

## VSEBINA

<b>POVZETEK.....</b>	<b>3</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>4</b>
<b>SEZNAM OKRAJŠAV .....</b>	<b>5</b>
<b>1 UVOD.....</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Razdelitev protimikrobnih učinkovin .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Odpornost bakterij na protimikrobne učinkovine.....</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Bakterijska celična stena .....</b>	<b>8</b>
1.3.1 Celična stena grampozitivnih in gramnegativnih bakterij .....	9
1.3.2 Zgradba peptidoglikana.....	10
1.3.3 Biosinteza peptidoglikana .....	12
<b>1.4 Ligaze Mur.....</b>	<b>14</b>
1.4.1 Ligaza MurC .....	15
1.4.1.1 Inhibitorji encima MurC .....	16
1.4.2 Ligaza MurD .....	19
1.4.2.1 Inhibitorji encima MurD .....	20
1.4.3 Ligaza MurE.....	22
1.4.3.1 Inhibitorji encima MurE .....	22
<b>2 NAČRT ZA DELO .....</b>	<b>24</b>
<b>3 MATERIALI IN METODE.....</b>	<b>29</b>
<b>3.1 Materiali.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2 Metode.....</b>	<b>29</b>
<b>4 EKSPERIMENTALNO DELO .....</b>	<b>32</b>
<b>4.1 Sintezni postopki in rezultati analiz (prva sintezna pot).....</b>	<b>32</b>
4.1.1 Sintеза benzil 2-amino-3-hidroksibutanoata (OVS 1) .....	32
4.1.2 Sintеза benzil 3-hidroksi-2-(3-nitrofenilsulfonamido)butanoata (OVS 2).....	33
4.1.3 Sintеза benzil 2-(3-aminofenilsulfonamido)-3-hidroksibutanoata (OVS 3) .....	34
4.1.4 Sintеза 3-nitrobenzensulfonilklorida (OVS 4) .....	35
4.1.5 Sintеза 2-(3-(N-(1-(benziloksi)-3-hidroksi-1-oksobutan-2-il)sulfamoil) fenilamino)etanojske kisline (OVS 5).....	35
4.1.6 Sintеза 2-(3-karboksimetilamino)fenilsulfonamido)-3-hidroksibutanojske kisline (OVS 6) ...	36
4.1.7 Sintеза benzil 2-(3-(2-(3-benziloksi)-3-(oksopropilamino)-2-oksoetilamino) fenilsulfonamido)-3-hidroksibutanoata (OVS 7).....	37
4.1.8 Sintеза dibenzil 2-(2-(3-(N-(1-(benziloksi)-3-hidroksi-1-oksobutan-2-il)sulfamoil)fenilamino)acetamidopentandioata (OVS 8).....	38
4.1.9 Sintеза 2-(3-(2-(2-karboksietilamino)-2-oksoetilamino)fenilsulfonamido)-3-hidroksibutanojske kisline (OVS 9).....	39
4.1.10 Sintеза 2-(2-(3-(N-(1-karboksi-2-hidroksipropil)sulfamoil)fenilamino) acetamido) pentandiojske kisline (OVS 10).....	40

<b>4.2 Druga sintezna pot .....</b>	<b>42</b>
4.2.1 Sinteza N-( <i>terc</i> -butiloksikarbonil)-L-treonina (OVS 11) .....	42
4.2.2 Sinteza <i>terc</i> -butil-3-hidroksi-1-okso-1-(2-(sulfonil)hidrazinil)butan-2-ilkarbamata (OVS 12) .	42
4.2.3 Sinteza N'-(2-amino-3-hidroksibutanoil)benzensulfonohidrazida (OVS 13) .....	43
4.2.4 Sinteza N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-(fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamida (OVS 14) .....	44
4.2.5 Sinteza 3-amino-N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il) benzensulfonamida (OVS 15) .....	45
4.2.6 Sinteza 2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il) sulfamoil)fenilamino)etanojske kisline (OVS 16).....	46
4.2.7 Sinteza benzil 2-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il) sulfamoil)fenilamino)acetamidoacetata (OVS 17) .....	47
4.2.8 Sinteza benzil 3-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il) sulfamoil)fenilamino)acetamidopropanoata (OVS 18) .....	48
4.2.9 Sinteza dibenzil 2-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il) sulfamoil)fenilamino)acetamido)pentandioata (OVS 19) .....	50
4.2.10 Sinteza dibenzil 2-(2-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il) sulfamoil)fenilamino)acetamido)propanamido)pentandioata (OVS 20) .....	51
4.2.11 Sinteza 2-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-(fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il) sulfamoil)fenilamino)acetamido)etanojske kisline (OVS 21) .....	52
4.2.12 Sinteza 3-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-(fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il) sulfamoil)fenilamino)acetamido)propanojske kisline (OVS 22) .....	53
4.2.13 Sinteza 2-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-(fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il) sulfamoil)fenilamino)acetamido)pentandiojske kisline (OVS 23) .....	54
4.2.14 Sinteza 2-(2-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-(fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il) sulfamoil)fenilamino)acetamido)pentandiojske kisline (OVS 24) .....	55
4.2.15 Sinteza dietil (3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-(fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il) sulfamoil)fenilamino)metilfosfonata (OVS 25) .....	56
4.2.16 Sinteza etil 3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-(fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il) sulfamoil)fenilamino)metilfosfonata (OVS 26) .....	57
<b>5 RAZPRAVA IN REZULTATI .....</b>	<b>59</b>
<b>5.1 Razprava o sintezah spojin.....</b>	<b>59</b>
5.1.1 Zaščita karboksilne skupine L-treonina (OVS 1) .....	59
5.1.2 Zaščita amino skupine L-treonina (OVS 11).....	59
5.1.3 Odstranitev <i>terc</i> -butiloksikarbonilne (BOC) zaščite (OVS 13).....	60
5.1.4 Tvorba amidne vezi z reagentoma EDC in HOBr .....	61
5.1.5 Priprava 3-nitrobenzensulfonilklorida (OVS 4) .....	62
5.1.6 Sinteza sekundarnih aminov z metodo reduktivnega aminiranja (OVS 5).....	63
5.1.7 Katalitsko hidrogeniranje .....	63
5.1.8 Sinteza $\alpha$ -aminofosfonata (OVS 25) .....	64
<b>5.2 Rezultati biokemijskega testiranja spojin .....</b>	<b>65</b>
<b>6 SKLEP .....</b>	<b>68</b>
<b>7 LITERATURA.....</b>	<b>69</b>

## POVZETEK

Nagel razvoj bakterijske rezistence predstavlja vse večji problem pri zdravljenju bakterijskih okužb, zato postajata neprestano iskanje novih tarčnih mest in razvoj novih protimikrobnih učinkovin vse bolj pomembna. Med najpomembnejša prijemališča za razvoj novih protibakterijskih učinkovin spada peptidoglikan. Le-ta je sestavni gradnik bakterijske celične stene, ki vzdržuje obliko celice in varuje bakterije pred lizo. Sestavljen je iz linearnih glikanskih verig, ki so prečno premrežene s kratkimi peptidnimi mostički. V njegovi biosintezi sodelujejo tudi citoplazemski encimi ligaze Mur, ki so primerne tarče za razvoj novih protimikrobnih učinkovin.

V okviru diplomske naloge smo sintetizirali dvanajst potencialnih inhibitorjev encimov iz družine ligaze Mur (MurC, MurD in MurE). S pomočjo molekulskega modeliranja in sidranja v aktivno mesto encimov Mur, smo predhodno določili strukturo molekul z želenimi lastnostmi. Za osrednji fragment smo vzeli 3-aminobenzensulfoniltreoninski skelet in na aminsko skupino pripeli različne peptide in druge substituente, ki bi ojačali vezavo v aktivno mesto encimov Mur. Sintetizirali smo dve seriji potencialnih inhibitorjev. Prva serija spojin ima na karboksilno skupino treonina vezan benzensulfonohidrazid, druga serija pa ima prosto karboksilno skupino.

Vse končne spojine so bile testirane na izoliranih encimih MurC in MurD. Rezultati inhibitornih aktivnosti na MurE bodo znani naknadno. Kot edini uspešni inhibitor se je izkazal derivat s fosfonatno skupino z RA 50% (MurC), izmerjeni v koncentracijskem intervalu 200 – 2000 µM.

Najpomembnejši prispevek tega diplomskega dela k razvoju novih protimikrobnih učinkovin so nova spoznanja o zakonitostih med strukturo in zaviralnim delovanjem na izbrane tarčne encime pri treoninskih derivatih in nove sintezne metode, ki smo jih razvili in uporabili med eksperimentalnim delom.

## ABSTRACT

Rapid development of bacterial resistance has become a major problem in antibacterial therapy and necessitates the search for new antibacterial targets and development of new therapeutic agents against bacterial infections. One of the most important targets for new antibacterial compounds is peptidoglycan macromolecule. It is an essential component of the bacterial cell wall, which maintains a defined cell shape and prevents cell lysis. It is composed of linear glycan chains that are cross-linked by short peptides. Cytoplasmic enzymes ligases Mur are involved in the peptidoglycan biosynthesis and are suitable targets for the development of new antimicrobial agents.

