; 2614; 1718; 1611; 1516; 1481; 1297; 1238; 1194; 1180; 1069; 964; 913; 866; 837; 800; 771; 729; 689; 650; 565; 502			
MS (ESI+)	m/z (%) = 239 ([M+H] <sup>+</sup> , 88); 107.1 (100)			
ELEMENTNA ANALIZA C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> OS <sub>2</sub>		% C	% H	% N
	Izračunano	50.40	4.23	11.75
	Ugotovljeno	50.54	4.21	11.54

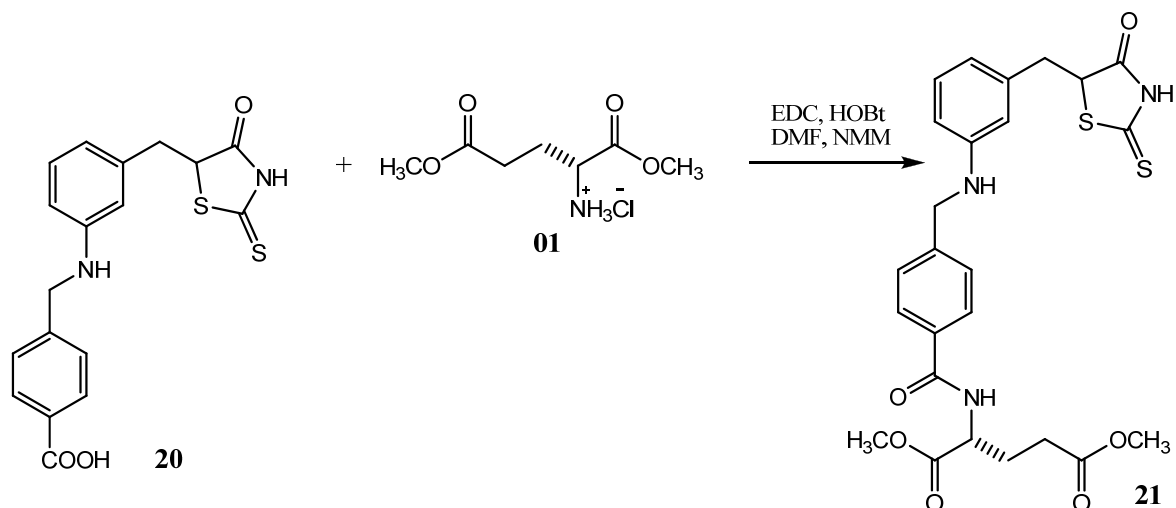
#### 4.4.6. Sinteza 4-((3-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil) benzojske kisline (20)



Spojino **20** smo sintetizirali iz spojine **18** (500 mg, 2.10 mmol) in 4-karboksibenzaldehida (315 mg, 2.10 mmol) po Splošnem postopku za reduktivno aminiranje. Surovi produkt smo čistili s kolonsko kromatografijo (MF=DKM:MeOH=20:1) in dobili 349 mg (0,938 mmol) rumene kristalinične spojine.

Elementna sestava	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	M = 372,46 g/mol		
Opis	rumena kristalinična spojina			
Izkoristek	44,67 %			
Rf	0.39 (MF = DKM:MeOH = 9:1)			
Tališče	79-82° C			
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 2.97 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.0 Hz, <sup>3</sup> J = 9.8 Hz, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.23 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.0 Hz, <sup>3</sup> J = 4.2 Hz, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 4.32 (s, 2H, CH <sub>2</sub> NH), 4.93 (dd, 1H, J = 9.8 Hz, J = 4.2 Hz, SCHCO), 6.36-6.46 (m, 4H, Ar-H-2,4,6, CH <sub>2</sub> NH), 6.97 (t, 1H, <sup>3</sup> J = 7.7 Hz, Ar-H-5), 7.45 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Ar-H-2',6'), 7.89 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Ar-H-3',5'), 12.79 (s, 1H), 13.13 (s, 1H)			
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 2852; 1686; 1605; 1426; 1222; 1176; 1069; 844; 763; 694; 670; 498			
MS (ESI+)	m/z (%) = 373.1 ([M+H] <sup>+</sup> , 94); 355.1 (100)			
ELEMENTNA		% C	% H	% N
ANALIZA	Izračunano	58.04	4.33	7.52
C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub>	ugotovljeno	57.72	4.47	7.68

**4.4.7. Sinteza (2R)-dimetil 2-(4-((3-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil)benzamido)pentandioata (21)**

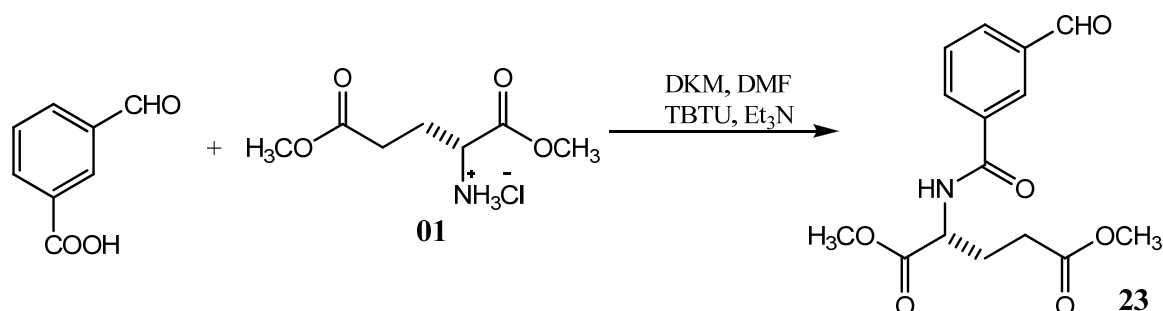


Spojino **21** smo sintetizirali iz H-D-Glu(OMe)-OMe HCl (156 mg, 0.739 mmol) in spojine **20** (275 mg, 0.739 mmol) po Splošnem postopku za tvorbo amidne vezi z EDC/HOBt metodo. Dobili smo 86 mg (0,162 mmol) rumene kristalinične spojine.

Elementna sestava	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	M = 529,63 g/mol
Opis	rumena kristalinična spojina	
Izkoristek	21,92 %	
Rf	0.32 (MF = DKM:MeOH = 40:1)	
Tališče	114-117° C	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 1.94-2.18 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.45 (t, 2H, <i>J</i> = 7.5 Hz, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.97 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> <i>J</i> = 14.1 Hz, <sup>3</sup> <i>J</i> = 9.8 Hz, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.24 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> <i>J</i> = 14.1 Hz, <sup>3</sup> <i>J</i> = 4.3 Hz, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.58 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.64 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.32 (d, 2H, <i>J</i> = 5.0 Hz, CH <sub>2</sub> NH), 4.42-4.49 (m, 1H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 4.93 (dd, 1H, <i>J</i> = 9.8 Hz, <i>J</i> = 4.3 Hz, SCHCO), 6.33 (t, 1H, <i>J</i> = 6.2 Hz, CH <sub>2</sub> NH), 6.38-6.44 (m, 2H, Ar-H-4,6), 6.48 (s, 1H, Ar-H-2), 6.97 (t, 1H, <i>J</i> = 7.8 Hz, Ar-H-5), 7.44 (d, 2H, <i>J</i> = 8.3 Hz, Ar-H-2',6'), 7.82 (d, 2H, <i>J</i> = 8.3 Hz, Ar-H-3',5'), 8.66 (d, 2H, <i>J</i> = 7.5 Hz, CONH), 13.14 (br s, 1H, CSNHCO)	

IR (KBr)	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3419; 3340; 3251; 2948; 1742; 1637; 1607; 1526; 1499; 1437; 1337; 1281; 1217; 1181; 1108; 1070; 1018; 986; 837; 768; 699; 500;			
MS (ESI+)	m/z (%) = 530.1 ( $[\text{M}+\text{H}]^+$ , 100)			
ELEMENTNA ANALIZA		% C	% H	% N
$\text{C}_{25}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}_2$	Izračunano	56.69	5.14	7.93
	ugotovljeno	56.99	4.83	7.91

#### 4.4.8. Sinteza (2R)-dimetil 2-(3-formilbenzamido)pentan-1,5-dioata (23)

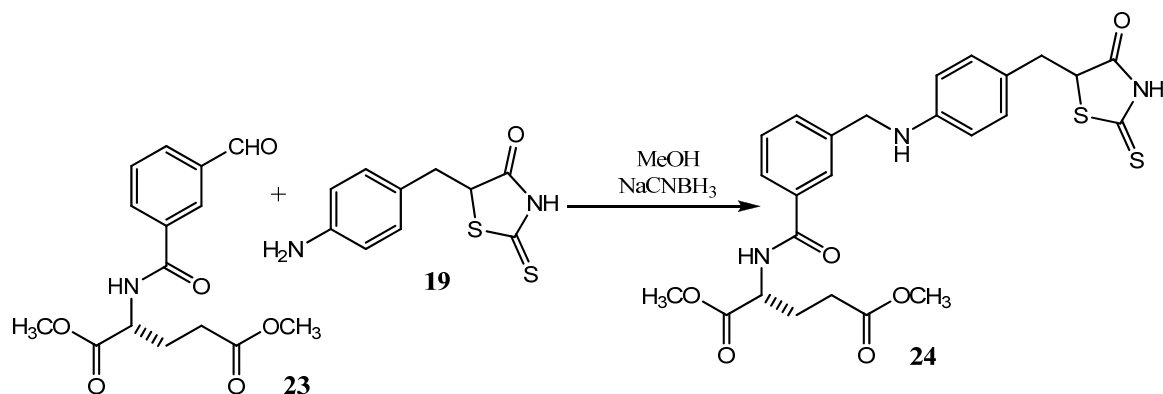


H-D-Glu(OMe)-OMe HCl (423 mg, 2.00 mmol) in 3-karboksibenzaldehid (300 mg, 2.00 mmol) smo raztopili v DKM (10 ml) in dodali malo DMF. Nato smo dodali še  $\text{Et}_3\text{N}$  (5.99 mmol, 0.831 ml) in reakcijsko zmes postavili na ledeno kopel (1 ura). Dodali smo še TBTU (2.20 mmol, 706 mg). Po eni uri smo ledeno kopel odstranili in pustili mešati pri sobni temperaturi. Ko je reakcija potekla, smo topilo odparili pod znižanim tlakom in produkt raztopili v EtOAc ter naredili ekstrakcijo z citronsko kislino (3x40 mL), nasičeno  $\text{NaHCO}_3$  (3x40 mL) in NaCl (1x50 ml). Organsko fazo smo sušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in in topilo odparili pod znižanim tlakom. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF=DKM:MeOH=40:1). Dobili smo 385 mg (1,254 mmol) oljnatega produkta **23**.