During our research work we synthesized twelve potential inhibitors of ligases Mur (MurC, MurD and MurE). Structures of molecules with desired properties were initially defined using computer molecular modeling and docking of the molecules in the active site of enzymes. We selected 3-aminobenzenesulfonylthreonine as a crucial fragment and linked it to various short peptides and other substituents that are expected to strengthen the binding of compounds in the active site of enzymes. We synthesized two series of potential inhibitors; the first one has benzenesulfonohydrazide bonded to carboxyl group of threonine and the second has free carboxyl group.

All final compounds were tested on isolated enzymes MurC and MurD. The results of inhibitory activity for MurE will be known in due course. Using synthetic procedures described in this paper we managed to synthesize an inhibitor - a derivative with a phosphonate group - with a residual activity of 50% in 200-2000 µM interval (MurC).

The most important contribution of this research work to the development of new antimicrobial agents are discoveries regarding the relationship between the structure and the inhibitory activity on the selected target enzymes of threonine derivatives and new methods of synthesis we have developed and used during the experimental work.

**SEZNAM OKRAJŠAV**

ADP	adenozindifosfat
ATP	adenozintrifosfat
BOC	<i>terc</i> -butiloksikarbonil
CDCl <sub>3</sub>	devteriran kloroform
CHO	ovarijske celice kitajskih hrčkov (Chinese Hampster Ovary cells)
d	dublet (NMR)
dd	dublet dubleta (NMR)
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DKM	diklorometan
DMSO-d <sub>6</sub>	devteriran dimetilsulfoksid
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ESI	elektronska ionizacija (Electron Spray Ionization) (MS)
GlcNAc	N-acetilglukozamin
HOBt	1-hidroksibenzotriazol hidrat
IR	infrardeča spektroskopija
IC <sub>50</sub>	srednja inhibitorna koncentracija
J	sklopitevna konstanta (NMR)
M	molarna koncentracija
m	multiplet (NMR)
mDpm	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
Mf	mobilna faza
MRSA	na meticilin odporni <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	masna spektrometrija
Mr	relativna molekulska masa
MurA	UDP-N-acetilglukozamin enolpiruvat-transferaza
MurB	UDP-N-acetilenolpiruvilglukozamin-reduktaza
MurC	UDP-N-acetilmuraminska kislina: L-alanin-ligaza
MurD	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin: D-glutamat-ligaza
MurE	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat: mezodiaminopimelinat-ligaza
MurF	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-mezodiaminopimelinat

	D-alanin-D-alanin-ligaza
MurG	UDP-N-acetilglukozamin-transferaza
MurNAc	N-acetilmuraminska kislina
NAM	N-acetil-D-muraminska kislina
NMM	N-metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
PRSP	na penicilin odporni <i>Staphylococcus pneumoniae</i>
PTSA	p-toluensulfonska kislina
RA	rezidualna aktivnost
R <sub>f</sub>	retencijski faktor
s	singlet (NMR)
t	triplet (NMR)
TsO <sup>-</sup>	anion p-toluensulfonske kisline
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija
UDP	uridindifosfat
UMP	uridinmonofosfat
UMA	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin
UMT	UDP-N-acetilmuramoil-tripeptid
VRE	na vankomicin odporni <i>Enterococcus faecium</i> in <i>faecalis</i>

## 1 UVOD

### 1.1 Razdelitev protimikrobnih učinkovin

Protimikrobne učinkovine delimo na antibiotike in sintezne kemoterapeutike (npr. sulfonamide, kinolone). Antibiotiki so metabolni produkti mikroorganizmov (bakterij, gliv, lišajev) in njihovi polsintezni analogi, ki v relativno nizkih koncentracijah zavirajo rast in razvoj mikroorganizmov, pri tem pa nimajo resnejših toksičnih učinkov na gostitelja. Ta princip imenujemo selektivna toksičnost. Delujejo na dva načina, in sicer tako, da preprečijo rast (bakteriostatično delovanje) ali povzročijo smrt (baktericidno delovanje) mikroorganizmov. S kemijsko modifikacijo naravnih antibiotikov skušajo doseči širši spekter delovanja, večjo učinkovitost, manjšo toksičnost in izboljšati farmakokinetične lastnosti. (1, 2)

Protimikrobne učinkovine delimo glede na mehanizem delovanja in kemično zgradbo v naslednje skupine:

- zaviralci sinteze celične stene ( $\beta$ -laktamski antibiotiki, glikopeptidi, bacitracin),
- zaviralci sinteze proteinov (aminoglikozidi, tetraciklini, makrolidi, kloramfenikol),
- zaviralci sinteze nukleinskih kislin (kinoloni, rifampicin, metronidazol),
- zaviralci metabolizma folne kisline (sulfonamidi, trimetoprim),
- zaviralci funkcije plazemske membrane (polimiksini). (3)

### 1.2 Odpornost bakterij na protimikrobne učinkovine

Z odkritjem številnih protimikrobnih učinkovin v začetku 20. stoletja se je močno zmanjšala smrtnost zaradi infekcijskih bolezni. V skladu z evolucijskim načelom, da se organizmi genetsko prilagajajo spremembam v okolju, se je postopno razvilo vse več bakterijskih sevov, ki so odporni proti posameznim ali več različnim antibiotikom. Hitro evolucijsko prilagajanje je posledica hitrega razmnoževalnega ciklusa bakterij in selekcije odpornih bakterijskih sevov zaradi množične in nekritične uporabe antibiotikov. V prisotnosti antibiotikov se poveča tudi število mutacij v bakterijskih celicah. Poznamo pet osnovnih biokemijskih mehanizmov bakterijske odpornosti proti antibiotikom:

- sprememba tarčnega mesta (npr. sprememba penicilin vezičih beljakovin),
- produkcija encimov, ki razgradijo učinkovino (npr.  $\beta$ -laktamaze),

- zmanjšana prepustnosti celične membrane (npr. sprememba porinov v celični steni),
- aktivno črpanje antibiotika iz bakterijske celice s pomočjo membranskih črpalk in
- sprememba presnovne poti, na katero deluje protimikrobna učinkovina. (3, 4)

Ločimo dve vrsti odpornosti na protimikrobnne učinkovine: naravno (intrinzično) rezistenco, ki je genetsko pogojena in je značilna za celotno bakterijsko vrsto ter pridobljeno rezistenco, ki je prisotna le pri posameznih bakterijskih sevih. Pridobljena rezistenca je posledica mutacije kromosomske DNA ali pridobitve nove genetske informacije s pomočjo plazmidov in transpozonov. Mehanizmi genskega prenosa so konjugacija, transformacija in transdukcija. (3)

Razumevanje pojava rezistence je pomembno za racionalno uporabo znanih protimikrobnih učinkovin in načrtovanje novih. Iskanje novih protimikrobnih učinkovin poteka s klasično metodo preučevanja sekundarnih metabolitov mikroorganizmov, z modifikacijo strukture poznanih antibiotikov, s pomočjo genomike in z nekaterimi drugimi novejšimi metodami. Kljub številnim raziskavam sta bili v zadnjih 40 letih na tržišče uvedeni le dve spojini iz novih razredov (linezolid in daptomicin). Bakterijska celična stena predstavlja eno glavnih razlik med človeško in bakterijsko celico in zato sodi med pomembnejše tarče protimikrobnih učinkovin. Encimi Mur, ki sodelujejo pri biosintezi celične stene grampozitivnih in gramnegativnih bakterij, sodijo med novejša potencialna prijemališča za iskanje novih protimikrobnih učinkovin. (5, 9)

### 1.3 Bakterijska celična stena

Bakterijska celična stena je rigidna, fleksibilna in mehansko zelo odporna makromolekularna struktura, ki obdaja plazemske membrane bakterij in je značilna za skoraj vse vrste bakterije. Varuje jih pred spremembami osmotskega tlaka v okolju, omogoča vzdrževanje oblike, ščiti pred encimi gostitelja, sodeluje pri rasti in delitvi celice ter deluje kot polprepustna bariera, ki omogoča selektiven privzem snovi iz okolice.

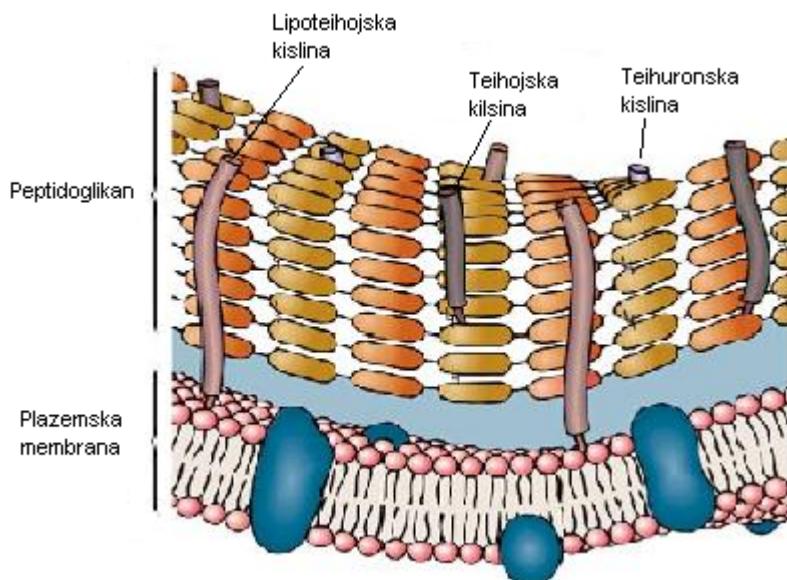
Najpomembnejša struktura celične stene je kompleksen polimer peptidoglikan. Nanj so pritrjene tudi druge komponente celične stene, kot so proteini in teiholska kislina. Bakterijska celična stena vsebuje komponente, ki niso značilne za sesalce, npr. muraminsko kislino, D-aminokisline, diaminopimelinsko kislino. (7, 8, 9)

### 1.3.1 Celična stena grampozitivnih in gramnegativnih bakterij

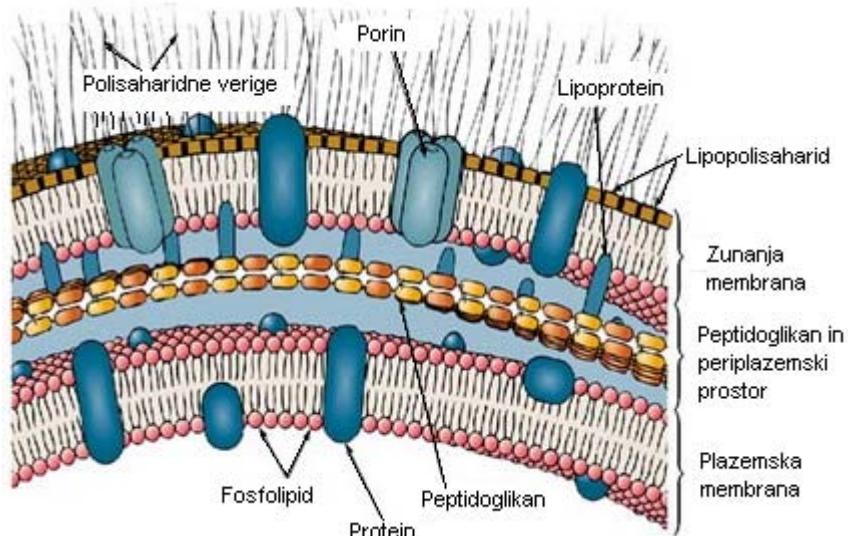
Celična stena grampozitivnih bakterij je po svoji strukturi preprostejša kot pri gramnegativnih bakterijah (slika 1); ovija jo peptidoglikanska mreža v številnih plasteh (do 40), vanjo pa sta vključena anionska polimera teihojkska in teihuronska kislina. Teihojkska kislina je sestavljena iz enot glicerolfosfata ali ribitolfosfata, teihuronska kislina pa je kemijsko glukozaminoglikan. Teihojkska kislina je lahko vezana na peptidoglikan ali pa na plazemsko membrano (lipoteihojkska kislina). Zaradi svoje zunanje lege sta pomembni pri pritrjevanju bakterije na gostiteljske celice in delujeta kot antigenski determinanti. Zaradi fosfatnih, hidroksilnih in aminskih skupin predstavljata ionsko izmenjevalni sistem, ki uravnava predvsem koncentracijo magnezijevih ionov v celici, pomembnih za pravilno delovanje encimov, ki sodelujejo pri biosintezi peptidoglikana. (2, 6, 7)

Celična stena gramnegativnih bakterij vsebuje le eno ali dve plasti peptidoglikana, ki ga navzven obdajata periplazemski prostor (vsebuje encime, ki inaktivirajo različne antibiotike) in zunanja membrana, ki je zgrajena kot asimetrični lipidni dvosloj. Notranji sloj je iz fosfolipidov, zunanjji pa iz lipopolisaharidov, ki so glavna antigenska determinanta gramnegativnih bakterij. Zaradi zunanje membrane je prepustnost celične stene gramnegativnih bakterij zelo zmanjšana, zato so v membrano vključeni porini, ki omogočajo selektiven privzem snovi v celico. Zunanje membrane ne morejo prehajati hidrofilne molekule z visoko molekulsko maso (pri *E. coli* nad 600 Da) in zelo lipofilne spojine. (2, 3)

### Grampozitivne bakterije



### Gramnegativne bakterije

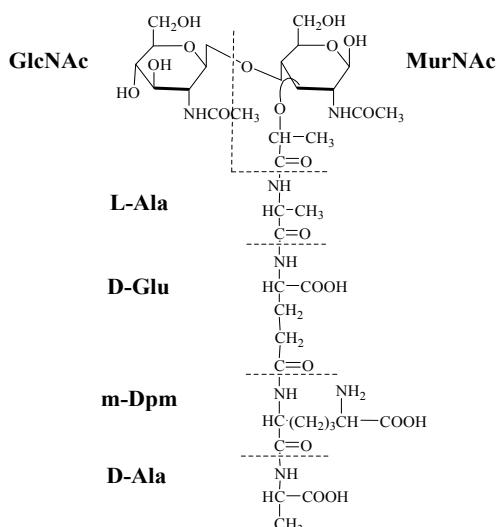


*Slika 1: Struktura celične stene grampozitivnih (10) in gramnegativnih bakterij (11)*

#### 1.3.2 Zgradba peptidoglikana

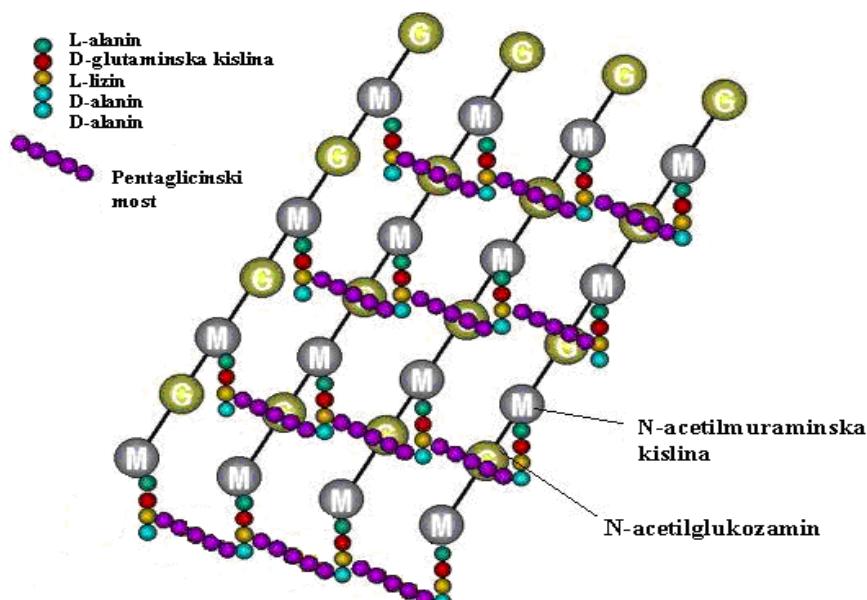
Peptidoglikan (murein) je kompleksen heteropolimer, sestavljen iz glikanskih verig, ki so med seboj povezane s kratkimi peptidinimi mostički. Glikanske verige so sestavljene iz izmenjujočih se enot N-acetylglukozamina (GlcNAc) in N-acetilmuraminske kisline (MurNAc), ki so povezane z 1,4- $\beta$  glikozidno vezjo. MurNAc je derivat GlcNAc, ki ima na tretjem ogljikovem atomu z etrsko vezjo pripeto D-laktoilno skupino. Na prosto

karboksilno skupino vsake laktolilne skupine nastajajočega peptidoglikana je pripet pentapeptid, katerega zaporedje je največkrat sledeče: L-alanin, D-glutaminska kislina, *mezo*-diaminopimelinska kislina (ali L-lizin), D-alanin, D-alanin. (slika 2) Zadnji D-alanin ni več prisoten v končni molekuli peptidoglikana. (9, 12)



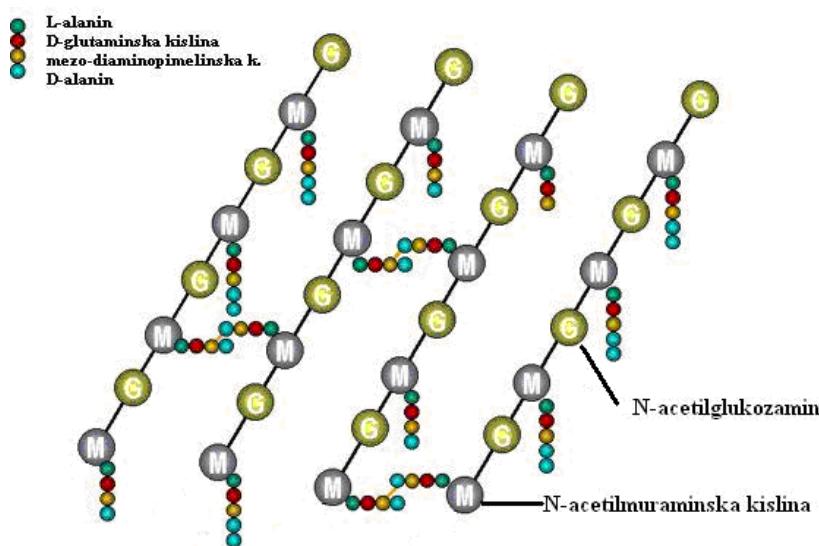
Slika 2: Zgradba osnovne monomerne enote peptidoglikana gramnegativnih bakterij