Elementna sestava	$\text{C}_{15}\text{H}_{17}\text{NO}_6$	M = 307,30 g/mol
Opis	oljnata spojina	
Izkoristek	62,68 %	
Rf	0.40 (MF = DKM:MeOH = 40:1)	
$[\alpha]_{\text{D}}$	+ 1,28° (c = 2,35 mg/ml, DMSO)	

<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 1.97-2.21 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.48 (t, 2H, , J = 7.5 Hz, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 3.59 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.66 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.48-4.55 (m, 1H, CH), 7.73 (t, 1H, J = 7.7 Hz, H-5), 8.10 (dt, 1H, <sup>3</sup> J = 7.7 Hz, <sup>4</sup> J = 1.4 Hz, Ar-H-4/6), 8.19 (dt, 1H, <sup>3</sup> J = 7.7 Hz, <sup>4</sup> J = 1.4 Hz, Ar-H-4/6), 8.42 (t, 1H, J = 1.4 Hz, Ar-H-2), 9.01 (d, 1H, J = 7.5 Hz, NH), 10.09 (s, 1H, CHO)
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3412; 3312; 2954; 2849; 2364; 1734; 1702; 1636; 1524; 1337; 1415; 1374; 1304; 1265; 1200; 1166; 1104; 1080; 980; 945; 902; 882; 829; 814; 780; 767; 749; 678; 668; 650
MS (ESI)	m/z (%) = 308.1 ([M+H] <sup>+</sup> , 26); 105.0 (100)
HR-MS za C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>6</sub>	izračunan: 308.1134, izmerjen: 308.1126

#### 4.4.9. Sinteza (2R)-dimetil 2-(3-((4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil)benzamido)pentandioata (24)

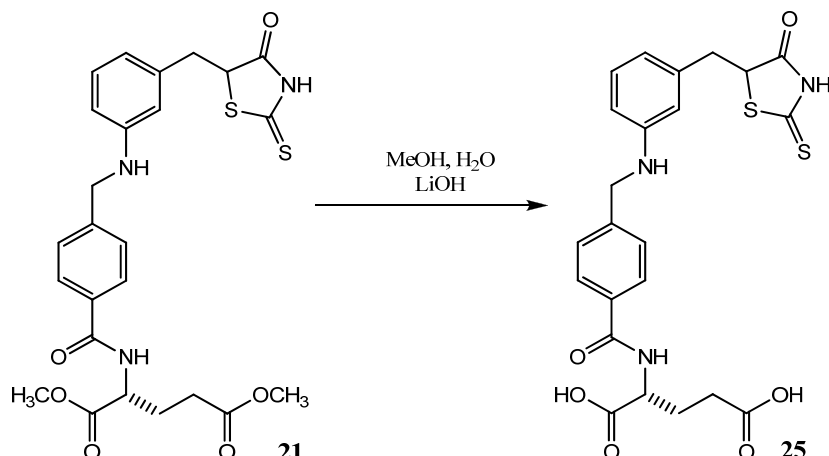


Spojino **24** smo sintetizirali iz spojine **23** (193 mg, 0.630 mmol) in spojine **19** (150 mg, 0.630 mmol) po Splošnem postopku za reduktivno aminiranje. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF=DKM:MeOH=20:1) in dobili 163 mg (0,308 mmol) rumene kristalinične spojine.

Elementna sestava	C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	M = 529,63 g/mol
Opis	Rumena kristalinična spojina	
Izkoristek	48,91 %	
Rf	0.35 (MF = DKM:MeOH = 20:1)	

Tališče	54-57° C			
$[\alpha]_D$	+ 3,50° (c = 2,0 mg/ml, DMSO)			
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	$\delta$ [ppm] = 1.97-2.16 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.46 (t, 2H, $J$ = 7.6 Hz, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.96 (dd, 1H, AB sistem, $^2J$ = 14.2 Hz, $^3J$ = 9.1 Hz, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.19 (dd, 1H, AB sistem, $^2J$ = 14.2 Hz, $^3J$ = 4.3 Hz, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.59 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.65 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.29 (d, 2H, $J$ = 5.4 Hz, CH <sub>2</sub> NH), 4.44-4.48 (m, 1H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 4.90 (dd, 1H, $J$ = 9.1 Hz, $J$ = 4.3 Hz, SCHCO), 6.24 (t, 1H, $J$ = 6.0 Hz, CH <sub>2</sub> NH), 6.52 (d, 2H, $J$ = 8.5 Hz, Ar-H-3,5), 6.92 (d, 2H, $J$ = 8.5 Hz, Ar-H-2,6), 7.42 (t, 1H, $J$ = 7.6 Hz, Ar-H-5'), 7.52 (d, 1H, $J$ = 7.6 Hz, Ar-H-6'), 7.74 (d, 1H, $J$ = 7.6 Hz, Ar-H-4'), 7.98 (s, 1H, Ar-H-2'), 8.72 (d, 1H, $J$ = 7.5 Hz, CONH), 13.09 (br s, 1H, CSNHCO)			
IR (KBr)	$\nu$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3401; 2950; 2849; 2346; 1735; 1640; 1616; 1586; 1522; 1482; 1436; 1324; 1294; 1263; 1219; 1181; 1101; 1069; 927; 816; 745; 688; 562; 475			
MS (ESI)	m/z (%) = 530,1 ([M+H] <sup>+</sup> , 68); 141.0 (100)			
ELEMENTNA ANALIZA		% C	% H	% N
C <sub>25</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	Izračunano	56.69	5.14	7.93
	Ugotovljeno	56.66	5.15	7.69

**4.4.10. Sinteza (2*R*)-2-(4-((3-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil)benzamido)pentandiojske kisline (25)**



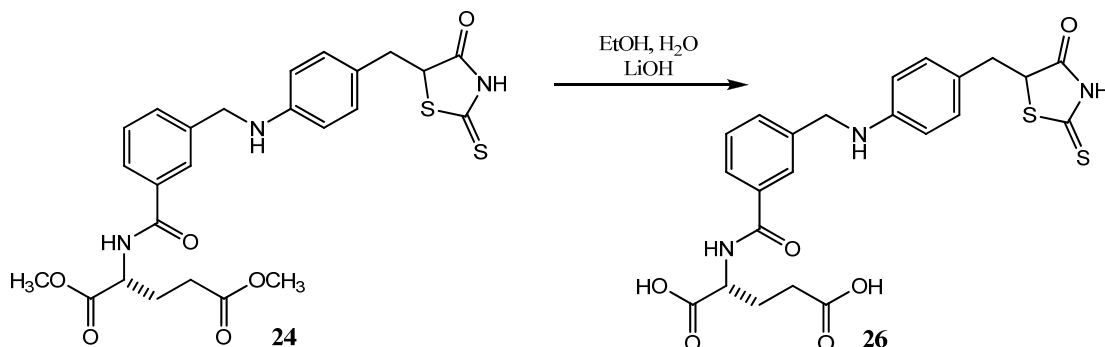
Spojino **25** smo sintetizirali iz spojine **21** (60 mg, 0.133 mmol) po Splošnem postopku za hidrolizo metilnih estrov. Dobili smo 54 mg (0.108 mmol) rumene kristalinične spojine.

Elementna sestava	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	M = 501,58 g/mol
Opis	rumena kristalinična spojina	
Izkoristek	95,38 %	
Rf	0.00 (MF = DKM:MeOH = 20:1)	
Tališče	89-92° C	
[α] <sub>D</sub>	- 2,24° (c = 3,13 mg/ml, DMSO)	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 1.90-2.13 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.35 (t, 2H, <i>J</i> = 7.4 Hz, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.97 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> <i>J</i> = 14.2 Hz, <sup>3</sup> <i>J</i> = 9.7 Hz, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.24 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> <i>J</i> = 14.2 Hz, <sup>3</sup> <i>J</i> = 4.2 Hz, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 4.31 (s, 2H, CH <sub>2</sub> NH), 4.36-4.43 (m, 1H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 4.94 (dd, 1H, <i>J</i> = 9.7 Hz, <i>J</i> = 4.2 Hz, SCHCO), 6.37-6.44 (m, 2H, Ar-H-4,6), 6.49 (s, 1H, Ar-H-2), 6.97 (t, 1H, <i>J</i> = 7.8 Hz, Ar-H-5), 7.44 (d, 2H, <i>J</i> = 8.2 Hz, Ar-H-2',6'), 7.83 (d, 2H, <i>J</i> = 8.2 Hz, Ar-H-3',5'), 8.52 (d, 2H, <i>J</i> = 7.7 Hz, CONH), 12.46 (br s, 2H, COOH), 13.15 (s, 1H, CSNHCO), signal za CH <sub>2</sub> NH ni viden v spektru	



IR (KBr)	v [cm <sup>-1</sup> ] = 2926; 2060; 1735; 1607; 1542; 1438; 1184; 1071; 696			
MS (ESI)	m/z (%) = 500.1 ([M-H] <sup>-</sup> , 100)			
HR-MS za C <sub>23</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	izračunan: 500.0963, izmerjen: 500.0950			
ELEMENTNA ANALIZA		% C	% H	% N
C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	Izračunano	55.08	4.62	8.38
	Ugotovljeno	55.11	4.88	7.38

#### 4.4.11. Sinteza (2*R*)-2-(3-((4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil)benzamido)pentandiojske kisline (26)

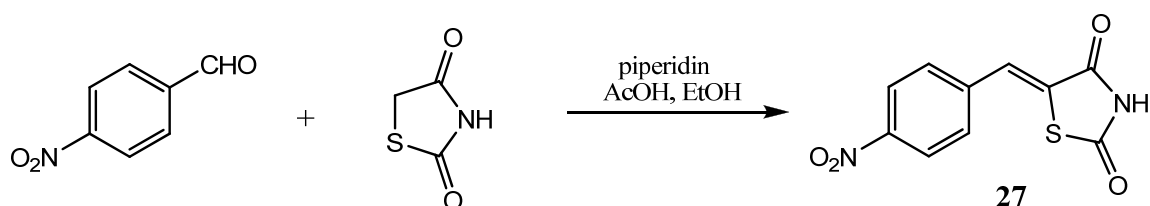


Spojino **26** smo sintetizirali iz spojine **24** (88 mg, 0.166 mmol) po Splošnem postopku za hidrolizo metilnih estrov. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF=DKM:MeOH=7:1) in dobili 48 mg (0,0958 mmol) rumene kristalinične spojine.