Prečna povezava glikanskih verig se tvori med prosto karboksilno skupino D-alanina na četrtem mestu in aminske skupino diaminokisline na tretjem mestu peptida sosednje verige. Pri grampozitivnih bakterijah gre za most iz petih glicinskih ostankov, (slika 3) pri večini gramnegativnih bakterij pa je prečna povezava neposredna. (slika 4) (9, 12)



Slika 3: Zgradba peptidoglikana pri grampozitivni bakteriji *S. aureus* (13)

Variacije v zgradbi med različnimi bakterijskimi vrstami so prisotne v peptidni verigi, v glikanskih vlaknih in v prečnih povezavah. Največ variacij v tetrapeptidu je na tretjem mestu. Običajno sta prisotni *mezo*-diaminopimelinska kislina (pri gramnegativnih bakterijah) ali L-lizin (pri grampozitivnih bakterijah), ki sta lahko zamenjani z L-ornitinom, L-diaminobutanojsko kislino ali L-homoserinom. Poleg tega lahko v glikanski verigi pride do *N*-deacetiliranja, *O*-acetiliranja in drugih sprememb. Prečne povezave se razlikujejo v sestavi, dolžini, in v deležu le-teh. Pri gramnegativnih bakterijah sodeluje pri prečnih povezavah 20% tetrapeptidnih verig, medtem ko je delež pri grampozitivnih lahko večji od 90%. Do manjših razlik v strukturi lahko pride tudi pri isti bakterijski vrsti in so posledica različnih rastnih pogojev. (8)

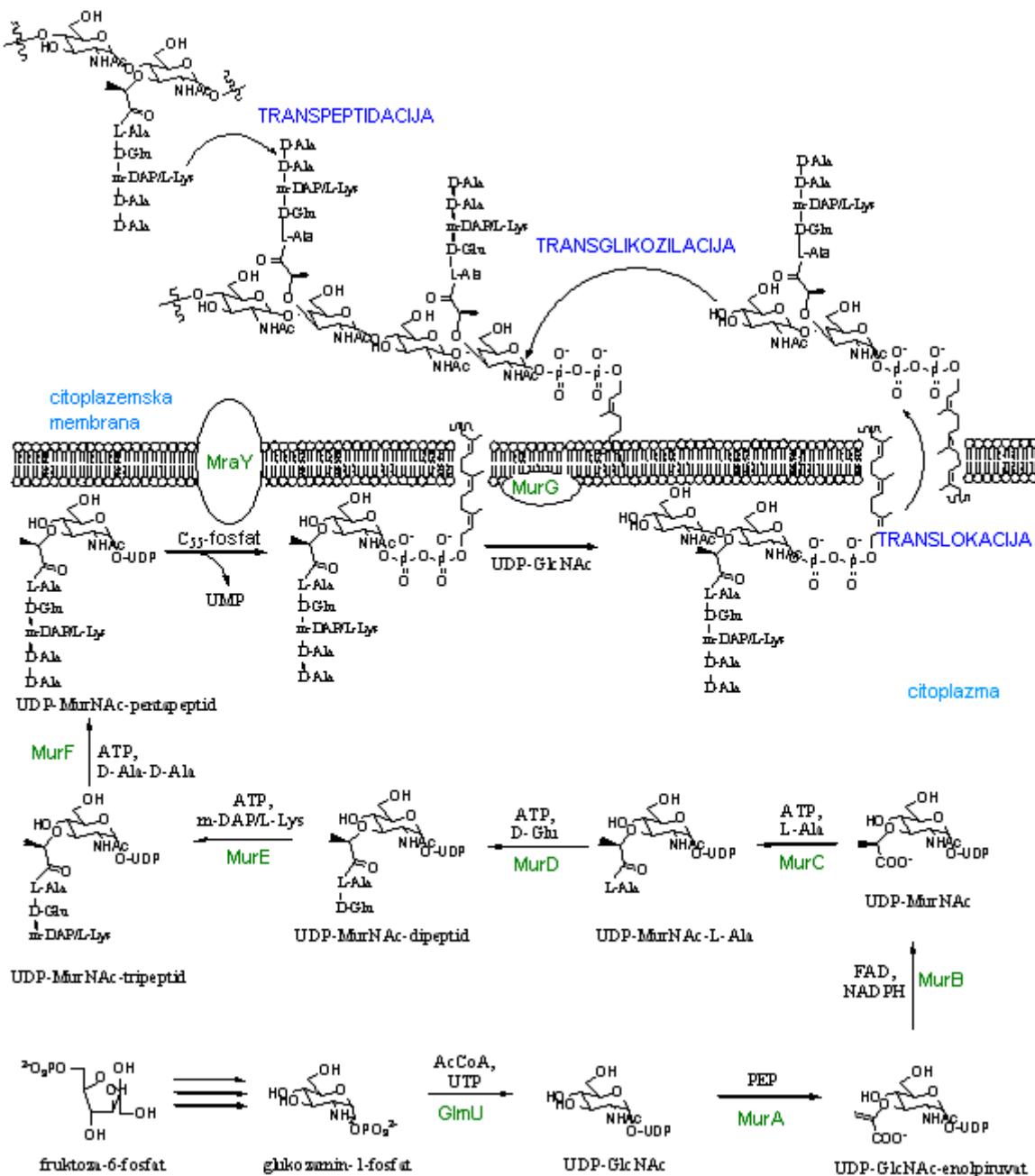


*Slika 4:* Zgradba peptidoglikana pri gramnegativni bakteriji *E.coli* (14)

### 1.3.3 Biosinteza peptidoglikana

Biosinteza peptidoglikana je kompleksen proces, sestavljen iz približno 20 reakcij, ki ga lahko razdelimo na tri stopnje:

- sinteza nukleotidnih prekurzorjev s pomočjo encimov, ki so v citoplazmi ali na notranji strani citoplazemske membrane,
- vezava dimernega prekurzorja na lipidni prenašalec in prenos skozi citoplazemske membrane,
- polimerizacijske reakcije na zunanjem delu citoplazemske membrane in vgraditev v že obstoječi peptidoglikan. (slika 5) (9, 12)



Slika 5: Shematski prikaz biosinteze peptidoglikana

V citoplazmi se iz fruktoze-6-fosfata v štirih stopnjah sintetizira UDP-N-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc), ki se v naslednjih dveh stopnjah s pomočjo encimov MurA in MurB pretvori v UDP-N-acetilmuraminsko kislino (UDP-GlcNAc). MurA katalizira prenos enolpiruvata iz fosfoenolpiruvata na 3'-hidroksilno skupino UDP-GlcNAc, sledi redukcija enola do laktoilne skupine, ki jo katalizira encim MurB. (12)

Sintezo končnega citoplazemskega prekurzorja UDP-MurNAc-pentapeptida katalizirajo ligaze Mur (MurC, D, E, F), ki kot vir energije uporabljajo ATP. Na prosto karboksilno skupino laktolinega etra UDP-MurNAc se z amidno vezjo vežejo L-alanin (MurC), D-glutaminska kislina (MurD), *mezo*-diaminopimelinska kislina ali L-lizin (MurE) ter dipeptid D-Ala-D-Ala (MurF). D-aminokisline, potrebne za te reakcije, se sintetizirajo na dva načina: z racemizacijo na  $\alpha$ -C atomu L-aminokislin s pomočjo ustreznih aminokislinskih racemaze ali preko stereoselektivne redukcije  $\beta$ -ketokisline. Na ta način nastanejo D-alanin, D-glutaminska kislina in *mezo*-diaminopimelinska kislina. (9)

V naslednjem koraku, ki poteka na citoplazemski membrani, se UDP-MurNAc-pentapeptid veže na fosforiliran lipidni prenašalec undekaprenilfosfat ( $C_{55}-P$ ), pri tem pa se sprosti UMP. Nastanek tega lipidnega intermediata (lipid I) katalizira membranski encim MraY. Nato glikoziltransferaza MurG na lipid I preko  $1,4\text{-}\beta$  vezi pripne GlcNAc in nastane lipid II, ki se prenese na zunanjou stran membrane (translokacija). (15)

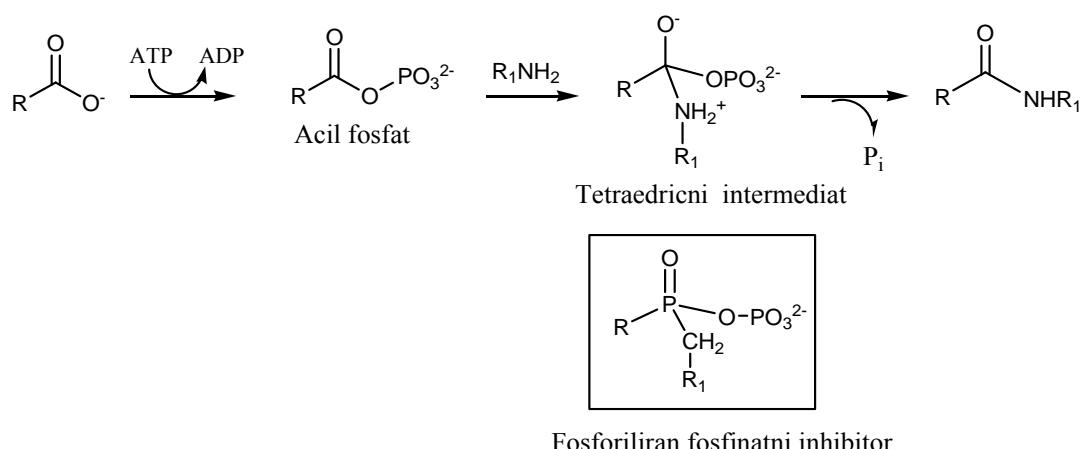
Veriga heteroglikana se podaljšuje tako, da se vez med lipidnim prenašalcem in disaharidno enoto prekine, namesto nje pa se tvori nova glikozidna vez (transglikozilacija). Do prečnih povezav med glikanskimi verigami pride v reakciji transpeptidacije, ki jo katalizirajo bifunkcionalne polimeraze oz. visokomolekularni penicilin vezovi proteini (PBP), ki katalizirajo tako transglikozilacijo kot transpeptidacijo. Prosta aminska skupina aminokisline na tretjem mestu ene peptidne verige reagira s karbonilno skupino terminalne peptidne vezi drugega pentapeptida. Odcepi se zadnji D-alanin, energija, ki se pri tem sprosti, se porabi za tvorbo nove peptidne vezi med D-alaninom in *mezo*-diaminopimelinsko kislino ali pentaglicinskim mostom. (3, 16)

## 1.4 Ligaze Mur

Ligaze Mur so od ATP odvisni encimi, ki katalizirajo tvorbo amidne oz. peptidne vezi. V to družino spadajo encimi MurC, MurD, MurE in MurF. Imajo podoben reakcijski mehanizem: najprej z  $\gamma$ -fosfatno skupino ATP aktivirajo prosto karboksilno skupino UDP-prekurzorja, pri čemer nastaneta acilfosfatni intermedijat in ADP. Za to reakcijo je potreben magnezijev ali manganov divalentni kation. Sledi nukleofilni napad aminske skupine pripenjajoče aminokisline na acilfosfat, nastane nestabilno tetraedrično prehodno stanje, ki razpade na amid oz. peptid in anorganski fosfat. (slika 6) Encimi imajo podobno zgradbo aktivnega mesta in enako 3-D strukturo iz treh domen: N-terminalna domena je odgovorna

za vezavo UDP-prekurzorja, centralna za vezavo ATP, C-terminalna domena pa veže aminokislino ali dipeptid. Razlike v strukturi N-terminalne domene so posledica različno dolgih UDP-prekurzorjev in so prisotne med MurC in MurD na eni strani ter MurE in MurF na drugi. (9, 17)

Mur ligaze so nujno potrebne za sintezo celične stene in zaradi relativno visoke stopnje podobnosti v aminokislinskem zaporedju med posameznimi bakterijskimi vrstami lahko pričakujemo, da bo imel dober inhibitor teh encimov širok spekter delovanja. Zaradi dovolj velike podobnost med Mur encimi obstaja možnost multiple inhibicije, katere prednost je v tem, da z eno spojino hkrati inhibiramo več encimov in tako dosežemo boljšo učinkovitost, obenem pa zmanjšamo možnost za pojav rezistence. (5, 18)

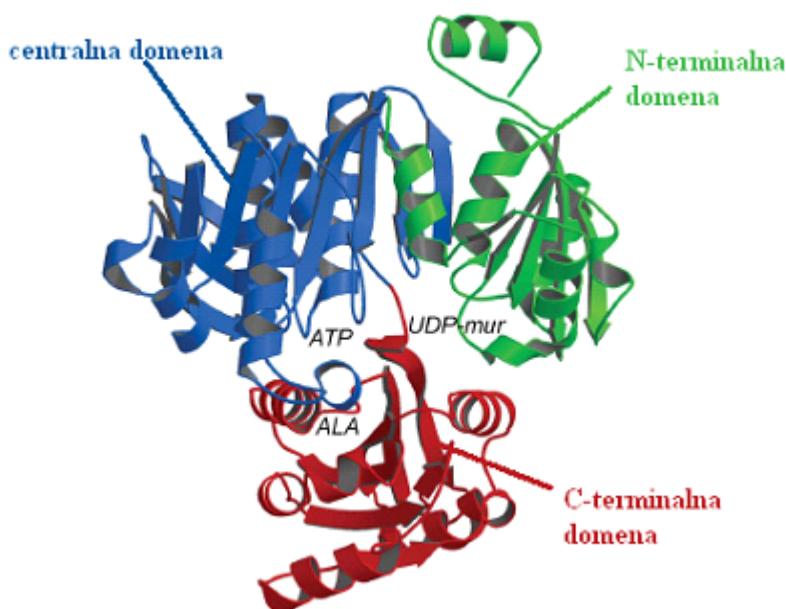


*Slika 6: Mehanizem nastanka peptidne vezi in fosfinatni inhibitor, ki posnema tetraedrično prehodno stanje*

#### 1.4.1 Ligaza MurC

Encim UDP-N-acetilmuramat:L-alanin-ligaza (MurC) katalizira vezavo prve aminokisline na UDP-MurNAc, največkrat je to L-alanin, redkeje glicin ali L-serin. (9, 19) Kristalna struktura encima je bila ugotovljena za tri vrste bakterij: *Haemophilus influenzae*, *Thermotoga maritima* in *Escherichia coli*. (slika7) (9) Encim je sestavljen iz treh domen, aktivno mesto encima leži na njihovem stičišču. V aktivno mesto se najprej veže ATP, nato UDP-MurNAc in nazadnje L-alanin.(17) N-terminalna domena je sestavljena iz 5 centralnih paralelnih β-struktur, ki jih obdajajo 4 α-vijačnice in ima dinukleotidni vezavni zavoj (Rossmanovo zvitje). Ta domena veže nukleotidni del substrata UDP-MurNAc z

zanko bogato z glicinom ter tvori povezave s fosfatnima skupinama UDP. Centralna domena je največja in vsebuje 7 centralnih, večinoma paralelnih  $\beta$ -struktur, ki jih obdajajo 4  $\alpha$ -vijačnice, poleg tega ima še 3 manjše antiparalelne  $\beta$ -strukture. Interakcije tvori z adeninskim obročem in fosfatnimi skupinami ATP. C-terminalna domena ima prav tako Rossmannovo zvitje in je sestavljena iz 6 centralnih  $\beta$ -strukturnih elementov, ki jih obdaja 5  $\alpha$ -vijačnic. Leži nad centralno domeno in tvori povezave z ribozo in fosfatno skupino ATP ter poskrbi za pravilno orientacijo in vezavo liganda L-alanina. (17, 19)



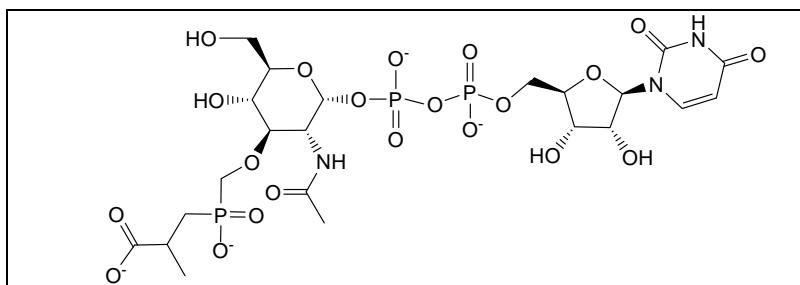
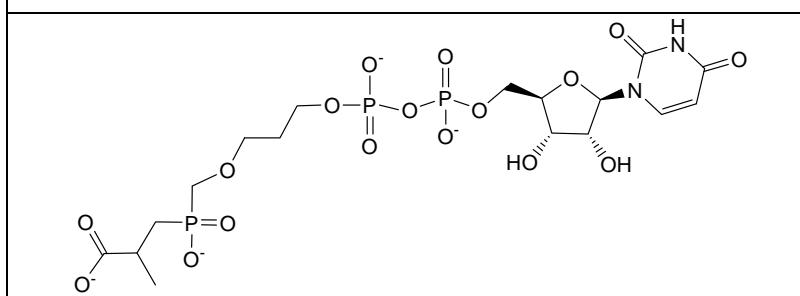
*Slika 7: Prostorska struktura encima MurC (20)*

#### 1.4.1.1 Inhibitorji encima MurC

Fosfinatni inhibitorji so derivati fosfinske kisline in so najbolj učinkoviti inhibitorji encima MurC ter ostalih ligaz Mur. Vendar pa še nobena od teh spojin ni imela protibakterijske aktivnosti, verjetno zaradi slabega prehajanja v bakterijsko celico. (18)