Elementna sestava	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	M = 501,58 g/mol
Opis	rumena kristalinična spojina	
Izkoristek	57,72 %	
R <sub>f</sub>	0.00 (MF = DKM:MeOH = 20:1)	
Tališče	108-111° C	
[α] <sub>D</sub>	+ 6,36° (c = 2,2 mg/ml, DMSO)	

<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 1.91-2.14 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.36 (t, 2H, <i>J</i> = 7.4 Hz, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.71 (m, 1H, AB sistem, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.19 (m, 1H, AB sistem, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 4.03-4.10 (m, 1H, CH), 4.28 (s, 2H, CH <sub>2</sub> NH), 4.37-4.44 (m, 1H, CH), 6.16-6.27 (m, 1H, CH <sub>2</sub> NH), 6.51 (t, 2H, <i>J</i> = 8.5 Hz, Ar-H-3,5), 6.89-6.93 (m, 2H, Ar-H-2,6), 7.41 (t, 1H, <i>J</i> = 7.7 Hz, Ar-H-5'), 7.51 (d, 1H, <i>J</i> = 7.7 Hz, Ar-H-6'), 7.75 (d, 1H, <i>J</i> = 6.9 Hz, Ar-H-4'), 7.88 (s, 1H, Ar-H-2'), 8.56 (d, 1H, <i>J</i> = 7.7 Hz, CONH), 12.41 (br s, 3H, CSNHCO, COOH)			
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3412; 2924; 2059; 1719; 1638; 1618; 1585; 1522; 1483; 1438; 1409; 1184; 1101; 1072; 1020; 816; 748; 693; 610; 558; 477			
MS (ESI)	m/z (%) = 502.1 ([M+H] <sup>+</sup> , 47); 461.1 (100)			
HR-MS za C <sub>23</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	izračunan: 502.1107, izmerjen: 502.1115			
ELEMENTNA ANALIZA C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> x3,5 H <sub>2</sub> O		% C	% H	% N
	Izračunano	53.13	4.78	7.44
	Ugotovljeno	53.53	4.98	7.00

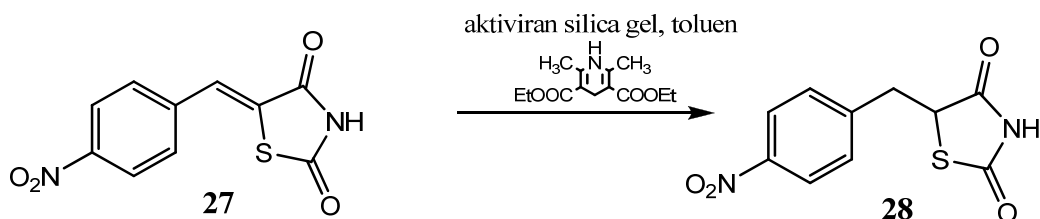
#### 4.4.12. Sinteza 5-(4-nitrobenziliden)tiazolidin-2,4-diona (27)



Spojino **27** smo sintetizirali iz tiazolidin-2,4-diona (645 mg, 4.27 mmol) in 4-nitrobenzaldehida (500 mg, 4.27 mmol) po Splošnem postopku za Knoevenaglovo kondenzacijo. Reakcijo smo ponovili petkrat in na koncu dobili 2,815 g (11,25 mmol) rjave kristalinične spojine.

Elementna sestava	C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	M = 250,23 g/mol
Opis	rjava kristalinična spojina	
Izkoristek	52,69 %	
Rf	0.34 (MF = DKM:MeOH = 20:1)	
Tališče	276-279° C tališče po literaturi(32): 280° C	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 7.86 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar-H-2,6), 7.90 (s, 1H, CH), 8.34 (d, 2H, J = 8.7 Hz, Ar-H-3,5), 12.8 (s, 1H, NH)	
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3259; 1716; 1609; 1508; 1344; 1310; 1138; 1107; 1009; 920; 868; 844; 756; 731; 692; 664; 604; 564	

#### 4.4.13. Sinteza 5-(4-nitrobenzil)-2,4-tiazolidindion (28)

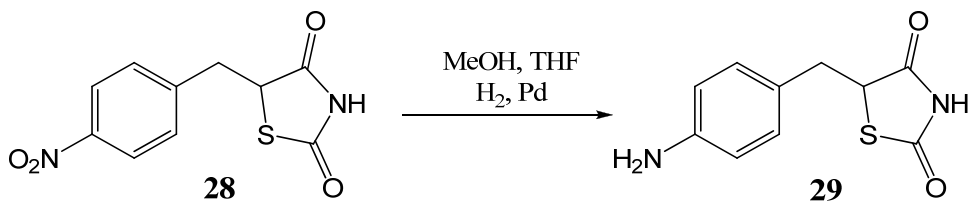


Spojino **28** smo sintetizirali iz spojine **27** (1.00 g, 3.995 mmol) po Splošnem postopku za redukcijo dvojne vezi. Dobili smo 0.801 g (3.175 mmol) svetlo rjave spojine.

Elementna sestava	C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	M = 252,25 g/mol
Opis	svetlo rjava spojina	
Izkoristek	79,47 %	
Rf	0.24 (MF = DKM:MeOH = 40:1)	
Tališče	178-181° C	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 3.36 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 8.6 Hz, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH, signal se delno prekriva s signalom za H <sub>2</sub> O), 3.52 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.1 Hz, <sup>3</sup> J = 4.9 Hz, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 5.01 (dd, 1H, J = 8.6 Hz, J = 4.9 Hz, SCHCO), 7.55 (d, 1H, <sup>3</sup> J = 8.6 Hz, Ar-H-2,6), 8.20 (d, 1H, J = 8.6 Hz, Ar-H-3,5), 12.09 (s, 1H, CONHCO)	

IR (KBr)	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3255; 1759; 1743; 1700; 1597; 1512; 1448; 1347; 1314; 1264; 1224; 1175; 1138; 1108; 1040; 956; 924; 865; 852; 745; 719; 698; 661; 601; 541; 481			
MS (ESI)	m/z (%) = 251 ([M-H] <sup>-</sup> , 13); 77(100)			
HR-MS C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	za	izračunan: 253.0283, izmerjen: 253.0282		
ELEMENTNA ANALIZA C <sub>10</sub> H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S		% C	% H	% N
	Izračunano	47.61	3.20	11.11
	Ugotovljeno	48.50	3.11	10.95

#### 4.4.14. Sinteza 5-(4-aminobenzil)tiazolidin-2,4-diona (29)

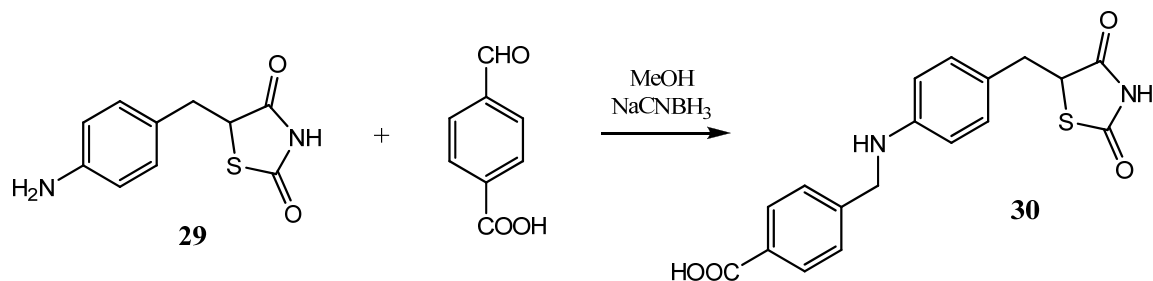


Spojino **28** (500 mg, 1.982 mmol) smo raztopili v mešanici topil MeOH:THF=1:1. Raztopino smo prepihali z argonom in dodali katalizator Pd (50 %). Reakcijsko zmes smo prepihali še z H<sub>2</sub> in nato opremili bučko z balonom napolnjenim z H<sub>2</sub> in mešali pri sobni temperaturi preko noči. Katalizator smo odfiltrirali in topilo odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 379 mg (1,71 mmol) umazano bele spojine **29**.

Elementna sestava	C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S	M = 222,26 g/mol
Opis	umazano bela spojina	
Izkoristek	44,67 %	
Rf	0.32 (MF = DKM:MeOH = 20:1)	
Tališče	154-157° C	

<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	$\delta$ [ppm] = 2.89 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.1 Hz, <sup>3</sup> J = 9.3 Hz, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.20 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.1 Hz, <sup>3</sup> J = 4.1 Hz, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 4.74 (dd, 1H, J = 9.3 Hz, J = 4.1 Hz, SCHCO), 6.49 (d, 1H, <sup>3</sup> J = 8.3 Hz, Ar-H-3,5), 6.87 (d, 1H, J = 8.3 Hz, Ar-H-2,6), signali za Ar-NH <sub>2</sub> in CONHCO niso vidni v spektru			
IR (KBr)	$\nu$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3381; 3316; 2928; 2686; 1740; 1694; 1614; 1694; 1614; 1516; 1442; 1314; 1251; 1224; 1156; 1038; 1020; 938; 883; 841; 806; 737; 711; 666; 648; 601; 563; 505; 486			
MS (EI)	m/z (%) = 222 (M <sup>+</sup> , 31); 106 (100)			
ELEMENTNA ANALIZA C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S		% C	% H	% N
	Izračunano	53.98	4.50	12.60
	Ugotovljeno	54.11	4.41	12.30

#### 4.4.15. Sinteza 4-((4-((2,4-dioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil) benzojske kisline (30)

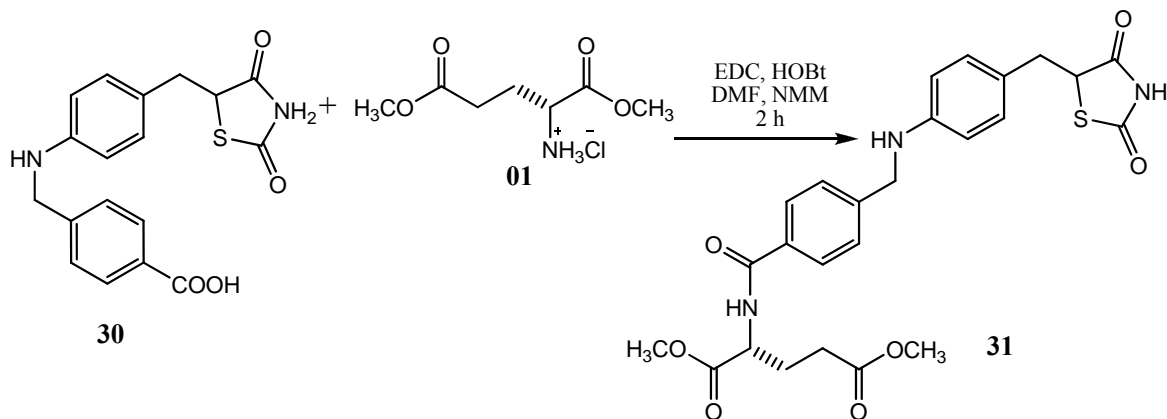


Spojino **30** smo sintetizirali iz spojine **29** (300 mg, 1.35 mmol) in 4-formilbenzojske kisline (203 mg, 1.35 mmol) po Splošnem postopku za reduktivno aminiranje. Dobili smo 343 mg (0.963 mmol) umazano bele spojine.