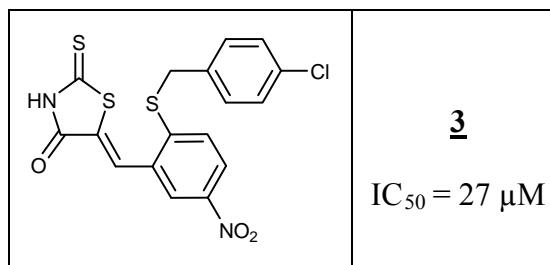
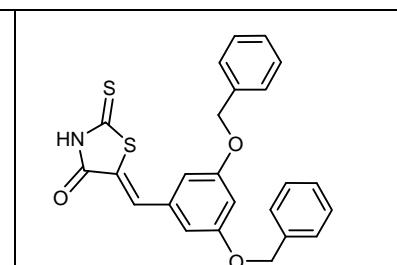
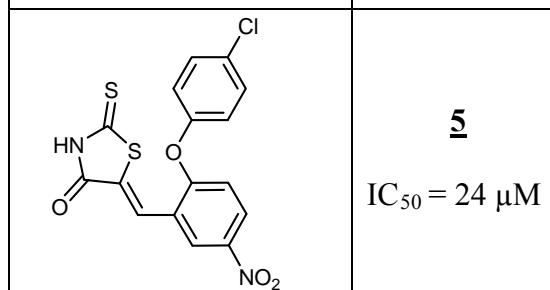
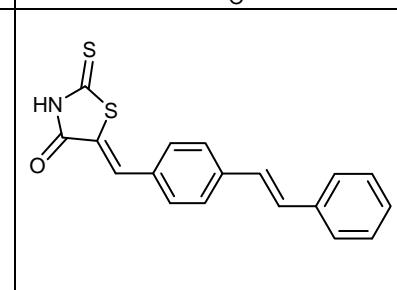
Fosfinati se v aktivnem mestu encima s pomočjo ATP fosforilirajo in posnemajo tetraedrično prehodno stanje, ki sicer nastane pri tvorbi amidne vezi. Spojina **1** (preglednica I) z  $IC_{50} = 49$  nM je najaktivnejši do sedaj poznani inhibitor encima MurC. Zamenjava sladkornega dela s fleksibilnim 1,3-propandiolnim distančnikom pri spojini **2** zmanjša aktivnost za več kot 1000-krat, prav tako je za delovanje potreben UDP-del molekule. (preglednica I) (21)

**Preglednica I:** Fosfinatna inhibitorja encima MurC

	<b>1</b>	$IC_{50} = 49 \text{ nM}$
	<b>2</b>	$IC_{50} = 60 \mu\text{M}$

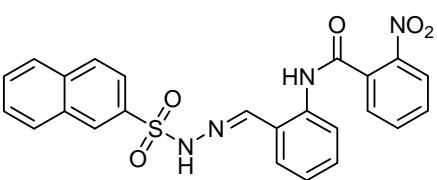
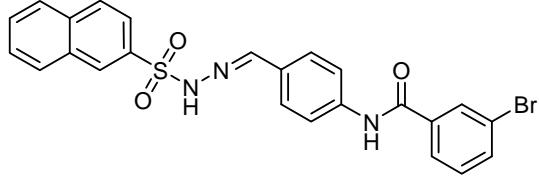
Benziliden rodanini so nepeptidni inhibitorji encima MurC. Na podlagi spojine **3** so sintetizirali različne analoge, od katerih je bilo pet spojin aktivnih. (preglednica III) Ugotovili so, da je za inhibitorno delovanje potrebna prosta NH skupina, ki tvori vodikove vezi z aktivnim mestom encima. Testiranja na bakterijskih celicah so pokazala, da nekatere spojine inhibirajo grampozitivni na meticilin rezistentni *S. aureus* (MRSA), nobena od teh spojina pa ne deluje inhibitorno proti gramnegativni *E. coli*. Spojina **3** je bila citotoksična za CHO (Chinese hamster ovary) celice. (22)

**Preglednica II:** Benzilidenrodaninski inhibitorji encima MurC

	<b>3</b>	$IC_{50} = 27 \mu\text{M}$		<b>4</b>	$IC_{50} = 12 \mu\text{M}$
	<b>5</b>	$IC_{50} = 24 \mu\text{M}$		<b>6</b>	$IC_{50} = 18 \mu\text{M}$

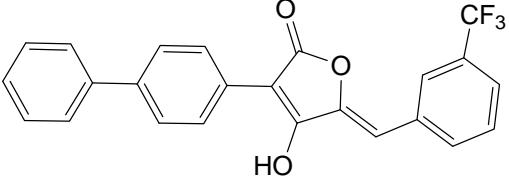
Z modifikacijo spojin **3** in **6** iz skupine benziliden rodaninov so pripravili nove N-benzilidensulfonohidrazidne inhibitorje encimov MurC in MurD. Osnovni tioksotiazolidin-4-onski obroč so zamenjali z acikličnim arilsulfonohidrazidnim fragmentom, ki še vedno vsebuje kislo NH skupino, pomembno za inhibitorno delovanje. (preglednica III) (23)

**Preglednica III:** *N-benzilidensulfonohidrazidna inhibitorja MurC in MurD*

	<b>7</b> $IC_{50} = 27 \mu M$
	<b>8</b> $IC_{50} = 30 \mu M$

Pulvinoni so dekarboksilirani analogi pulvinske kisline. S sintezo številnih derivatov so odkrili spojine s protibakterijsko učinkovitostjo proti grampozitivnim bakterijam, vključno z na meticilin rezistentni *S. aureus* (MRSA), na vankomicin rezistentni *E. faecalis* (VRE) in na penicilin rezistentni *S. pneumoniae* (PRSP). Pulvinoni inhibirajo encime MurA, MurB, MurC in MurD, nekateri tudi z  $IC_{50} = 1-10 \mu M$ . Spojina **9** je dober inhibitor encima MurC. (preglednica IV) (24)

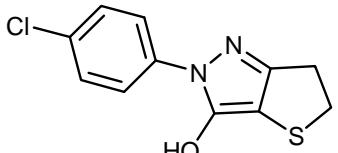
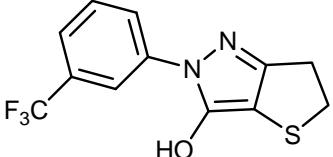
**Preglednica IV:** *Pulvinonski inhibitor encima MurC*

	<b>9</b> $IC_{50} = 8 \mu M$
---	---------------------------------

Številni derivati 2-fenil-5,6-dihidro-1*H*-tieno-[3,2-*c*]pirazol-3-ola delujejo inhibitorno na encime MurB, MurC (preglednica V) in MurD bakterije *S. aureus* in izkazujejo dobro protimikrobnou aktivnost proti grampozitivnim bakterijam, vključno z

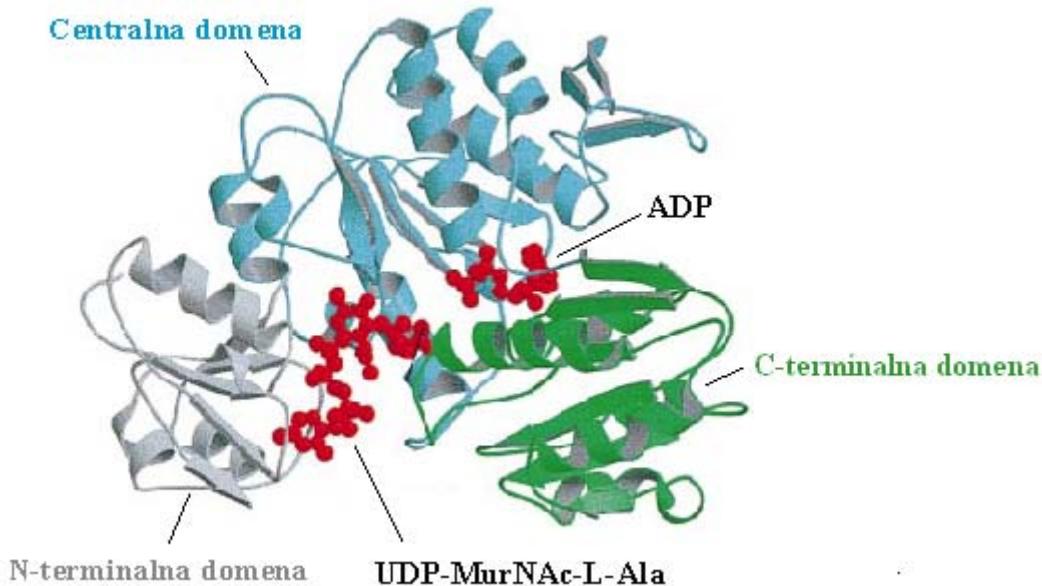
rezistentnimi sevi MRSA, VRE in PRSP. Žal imajo visoko afiniteto do govejega serumskega albumina, kar močno poviša njihove inhibitorne koncentracije. (25)