Elementna sestava	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	M = 356,40 g/mol
Opis	umazano bela spojina	
Izkoristek	71,37 %	
Rf	0.33 (MF = DKM:MeOH = 20:1)	
Tališče	255-258° C	

<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 2.90 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.1 Hz, <sup>3</sup> J = 9.4 Hz, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.20 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.1 Hz, <sup>3</sup> J = 4.1 Hz, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 4.31 (s, 2H, CH <sub>2</sub> NH), 4.77 (dd, 1H, J = 9.4 Hz, J = 4.1 Hz, SCHCO), 6.28 (t, 1H, J = 4.9 Hz, CH <sub>2</sub> NH), 6.50 (d, 2H, J = 8.5 Hz, Ar-H-3,5), 6.92 (d, 2H, J = 8.5 Hz, Ar-H-2,6), 7.46 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Ar-H-2',6'), 7.89 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Ar-H-3',5'), 12.02 (br s, 1H), 12.75 (br s, 1H)			
IR (KBr)	ν [cm <sup>-1</sup> ] = 3377; 3048; 1752; 1685; 1608; 1578; 1512; 1471; 1427; 1320; 1298; 1165; 1018; 942; 886; 806; 767; 724; 701; 669; 605; 550; 504			
MS (ESI+)	m/z (%) = 357.1 ([M+H] <sup>+</sup> , 30); 141.0 (100)			
ELEMENTNA ANALIZA		% C	% H	% N
C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S x 1/5 H <sub>2</sub> O	Izračunano	60.00	4.55	7.77
	Ugotovljeno	60.04	4.25	7.67

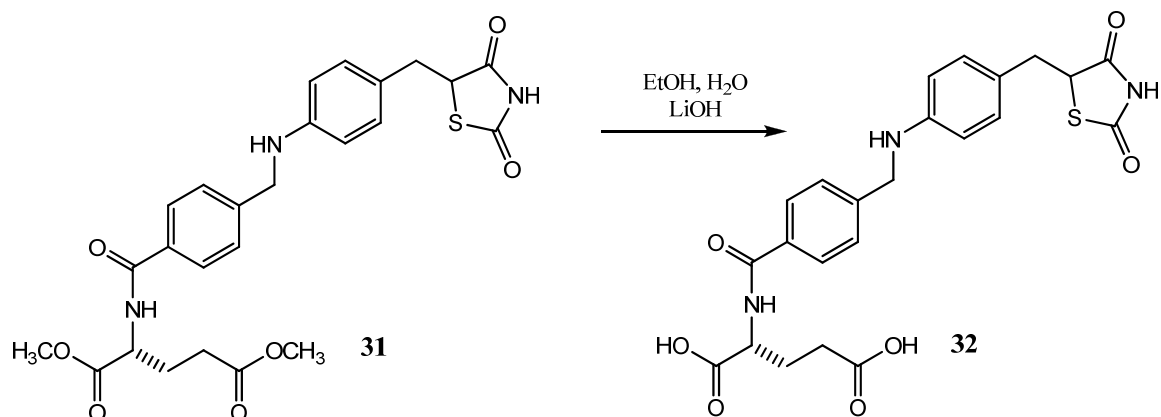
#### 4.4.16. Sinteza (2R)-dimetil 2-(4-((4-((2,4-dioxotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil)benzamido)pentandioata (31)



Spojino **31** smo sintetizirali iz H-D-Glu(OMe)-OMe HCl (178 mg, 0.843 mmol) in spojine **30** (300 mg, 0.843 mmol) po Splošnem postopku za tvorbo amidne vezi z EDC/HOBt metodo. Dobili smo 279 mg (0.544 mmol) rumene kristalinične spojine.

Elementna sestava	$C_{25}H_{27}N_3O_7S$	M = 513,56 g/mol		
Opis	rumena kristalinična spojina			
Izkoristek	64,51 %			
Rf	0.52 (MF = DKM:MeOH = 9:1)			
Tališče	66-69° C			
$[\alpha]_D$	+ 9,22° (c = 2,93 mg/ml, DMSO)			
$^1H$ -NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	$\delta$ [ppm] = 1.94-2.18 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.45 (t, 2H, J = 7.5 Hz, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.90 (dd, 1H, AB sistem, $^2J$ = 14.2 Hz, $^3J$ = 9.4 Hz, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.20 (dd, 1H, AB sistem, $^2J$ = 14.2 Hz, $^3J$ = 4.1 Hz, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.58 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 3.64 (s, 3H, CH <sub>3</sub> ), 4.31 (d, 2H, J = 5.8 Hz, CH <sub>2</sub> NH), 4.42-4.49 (m, 1H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 4.77 (dd, 1H, J = 9.4 Hz, J = 4.1 Hz, SCHCO), 6.28 (t, 1H, J = 6.0 Hz, CH <sub>2</sub> NH), 6.49 (d, 2H, J = 8.5 Hz, Ar-H-3,5), 6.91 (d, 2H, J = 8.5 Hz, Ar-H-2,6), 7.44 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Ar-H-2',6'), 7.82 (d, 2H, J = 8.3 Hz, Ar-H-3',5'), 8.67 (d, 2H, J = 7.5 Hz, CONH), 11.94 (br s, 1H, CONHCO)			
IR (KBr)	$\nu$ [cm <sup>-1</sup> ] = 3552; 3409; 3234; 3026; 2952; 2851; 2775; 2345; 1741; 1700; 1654; 1639; 1615; 1571; 1560; 1523; 1500; 1438; 1413; 1327; 1265; 1214; 1155; 1017; 820; 753; 714; 603; 563; 492			
MS (ESI+)	m/z (%) = 512.1 ([M-H] <sup>-</sup> , 100)			
ELEMENTNA		% C	% H	% N
ANALIZA	Izračunano	58.47	5.30	8.18
$C_{25}H_{27}N_3O_7S$	Ugotovljeno	58.14	5.35	8.14

**4.4.17. Sinteza (2*R*)-2-(4-((4-((2,4-dioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil)benzamido)pentandiojske kisline (32)**



Spojino **32** smo sintetizirali iz spojine **31** (200 mg, 0.390 mmol) po Splošnem postopku za hidrolizo metilnih estrov. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF=DKM:MeOH=7:1) in dobili 139 mg (0.287 mmol) rumene kristalinične spojine.

Elementna sestava	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S <sub>1</sub>	M = 485,51 g/mol
Opis	rumena kristalinična spojina	
Izkoristek	73,49 %	
Rf	0.00 (MF = DKM:MeOH = 7:1)	
Tališče	112-115° C	
[α] <sub>D</sub>	- 9,29° (c = 2,8 mg/ml, DMSO)	
<sup>1</sup> H-NMR (300 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ [ppm] = 1.90-2.13 (m, 2H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.35 (t, 2H, J = 7.4 Hz, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 2.90 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.1 Hz, <sup>3</sup> J = 9.4 Hz, H <sub>A</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 3.20 (dd, 1H, AB sistem, <sup>2</sup> J = 14.1 Hz, <sup>3</sup> J = 4.1 Hz, H <sub>B</sub> od Ar-CH <sub>2</sub> CH), 4.31 (s, 2H, CH <sub>2</sub> NH), 4.36-4.43 (m, 1H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ), 4.77 (dd, 1H, J = 9.4 Hz, J = 4.1 Hz, SCHCO), 6.28 (s, 1H, CH <sub>2</sub> NH), 6.50 (d, 2H, J = 8.5 Hz, Ar-H-3,5), 6.91 (d, 2H, J = 8.5 Hz, Ar-H-2,6), 7.44 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Ar-H-2',6'), 7.82 (d, 2H, J = 8.2 Hz, Ar-H-3',5'), 8.51 (d, 2H, J = 7.7 Hz, CONH), 12.25 (br s, 3H, CONHCO, COOH)	

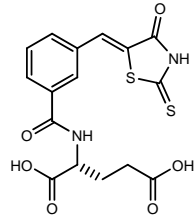
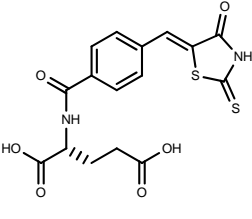
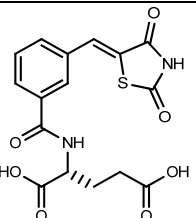
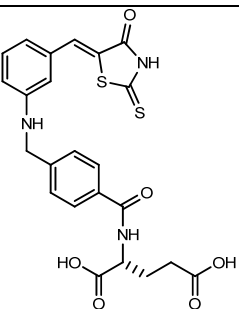


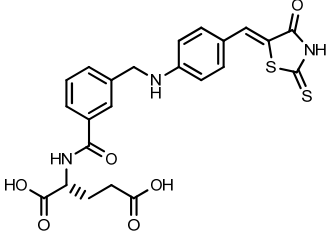
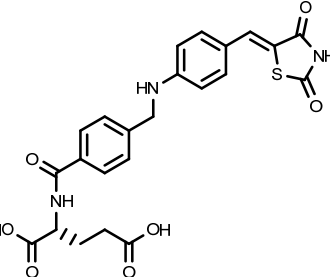
IR (KBr)	$\nu$ [ $\text{cm}^{-1}$ ] = 3410; 3031; 2925; 2346; 1694; 1639; 1616; 1522; 1438; 1410; 1326; 1263; 1215; 1153; 1017; 813; 753; 662; 603; 562; 474			
MS (ESI-)	m/z (%) = 484.1 ( $[\text{M}-\text{H}]^-$ , 100)			
ELEMENTNA		% C	% H	% N
ANALIZA	Izračunano	54.33	4.53	8.27
$\text{C}_{23}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_7\text{S} \times 1\frac{1}{2}$	Ugotovljeno	54.46	4.79	8.20
$\text{H}_2\text{O}$				

## 5. REZULTATI IN RAZPRAVA

Pri načrtovanju novih potencialnih inhibitorjev MurD in MurE smo izhajali iz spojin s 5-benzilidentiazolidin-4-onskim fragmentom, ki so znani inhibitorji teh encimov (Preglednica I). Pri tem smo želeli proučiti, kako vpliva na aktivnost spojine redukcija dvojne vezi v 5-benzilidentiazolidin-4-onskem fragmentu inhibitorjev ligaze MurD.