**Preglednica V: Derivati 2-fenil-5,6-dihidro-1H-tieno-[3,2-c]pirazol-3-ola kot inhibitorji MurC**

 <b>10</b> $IC_{50} = 10.1 \mu M$
 <b>11</b> $IC_{50} > 25 \mu M$

#### 1.4.2 Ligaza MurD

Encim UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin:D-glutamat-ligaza (MurD) katalizira vezavo D-glutaminske kisline na produkt reakcije, katalizirane z MurC. Za svoje delovanje potrebuje magnezijeve ione, ki sodelujejo pri vezavi ATP in pri nastanku acilfosfatnega intermediata. (9, 26) Sestavljen je iz treh globularnih domen s podobnimi značilnostmi, kot jih imajo ostali encimi družine ligaze Mur. N-terminalna domena je sestavljena iz 5 paralelnih  $\beta$ -struktur, ki jih obdajajo 4  $\alpha$ -vijačnice in ima dinukleotidno vezavno mesto, na katerega se veže UDP del sladkornega substrata. Centralna domena je sestavljena iz 6 paralelnih  $\beta$ -struktur, ki jih obdaja 7  $\alpha$ -vijačnic in 3 majhne antiparalelne  $\beta$ -strukture in ima mononukleotidno vezavno mesto za ATP. C-terminalna domena je sestavljena iz 5 paralelnih  $\beta$ -struktur in 1 antiparalelne, obdaja pa jih 5  $\alpha$ -vijačnic. Na njej je vezavno mesto za D-glutaminsko kislino. (18, 27)

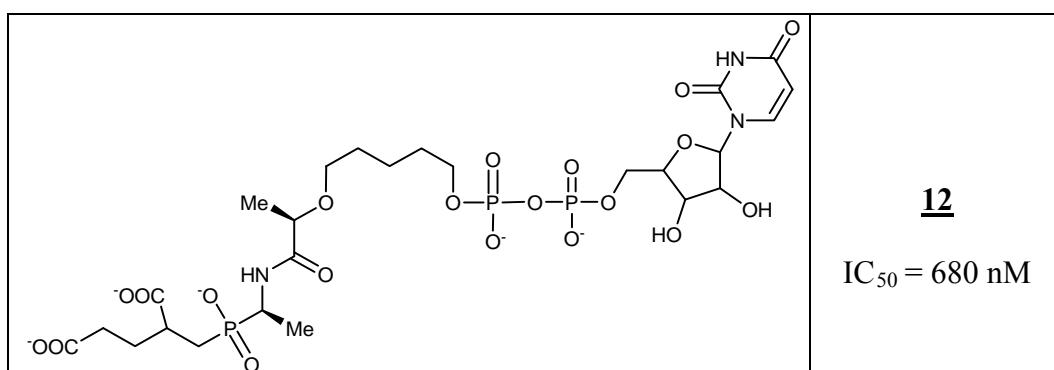


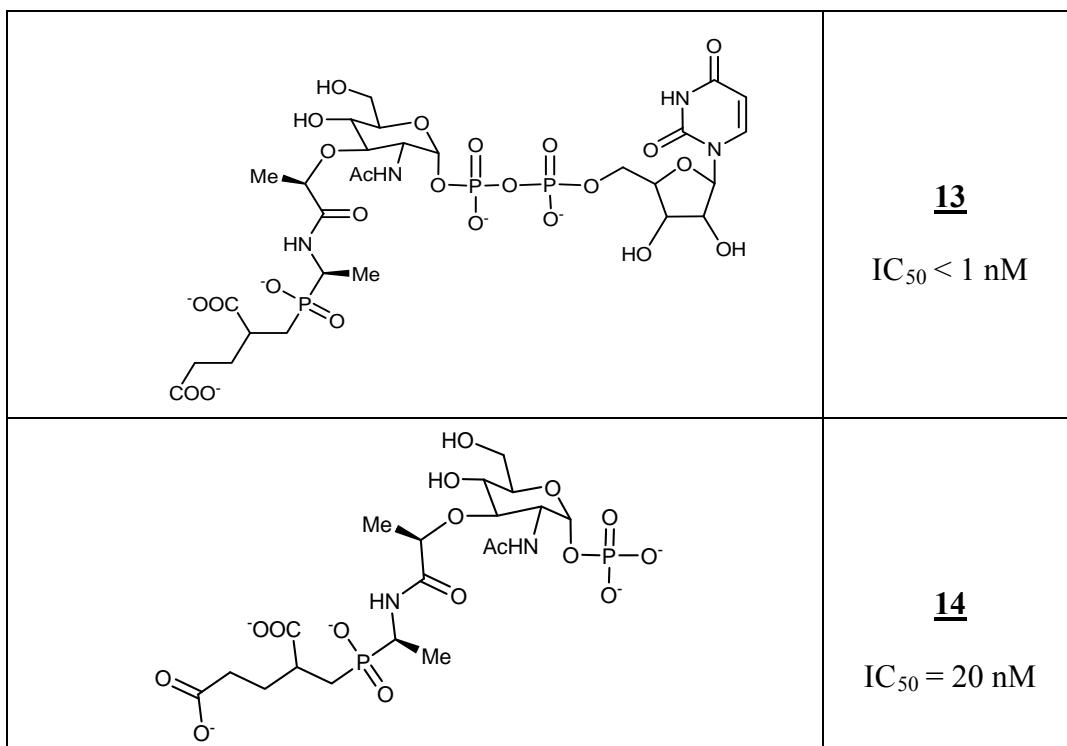
*Slika 9: Prostorska struktura encima MurD v kompleksu z ADP in UDP-MurNAc-L-Ala (27)*

#### 1.4.2.1 Inhibitorji encima MurD

Fosfinatni inhibitorji encima MurD so bili načrtovani na podlagi poznavanja mehanizma delovanja encima. Prvi učinkovit inhibitor z  $IC_{50} = 680$  nM, je bil fosfinatni analog prehodnega stanja z alifatsko verigo namesto MurNAc. Še aktivnejši je bil derivat z ohranjenim MurNAc fragmentom (spojina **13**) (preglednica VI). Za inhibitorno delovanje je pomembna tudi terminalna fosfatna skupina spojine **14**, saj se aktivnost spojine znatno zmanjša, če jo zamenjamo s hidroksilno skupino. (28)

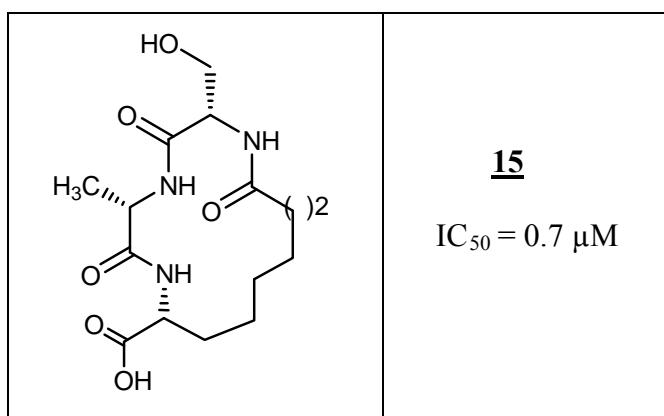
*Preglednica VI: Fosfinatni inhibitorji encima MurD*





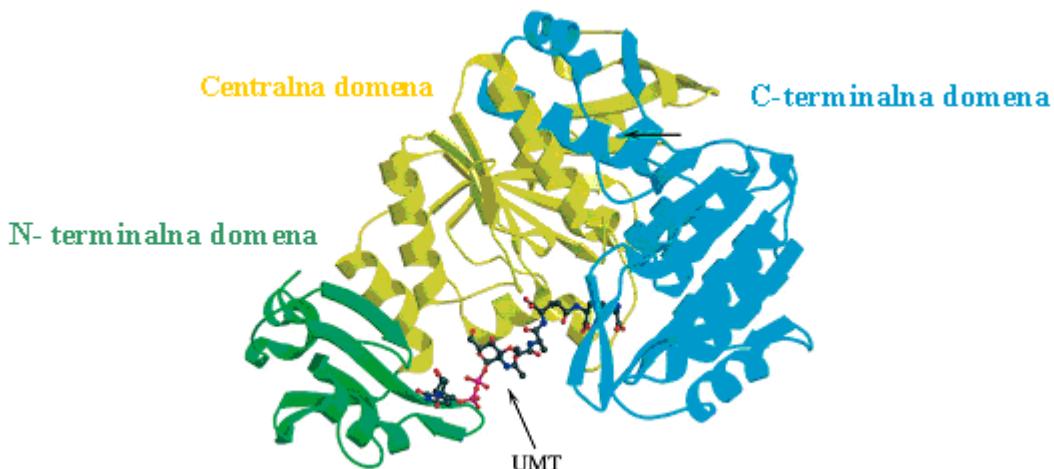
Z dodatno alkilno povezavo med N-acilno skupino in L-alaninom, ki tvori interakcije s hidrofobnim področjem, so pripravili novo skupino makrocikličnih inhibitorjev, na primer spojino **15**. (preglednica VII) (29)

*Preglednica VII: Makrociklični inhibitor encima MurD*



### 1.4.3 Ligaza MurE

Encim MurE katalizira pripenjanje L-lizina pri grampozitivnih bakterijah in *mezo-diaminopimelinske kisline* pri gramnegativnih bakterijah na peptidoglikanski prekurzor. MurE je zelo specifičen in veže večinoma le omenjeni aminokislini. Kristalna struktura encima v kompleksu s produktom je bila določena za bakterijo *E. coli*. MurE je sestavljen iz treh domen in je strukturno najbolj podoben MurD. (26) N-terminalna domena je iz 5  $\beta$ -struktur, ki so obdane z 2  $\alpha$ -vijačnicama, centralna domena ima 6 paralelnih  $\beta$ -struktur in 7  $\alpha$ -vijačnic, C-terminalna domena pa 6  $\beta$ -struktur, obkroženih s 5  $\alpha$ -vijačnicami. Vezavno mesto za peptidoglikanski prekurzor je na stičišču vseh treh domen, centralna domena veže ATP, C-terminalna pa ustreznou aminokislino. (9, 30)