**Preglednica I:** Prikaz aktivnosti znanih 5-benzilidentiazolidin-4-onskih inhibitorjev ligaz MurD in MurE.

STRUKTURA	c ( $\mu\text{M}$ )	MurD <i>E. coli</i> RA (%)	MurE <i>S.aureus</i> RA (%)
 <p style="text-align: right;"><b>I</b></p>	250	<b>30</b>	<b>67</b>
 <p style="text-align: right;"><b>II</b></p>	250	<b>IC<sub>50</sub> = 45 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>98</b>
 <p style="text-align: right;"><b>III</b></p>	250	<b>96</b>	<b>83</b>
 <p style="text-align: right;"><b>IV</b></p>	250	<b>IC<sub>50</sub> = 174 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>96</b>

 <p style="text-align: center;"><b>V</b></p>	250	<b>IC<sub>50</sub> = 45 μM</b>	<b>15</b>
 <p style="text-align: center;"><b>VI</b></p>	250	<b>70</b>	<b>27</b>

## 5.1. Sinteza novih potencialnih inhibitorjev encimov MurD in MurE s 5-benziltiazolidin-4-onskim fragmentom

### 5.1.1. Uvedba zaščitne skupine na D-glutaminsko kislino

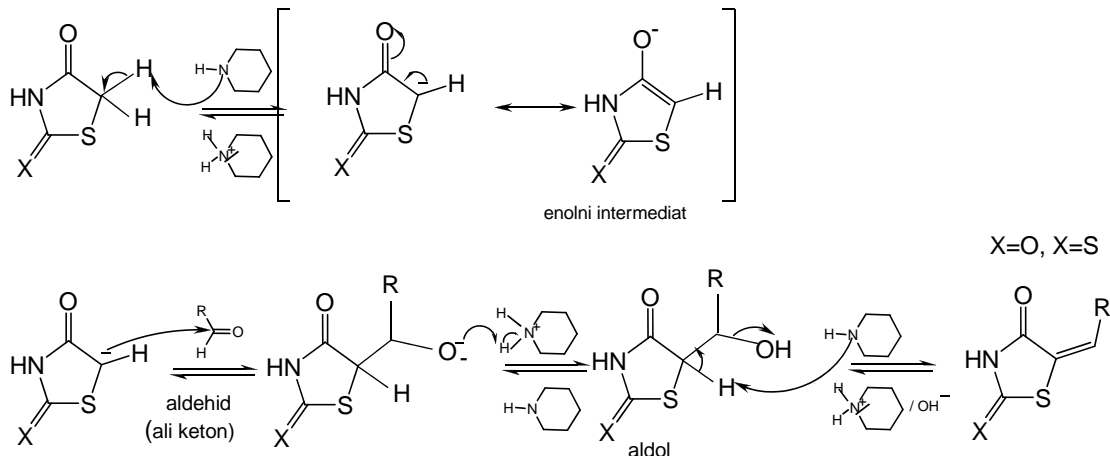
Zaščita karboksilne skupine D-Glu je bila potrebna, saj bi prosta karboksilna skupina vstopala v stranske reakcije pri nadaljnji sintezi in tako zmanjševala izkoristek ter oteževala čiščenje glavnega produkta. S tvorbo metilnega estra pogosto zaščitimo karboksilno skupino, in sicer tako, da izhodno spojino raztopimo v metanolu, zmes ohladimo na 0° C in počasi dodajamo SOCl<sub>2</sub>. Po eni uri reakcijsko zmes segrejemo na sobno temperaturo in pustimo mešati še 24 h. Omenjena reakcija daje visoke izkoristke in čiste produkte, ki se nahajajo v obliki soli s klorovodikovo kislino (33).

### 5.1.2. Knoevenagelova kondenzacija

Sinteza spojin s 5-benzilidentiazolidin-4-onsko strukturo poteka s pomočjo Knoevenagelove kondenzacije med ustreznim aldehydom in tiazolidin-2,4-dionom ali rodaninom. Teoretično je možna geometrijska izmerija (*E/Z*) okrog nastale eksociklične dvojne vezi. Ugotovili so, da pri reakciji med aromatskim aldehydom in rodaninom vedno nastanejo samo termodinamsko stabilnejši *Z*-izomeri. Da nastane samo en izomer lahko ugotovimo z NMR analizo, pri kateri lahko opazimo le en proton za metinsko skupino (23). Knoevenagelovo kondenzacijo katalizirajo amini in je po svojem mehanizmu zelo podobna aldolni

kondenzaciji, poteka pa med aldehidi oz. ketoni in spojinami z dvema elektronprivlačnima skupinama, ki sta vezani na isti C atom. Ta je zato močno aktiviran in lahko po deprotoniranju kot nukleofil napade karbonilno skupino aldehida oz. ketona, čemur sledi eliminacija vode (Slika 23). Pri tiazolidin-2,4-dionu in rodaninu predstavlja aktivirano skupino metilenska skupina, ki ima na eni strani vezano elektronprivlačno karbonilno skupino in na drugi strani žveplo (33).

Pri naših reakcijah smo kot katalizator uporabili manjšo količino (0.1 ekvivalent) piperidina in ledocta, reakcijo pa smo izvajali v mikrovalovnem reaktorju pri 150° C in s tem bistveno pospešili reakcijo. Mikrovalovi so elektromagnetno valovanje z valovno dolžino od 0.01 do 1 metra. Energija mikrovalov je v primerjavi z energijo rentgenskih žarkov, UV-VIS in IR valovanja relativno nizka, zato niso sposobni vzbuditi molekulskih elektronov v višje energijsko stanje ali povzročiti vibracije kemijskih vezi. Pomembna lastnost mikrovalov, ki je omogočila njihovo uporabo v sintezni kemiji, je sposobnost učinkovitega in pravilno usmerjenega segrevanja reakcijske zmesi, kar lahko močno pospeši reakcije, vpliva na njihovo boljšo ponovljivost in poveča izkoristke. Vzrok za selektivno segrevanje je različna zmožnost snovi za absorpcijo mikrovalovne energije ter njeno pretvorbo v toplotno in kinetično energijo (34).



Slika 23: Mehanizem Knoevenagelove kondenzacije (33).

### 5.1.3. Redukcija dvojne vezi s Hantzsch-evim estrom

V sintezni kemiji se kot reducenti veliko uporabljajo razne kovine in kovinski hidridi, vendar so študije pokazale, da reakcije hidrogenacije potečejo tudi brez prisotnosti kovinskih ionov. Eden takšnih reducentov je Hantzsch-ev ester, ki se vedno več uporablja pri različnih redukcijah zaradi enostavne priprave in stabilnosti na svetlobi in zraku (36).

Pri tej redukciji, ki selektivno poteče le na ogljik-ogljik dvojnih vezeh pri  $\alpha,\beta$ - nenasičenih ketonih in aldehydih ter  $\alpha,\beta$ - nenasičenih nitro spojinah, ima silica gel zelo pomembno vlogo kot katalizator. Predvidevajo, da ima silikagel več funkcij pri tej redukciji. Reakcija poteče zaradi hkratne adsorpcije Hantzsch-evega estera in substrata na površino silikagela, s čimer se lokalno poveča koncentracija reaktantov. Silikagel naj bi poleg tega aktiviral substrat kot kisel katalizator ter stabiliziral enolatni anion s protonom iz vode na svoji površini (35).

Reakcijo izvedemo tako, da spojino suspendiramo v toluenu in preprihomo z argonom, da izženemo zrak in ustvarimo inertno atmosfero. Nato dodamo Hantzsch-ev ester (1,3 ekv) in silikagel (1g /1 mmol), ki ga predhodno aktiviramo s segrevanjem pet ur pri temperaturi 120 °C. Bučko s suspenzijo opremimo s povratnim hladilnikom in jo zaščitimo pred svetlobo. Reakcijsko zmes segrevamo pri 100 °C preko noči.

#### **5.1.4. Reducija nitro v amino skupino**

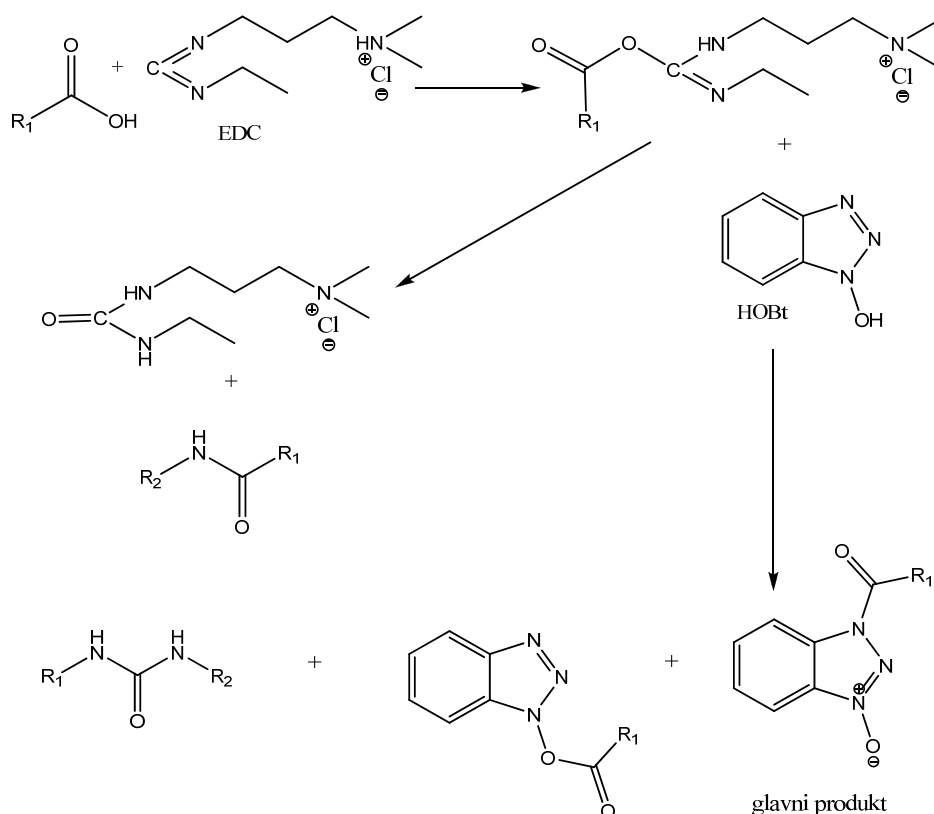
Aromatsko nitro skupino spojin z rodaninskim obročem smo reducirali do amino skupine s kositrovim(II) kloridom. Nitro derivat smo raztopili v etanolu ter reakcijsko zmes segrevali pri temperaturi refluxa približno 2 uri. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom in nato počasi dodajali nasičeno vodno raztopino  $\text{NaHCO}_3$ , da smo nevtralizirali nastale kositrove soli in komplekse. Produkt smo izolirali z ekstrakcijo.

Pri spojinah s tiazolidin-2,4-dionskim ogrodjem smo za redukcijo uporabili katalitsko hidrogeniranje. Reagent smo raztopili v zmesi metanola in tetrahidrofurana ter preprihali z argonom, da smo odstranili zrak. Dodali smo katalizator (paladij na ogljiku– Pd/C) in bučko opremili z balonom, ki je vseboval vodik ter uravnali dotok plina. Po koncu reakcije smo katalizator odfiltrirali z odesavanjem in topilo odparili pod znižanim tlakom. V primeru rodaninskih derivatov te metode nismo mogli uporabiti, ker žveplo tiokso skupine zastrupi katalizator in redukcija ne poteče.

#### **5.1.5. Tvorba amidne vezi z EDC/HOBt metodo**

Amidno vez med karboksilno skupino in aaminsko skupino smo tvorili s karbodiimidno metodo, imenovano tudi EDC/HOBt metoda (*Slika 24*). Po mehanizmu je reakcija nukleofilna substitucija na karbonilnem C-atomu. Ker karboksilna skupina ni dovolj reaktivna za potek reakcije, jo moramo aktivirati. To naredimo z dodatkom EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimida), ki s karboksilno skupino tvori aktiviran ester, tako

poveča elektrofilitnost karbonilnega C-atoma in s tem olajša nukleofilni napad aminske skupine, pri čemer se tvori amidna vez. V reakcijsko zmes dodamo tudi HOBt, ki prepreči nastanek dodatnih stranskih produktov, ki nastanejo zaradi različnih racemizacij, ciklizacij, premestitev in nastanka simetričnih anhidridov. V reakcijsko zmes dodamo tudi *N*-metilmorfolin, s katerim uravnamo pH vrednost na 8. S tem preprečimo odcepitev protona s terciarnega ogljikovega atoma, kar bi lahko povzročilo racemizacijo, hkrati pa omogočimo ionizacijo kisline, da lažje napade C-atom karbodiimida (EDC). Izkoristki reakcije so nizki do zmerni, kar je posledica nastanka večjega števila stranskih produktov. Do večjih izgub produkta pride tudi pri čiščenju le-tega s kolonsko kromatografijo.

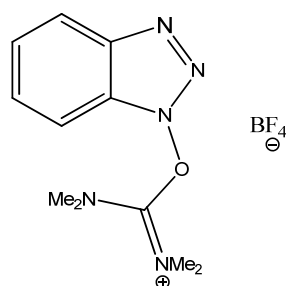


Slika 24: Sinteza amidne vezi z uporabo EDC in HOBt (33).

### 5.1.6. Tvorba amidne vezi s TBTU

Ena od možnosti tvorbe amidne vezi je tudi s TBTU reagentom (Slika 28), ki spada prav tako kot EDC med karbodiimide. TBTU je ester, ki se nahaja v obliki nenukleofilne anionske soli z uronijem (37).

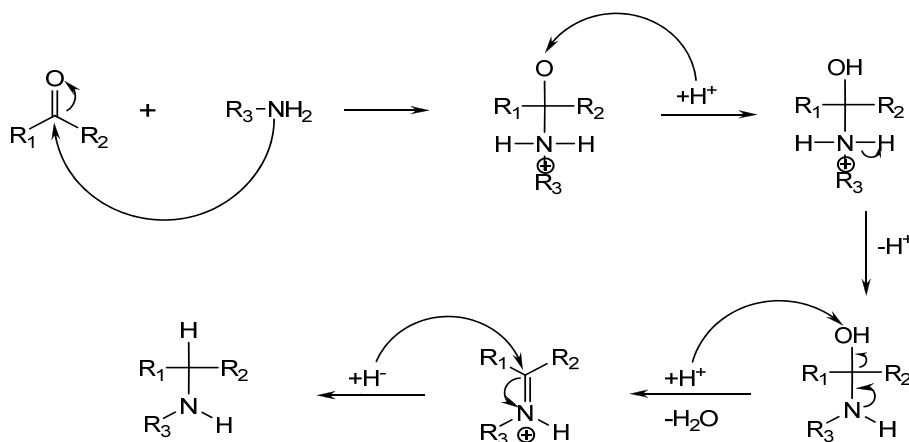
Karboksilno skupino aktiviramo z dodatkom TBTU (N,N,N',N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)-uronijev tetrafluoroborat), ki s karboksilno skupino tvori aktiviran ester in tako poveča elektrofilnost karbonilnega C-atoma in s tem olajša nukleofilni napad aminske skupine, pri čemer se tvori amidna vez. V reakcijsko zmes dodamo tudi N-metilmorfolin, s katerim uravnamo pH na vrednost 8. S tem preprečimo odcepitev protona s terciarnega ogljikovega atoma, kar bi lahko povzročilo racemizacijo, hkrati pa omogočimo ionizacijo kisline, da lažje napade elektrofilni C-atom karbodiimida (TBTU).



Slika 25: Struktura TBTU.

### 5.1.7. Tvorba sekundarnih aminov z metodo reduktivnega aminiranja

Veliko zdravilnih učinkovin ima v svoji strukturi sekundarno amino skupino, ki v biološkem sistemu deluje kot bazični center. Ena izmed široko uporabljenih metod za sintezo sekundarnih aminov je reduktivno aminiranje, pri katerem gre za nukleofilno adicijo aminske skupine na karbonylno skupino aldehida ali ketona z izstopom vode in nastankom iminijevega kationa. V naslednji stopnji hidridni ion (najpogosteje uporabljamo NaCNBH<sub>3</sub>) napade ogljik ob pozitivnem dušiku, pri tem pa se elektrona iz vezi (dvojna vez med dušikom in ogljikom) preneseta na dušik (Slika 29) (33).

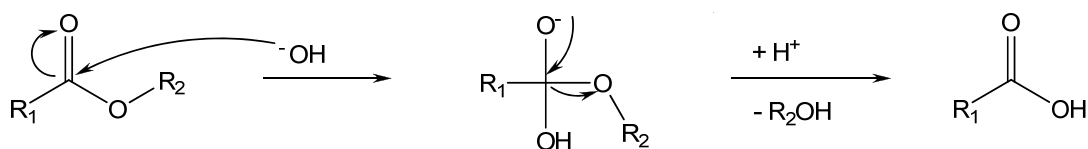


Slika 26: Mehanizem reduktivnega aminiranja (33).

### 5.1.8. Alkalna hidroliza estra

Ena izmed možnosti hidrolize estrske skupine je hidroliza pod alkalnimi pogoji. Pri tem ester raztopimo v mešanici etanola ali metanola in dioksana, dodamo 2 ekv. LiOH (2,2 M) na eno estrsko skupino ter mešamo pri sobni temperaturi. Potek reakcije ves čas spremljamo s tankoplastno kromatografijo. Konec reakcije ugotovimo s tem, ko vidimo samo eno liso, ki ostane na startu zaradi nastanka soli. Namesto LiOH lahko uporabimo tudi NaOH, vendar je verjetnost racemizacije ob uporabi šibkejšega LiOH manj verjetna.

Hidroliza se začne z nukleofilnim napadom hidroksilnega iona na karbonylni skupino estra. Pri tem se elektronski par prenese na karbonylni kisik, ki se v naslednji stopnji vrne v vez med kisikom in ogljikom, pri čemer izstopi alkoholna komponenta estra kot boljše izstopajoča skupina v primerjavi s hidroksilno (Slika 27). Po koncu reakcije je potrebno reakcijsko zmes nakisati, saj se produkt nahaja v obliki litijeve soli.



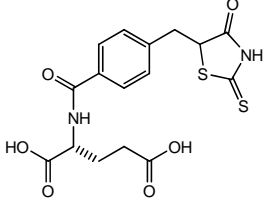
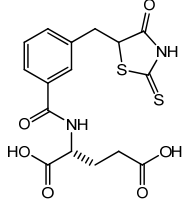
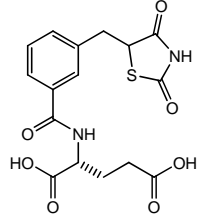
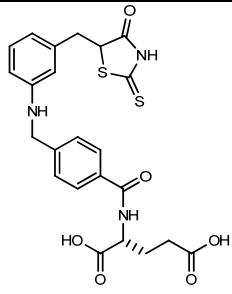
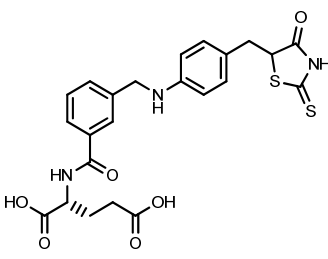
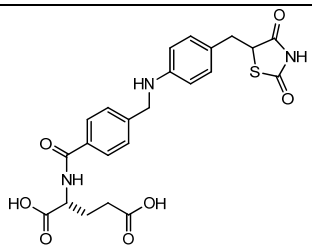
Slika 27: Alkalna hidroliza estra (33).

## 5.2. Rezultati bioloških testiranj

Sintetiziranim reduciranim analogom 5-benzilidentiazolidin-4-onskih inhibitorjev MurD smo določili tudi njihovo inhibitorno aktivnost na encimih MurD in MurE. Rezultati so predstavljeni v Preglednici II kot rezidualna aktivnost encima (RA (%)), ki predstavlja razmerje aktivnosti encima z inhibitorjem ter aktivnosti encima brez inhibitorja. Na encimu MurD iz bakterije *Escherichia coli* smo jo izmerili vsem 6 končnim spojinam pri 500  $\mu\text{M}$  koncentraciji inhibitorja. RA smo določali s testom z malahitno zelenim, pri katerem smo kolorimetrično izmerili količino fosfata, sproščenega pri reakciji, ki jo katalizira encim MurD. Na encimu MurE iz bakterije *Staphylococcus aureus* pa smo izmerili inhibitorno aktivnost le eni sintetizirani spojinini, ki je hkrati izkazovala najboljšo aktivnost med vsemi sintetiziranimi spojinami na encimu MurD. RA je bila določena z radioaktivnim testom.



**Preglednica II:** Rezultati bioloških testiranj potencialnih inhibitorjev na encimih MurD in MurE.

OZNAKA SPOJINE	STRUKTURA	c (μM)	MurD RA (%)	MurE RA (%)
<b><u>09</u></b>		500	<b>96</b>	/
<b><u>10</u></b>		500	<b>91</b>	/
<b><u>13</u></b>		500	<b>91</b>	/
<b><u>25</u></b>		500	<b>75</b>	/
<b><u>26</u></b>		500	<b>67</b>	<b>35<sup>1</sup></b>
<b><u>32</u></b>		500	<b>86</b>	/

<sup>1</sup> Spojino je bila testirana z radioaktivnim testom v Orsay-u v Franciji.

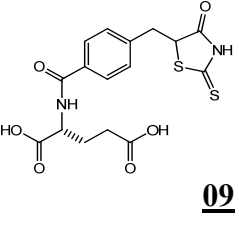
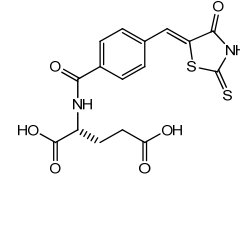
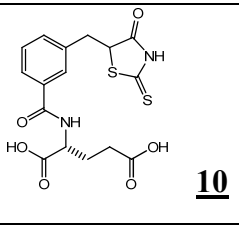
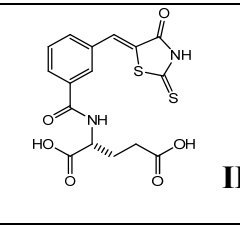
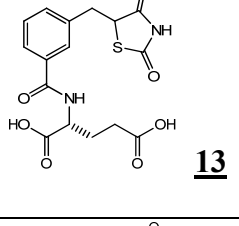
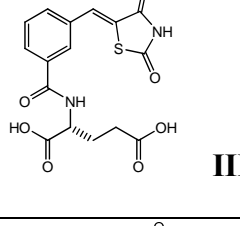
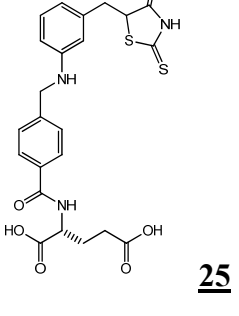
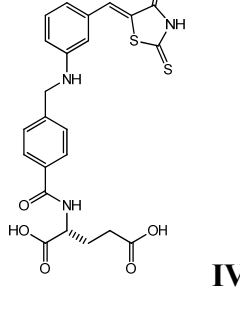
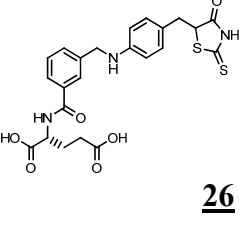
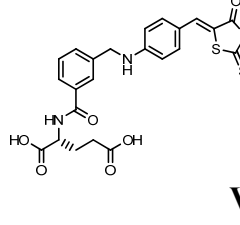
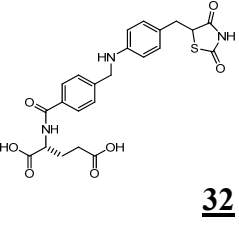
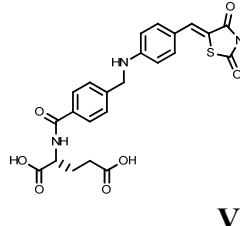
Iz Preglednice II lahko razberemo, da spojine pri koncentraciji 500  $\mu$ M izkazujejo šibko inhibitorno aktivnost na ligazi MurD, saj je RA v območju med 67 in 96 %. Spojine s krajšo verigo (**09**, **10**, **13**) med D-Glu in heterociklom niso izkazovale praktično nobene inhibicije MurD (RA = 91-96 %), ne glede na to ali je spojina vsebovala rodaninski ali tiazolidin-2,4-dionski obroč. Prav tako ni bilo pomembno mesto substitucije na fenilnem obroču. Pri spojinah z daljšo verigo med D-Glu in heterocikličnim obročem (**25**, **26**, **32**) pa je bila inhibicija MurD malo močnejša (RA = 67-85 %). Iz rezultatov je razvidno, da sta najmočnejša inhibitorja iz te serije 5-benziltiazolidin-4-onov vsebovala rodaninski obroč, medtem ko je bila spojina s tiazolidin-2,4-dionskim obročem praktično neaktivna. Zaključimo lahko, da spojine ne izkazujejo bistvene inhibitorne aktivnosti na encim MurD.

Če primerjamo aktivnost sintetiziranih spojin z njihovimi nenasičenimi analogi **I-VI**, je razvidno, da se je aktivnost bodisi poslabšala, ali pa je ostala enaka (Preglednica III). Pri spojinah s krajšo verigo med D-Glu in rodaninom (**09**, **10**) je aktivnost nenasičenih analogov napram MurD veliko močnejša v primerjavi z nasičenimi analogi. Aktivnost spojine **III** in njenega nasičenega analoga je ostala enaka, saj sta bili obe neaktivni napram MurD. Pri primerjavi spojin z daljšo verigo pa lahko vidimo, da aktivnost napram MurD prav tako pade (**25** napram **IV** in **26** napram **V**) oziroma spojina ostane neaktivna (**32** napram **VI**). Še vedno pa spojine, ki vsebujejo rodaninski obroč močnejše inhibirajo MurD kot spojine s tiazolidin-2,4-dionskim obročem.

Glede na to, da je bila na encimu MurE testirana samo ena spojina, povezave med strukturo in delovanjem ni mogoče podati. Iz Preglednice III je razvidno le, da reducirana spojina šibkejše inhibira MurE kot njen nenasičen analog **VI**.

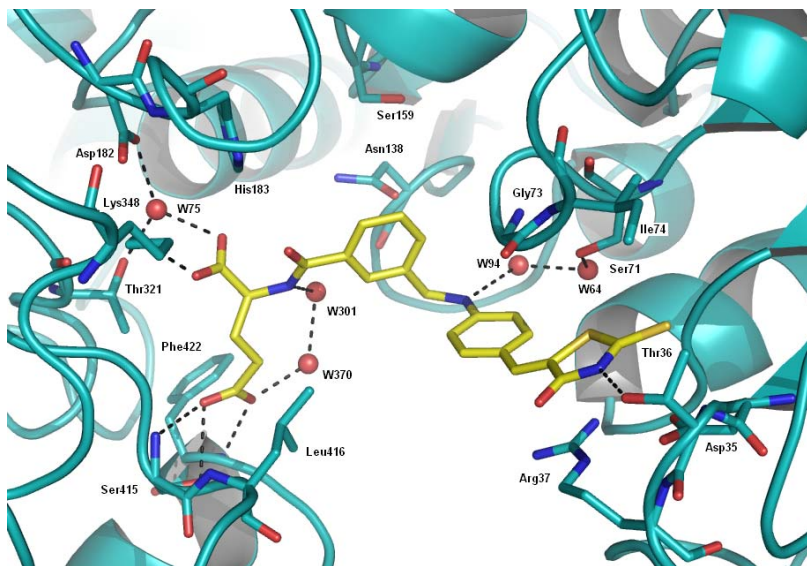
Iz dejstva, da so sintetizirane spojine zelo šibki inhibitorji encima MurD, lahko sklepamo, da spojine v aktivnem mestu encima MurD ne zavzamejo optimalne konformacije zaradi česar tudi ne tvorijo dovolj močnih interakcij, da bi lahko za vezavo uspešno tekmovala s substratom in na ta način preprečile potek reakcije, ki jo katalizira encim MurD.

**Preglednica III:** Primerjava aktivnosti 5-benzilidientiazolidin-4-onov in 5-benziltiazolidin-4-onov.

STRUKTURA	C (μM)	MurD RA(%)	MurE RA(%)	STRUKTURA	C (μM)	MurD RA(%)	MurE S.aur.
 <b>09</b>	500	<b>96</b>	/	 <b>I</b>	250	<b>IC<sub>50</sub>= 45 μM</b>	<b>98</b>
 <b>10</b>	500	<b>91</b>	/	 <b>II</b>	250	<b>30</b>	<b>67</b>
 <b>13</b>	500	<b>91</b>	/	 <b>III</b>	250	<b>96</b>	<b>83</b>
 <b>25</b>	500	<b>75</b>	/	 <b>IV</b>	250	<b>IC<sub>50</sub>= 174 μM</b>	<b>96</b>
 <b>26</b>	500	<b>67</b>	<b>35</b>	 <b>V</b>	250	<b>IC<sub>50</sub>= 45 μM</b>	<b>15</b>
 <b>32</b>	500	<b>86</b>	/	 <b>VI</b>	250	<b>70</b>	<b>27</b>

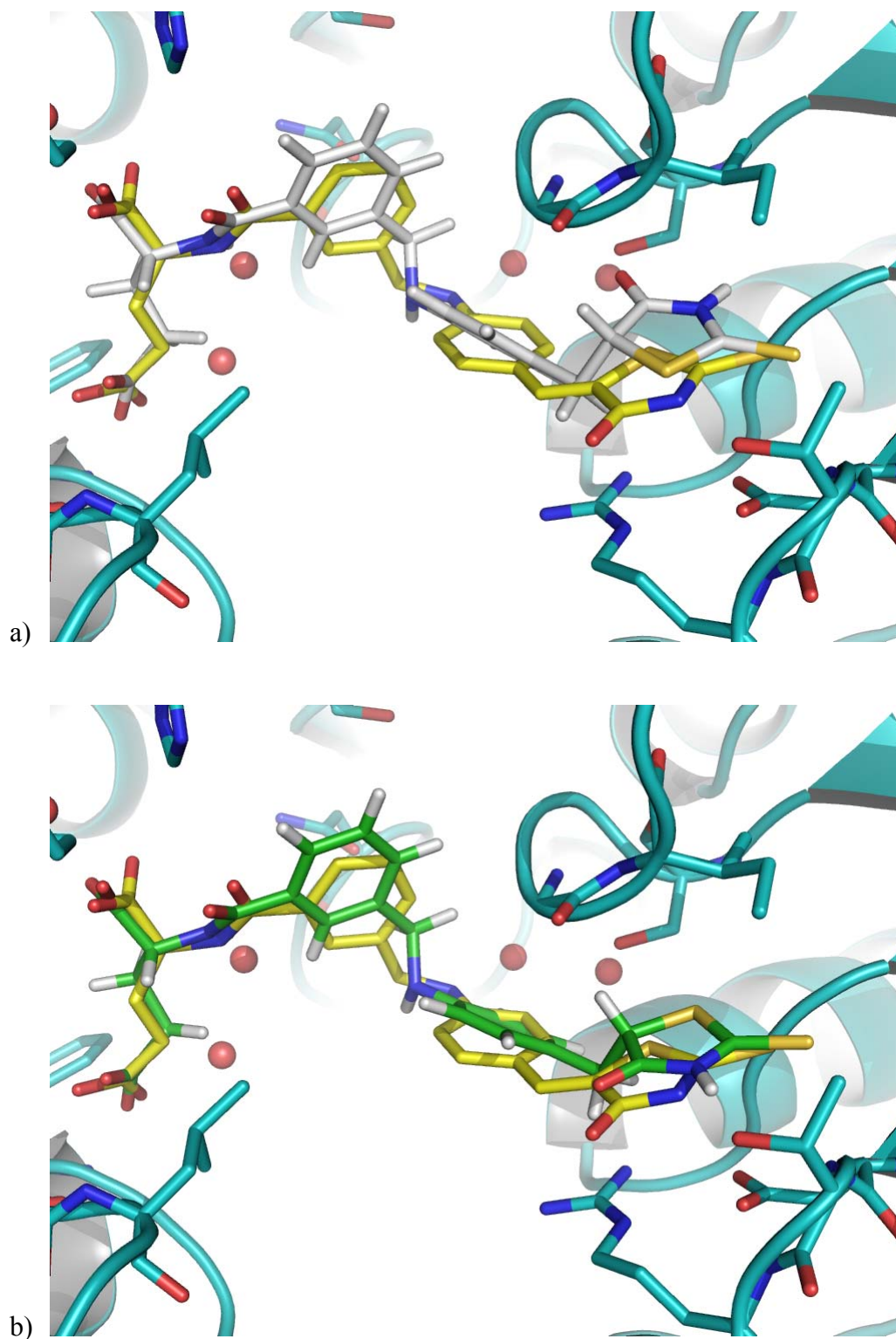
Razlogov za padec aktivnosti reduciranih analogov napram ustreznim nenasičenim analogom je lahko več. Eden od razlogov je lahko izguba konjugacije med fenilnim in heterocikličnim obročem po redukciji, zaradi česar se močno spremenijo elektronske lastnosti spojin. To je lepo vidno tudi iz spremenjenih fizikalnih lastnosti (npr. reducirane spojine so boljše topne v različnih topilih v primerjavi z nenasičenimi analogi). Spojine, ki vsebujejo dvojno vez, so bolj toge in negibljuje okoli te vezi. Torej z redukcijo te dvojne vezi pridobimo eno vrtljivo vez, s čimer postanejo spojine bolj fleksibilne in lahko zavzamejo večje število konformacij. Pri tem pa seveda zmanjšamo možnost, da se bo spojina vezala v aktivno mesto s konformacijo, ki je za encim najbolj ugodna.

Iz kristalne strukture kompleksa MurD-inhibitor **V** (Slika 28) je razvidno, da se le-ta veže v aktivno mesto za D-Glu in UMA. Z redukcijo dvojne vezi dobimo nov stereogeni center, pri čemer nastane racemna zmes dveh stereoizomerov. Glede na to, da je stereogeni center na Glu definiran (D-Glu oziroma *R* izomer), imamo tako zmes dveh diastereoizomerov (*R,S* in *R,R*). Iz rezultatov sidranja spojine **26** v aktivno mesto MurD<sup>2</sup> je razvidno, da lahko le *R,S* izomer zavzame podobno konformacijo kot inhibitor **V** (Slika 29), medtem ko *R,R* izomer zavzame tako konformacijo, da ne more več tvoriti vodikove vezi s Thr36. Glede na rezultate sidranja je tako eden od diastereoizomerov (*R,S*) bolj aktiven, zato bi bila aktivnost optično čiste spojine lahko boljša.



Slika 28: Kristalna struktura kompleksa MurD-inhibitor V.

<sup>2</sup> Sidranje je naredil asist. T. Tomašič, mag. farm. s programom Gold v3.2.



Slika 29: a) Superpozicija inhibitorja V (rumen) in *R,R*-izomera **26** (siv); b) Superpozicija inhibitorja V (rumen) in *R,S*-izomera **26** (zelen).

## 6. SKLEP

V okviru diplomskega dela smo želeli proučiti vpliv redukcije dvojne vezi pri znanih 5-benzilidentiazolidin-4-onskih inhibitorjih ligaze MurD na njihovo inhibitorno aktivnost. Sintetizirali smo 6 končnih spojin, ki smo jim z encimskim testom določili inhibitorno aktivnost na ligazo MurD v primeru vseh šestih spojin in na ligazo MurE v primeru ene spojine **26**, ki je izkazovala med vsemi najboljšo inhibitorno aktivnost na ligazo MurD.

Odločili smo se za sintezo analogov spojin, ki so se že pokazale kot inhibitorji MurD in MurE. Zanimalo nas je, kako se spremeni aktivnost spojin, če pri spojinah s 5-benzilidentiazolidin-4-onskim fragmentom reduciramo eksociklično dvojno vez. Sintetizirali smo serijo strukturno podobnih spojin, pri katerih smo pričakovali vsaj enako ali boljšo aktivnost, vendar se je izkazalo, da večina spojin ni bila aktivnih. Z majhno spremembo v strukturi spojine, smo dobili spojine z drugačnimi lastnostmi in posledično z slabšo aktivnostjo. Šibko inhibicijsko aktivnost sta ohranili le spojini z daljšo verigo: (2R)-2-(4-((3-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil)benzamido)pentandiojska kislina (spojina **25**) in (2R)-2-(3-((4-((4-okso-2-tioksotiazolidin-5-il)metil)fenilamino)metil)benzamido)pentandiojska kislina (spojina **26**), ki vsebujeta rodaninski obroč.

Spojine s krajšo verigo med D-Glu in heterociklom (**09**, **10**, **13**) niso izkazovale praktično nobene inhibicije MurD (RA = 91-96 %). Iz tega lahko sklepamo, da vezava spojin v aktivno mesto ligaze ni odvisna od tega ali spojina vsebuje rodaninski ali tiazolidin-2,4-dionski obroč. Prav tako ni bilo pomembno mesto substitucije na fenilnem obroču.

Pri spojinah z daljšo verigo med D-Glu in heterocikličnim obročem (**25**, **26**, **32**) pa je bila inhibicija MurD malo močnejša (RA = 67-85 %). Iz rezultatov je razvidno, da sta najmočnejša inhibitorja iz te serije 5-benziltiazolidin-4-onov vsebovala rodaninski obroč, medtem ko je bila spojina s tiazolidin-2,4-dionskim obročem praktično neaktivna.

Spojine, ki lahko z encimom tvorijo številne interakcije (vodikove vezi, van der Waalsove vezi ...), imajo ponavadi močno inhibitorno aktivnost. zato bi bilo pri nadaljnji optimizaciji 5-benzilidentiazolidin-4-onskih derivatov smiselno modificirati benzilidenski fragment tako, da bi na različnih položajih fenilnega obroča uvedli različne kombinacije manjših funkcionalnih skupin (hidroksilne, aminske, tiolne, karboksilne skupine), ki bi lahko z encimom tvorile dodatne vodikove vezi in zaradi tega izkazovale še močnejšo inhibitorno aktivnost.

## 7. LITERATURA

1. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK: Pharmacology 5<sup>th</sup> Ed., Edinburgh, Churchill Livingstone, **2003**: 620-662.
2. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry 5<sup>th</sup> Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, **2002**: 819-825.
3. Green DW: The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin. Ther. Targets*, **2002**; 6: 1-19.
4. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA: Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**; 32 (2): 149-67.
5. Zoeiby AE, Sanschagrín F, Levesque RC: Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol. Microbiol.*, **2003**; 47: 1-12.
6. Yoneyama H, Katsumata R: Antibiotic resistance in bacteria and its future for novel antibiotic development. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **2006**; 70: 1060-1075.
7. Collignon P: Antibiotic resistance. *MJA*, **2002**; 177: 325-329.
8. Bush K, Macielag M, Weidner-Wells M: Taking inventory: antibacterial agents currently at or beyond Phase 1. *Curr. Opin. in Microbiol.*, **2004**; 7: 466-476.
9. Hammond SM, Lambert PA, Rycoft AN: The bacterial cell surface. Croom Helm, London & Sydney, Kapitan Szabo publishers, Washington DC, **1984**: 1-28.
10. Gobec S, Urleb U: Inhibitorji biosinteze peptidoglikana. *Farm. Vestn.*, **1999**; 50: 183-193.
11. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.*, **2008**: 1-40.
12. Hiratake J: Enzyme Inhibitors as Chemical Tools to Study Enzyme Catalysis: Rational design, Synthesis and Applications. *Chem. Rec.*, **2005**; 5: 209-228.
13. Silver LL: Novel inhibitors of bacterial cell wall synthesis. *Curr. Opin. in Microbiol.*, **2003**; 6: 431-438.
14. Bertrand JA, Fanchon E, Martin L, Chantalat L, Auger GA, Blanot D, van Heijenoort J, Dideberg O: "Open" Structures of MurD: Domain Movements and Structural Similarities with Folylpolyglutamate Synthetase. *J. Mol. Biol.*, **2000**; 301: 1257-1266.

15. Bertrand JA, Auger G, Martin L, Fanchon E, Blandot D, Le Beller D, van Heijenoort J: Determination of the MurD mechanism through crystallographic analysis of enzyme complexes. *J. Mol. Biol.*, **1999**; 289: 579-590.
16. Setti EL, Micetich RG: New trends in antimicrobial development. *Curr. Med. Chem.*, **1998**; 5: 101-113.
17. Blewett AM, Lloyd AJ, Echaliier A, Fulop V, Dowson CG, Bugg TDH, Roper DI: Expression, purification, crystallization and preliminary characterization of uridine 50-diphospho-N-acetylmuramoyl L-alanyl-D-glutamate: lysine ligase (MurE) from *Streptococcus pneumoniae* 110K/70. *Acta Crystallogr.*, **2004**; D60: 359-361.
18. Gordon E, Flouret B, Chantalat L, van Heijenoort J, Lecreux DM, Dideberg O: Crystal Structure of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate: *meso*Diaminopimelate Ligase from *Escherichia Coli*. *J. Biol. Chem.*, **2001**; 276 (14): 10999–11006.
19. Gegnas LD, Waddel ST, Chabin RM, Reddy S, Wong KK: Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurD. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **1998**; 8: 1643-1648.
20. Štrancar K, Blanot D, Gobec S: Design, synthesis and structure–activity relationships of new phosphinate inhibitors of MurD. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2006**; 16: 343–348.
21. Horton JR, Bostock JM, Chopra I, Hesse L, Phillips SEV, Adams DJ, Johnson P, Fishwick CWG: Macrocyclic Inhibitors of the Bacterial Cell Wall Biosynthesis Enzyme Mur D. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**; 13: 1557–1560.
22. Humljan J, Kotnik M, Boniface A, Šolmajer T, Urleb U, Blanot D, Gobec S: A new approach towards peptidosulfonamides: Synthesis of potential inhibitors of bacterial peptidoglycan biosynthesis enzymes MurD and MurE. *Tetrahedron*, **2006**; 62: 10980– 10988.
23. Tomašić T, Zidar N, Rupnik V, Kovač A, Blanot D, Gobec S, Kikelj D, Mašič PL: Synthesis and biological evaluation of new glutamic acid based inhibitors of MurD ligase. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**; 19(1): 153-7.
24. Li Z. et al: 2-phenyl-5,6-dihydro-2H-thieno[3,2-c]pyrazol-3-ol derivatives as new inhibitors of bacterial cell wall biosynthesis. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2003**; 13: 2591-2594.



25. Turk S, Kovač A, Boniface A, Bostock JM, Chopra I, Blanot D, Gobec S: Discovery of new inhibitors of the bacterial peptidoglycan biosynthesis enzymes MurD and MurF by structure-based virtual screening. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**; 17: 1884-1889.
26. Auger G, van Heijenoort J, Vederas JC, Blanot D: Effect of analogues of diaminopimelic acid on the *meso-diaminopimelate* adding enzyme from *Eseherichia coli*. *FEBS Lett.*, **1996**; 391: 171-174.
27. Perdih A, Kovač A, Wolber G, Blanot D, Gobec S, Solmajer T: Discovery of novel benzene 1,3-dicarboxylic acid inhibitors of bacterial MurD and MurE ligases by structure-based virtual screening approach. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2009**; 19: 2668–2673.
28. Tomašić T, Mašič LP: Rhodanine as a Privileged Scaffold in Drug Discovery. *Curr. Med. Chem.*, **2009**; 16: 1596-1629.
29. Kuhelj R, Renko M, Dolenc I, Jerala R: Biokemija v praksi: načela in tehnike, 2. izdaja, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Ljubljana, **2001**: 50-62.
30. TCI: Organic Chemicals 2006-2007, **2006**, 990.
31. Zhou J, Song Y, Zhu F, Zhu Y: Facile synthesis of 5-benzylidene rhodanine derivates under microwave irradiation, *Synth. Commun.*, **2006**; 36: 3297-3303.
32. Maccari R, Ottana R, Curinga C, Vigorita MG, Rakowitz D, Steindl T, Langer T: Structure-activity relationships and molecular modelling of 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones active as aldose reductase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2005**; 13: 2809-2823.
33. March J: Advanced organic chemistry: reactions, mechanisms and structure, 4<sup>th</sup> Ed., **1992**.
34. Kappe O, Stadler A: Microwaves in organic and medicinal chemistry. Wiley-VCH: Weinheim, **2005**.
35. Nakamura K, Fujii M, Ohno A, Oka S: Reduction of olefins by Hantzsch ester on silica gel. *Tetrahedron Lett.*, **1984**; 25 (36): 3983- 3986.
36. Rongjun H, Patrick HT, Yulin L: Polymer- Supported Hantzsch 1,4-Dihydropyridine Ester: An Efficient Biomimetic Hydrogen Source. *Adv. Synth. Catal.*, **2008**; 350: 54-60
37. Wipf P: Handbook of Reagents for Organic Synthesis, **2005**: 39-41.