*Slika 10: Prostorska struktura encima MurE in produkt UMT (30)*

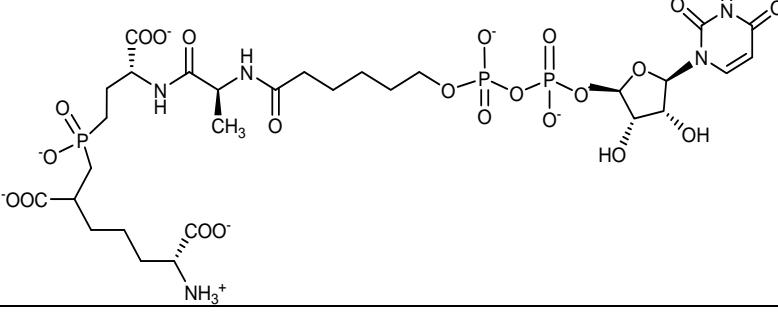
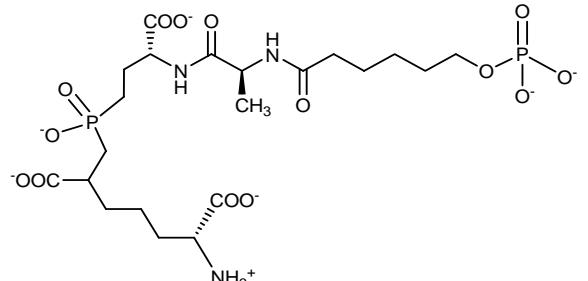
#### 1.4.3.1 Inhibitorji encima MurE

Fosfinatna analoga prehodnega stanja (preglednica VIII) inhibirata encim MurE bakterije *E. coli* v mikromolarnih koncentracijah. Za uspešno delovanje je potreben celoten UDP del molekule. (spojina 16). (31)

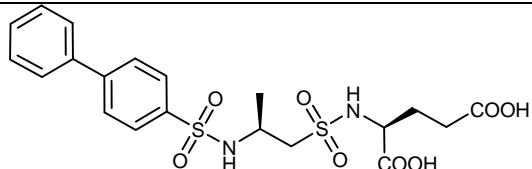
Spojina 18 (preglednica IX) je analog substrata za encim MurE in prestavlja izhodišče za nadaljnje modifikacije inhibitorjev encima MurE. (32)

Protimikrobne učinkovine, ki so mimetiki prehodnega stanja encima MurD, so lahko hkrati substrati za encim MurE. Kot taka se je izkazala spojina **19**, spojina **20** pa deluje inhibitorno predvsem na MurE (preglednica X). (31)

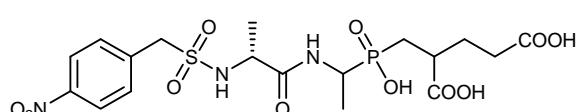
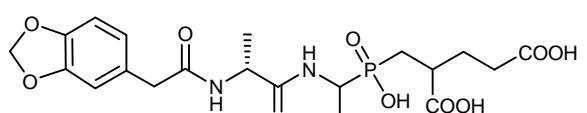
*Preglednica VIII: Fosfinatna inhibitorja encima MurE bakterije E. coli*

 <b>16</b> $IC_{50} = 1.1 \mu M$	
 <b>17</b> $IC_{50} = 700 \mu M$	

*Preglednica IX: Sulfonamidni inhibitor encima MurE*

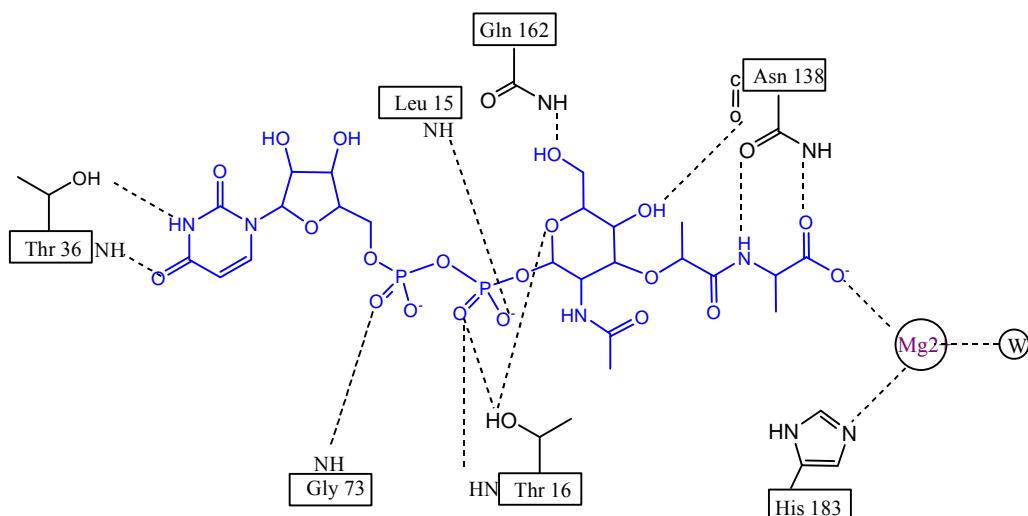
	<b>18</b> $IC_{50} = 181 \mu M$
---	------------------------------------

*Preglednica X: RA novejših fosfinatnih inhibitorjev pri koncentraciji 1mM*

		<b>RA (%) MurD</b>	<b>RA (%) MurE</b>
<b>19</b>		8	13
<b>20</b>		44	12

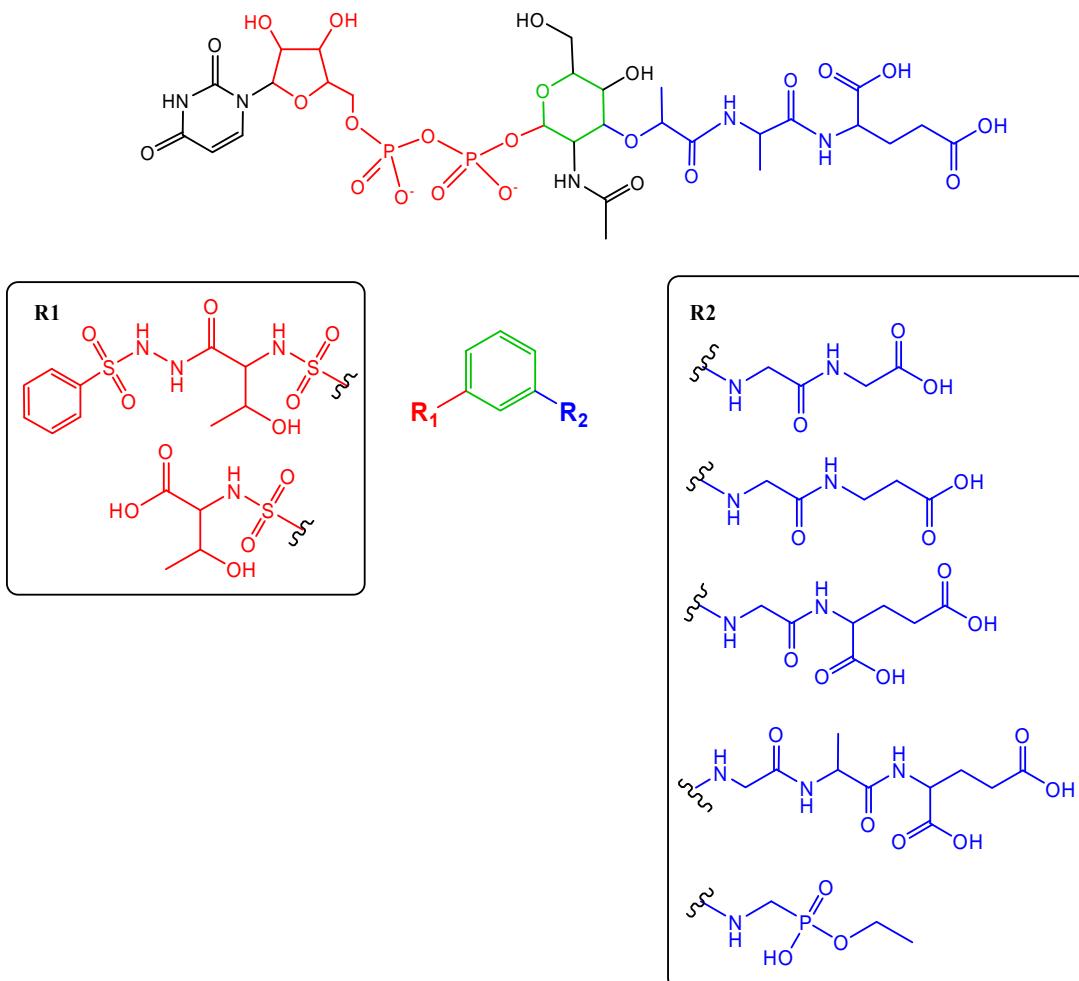
## 2 Načrt za delo

V okviru diplomske naloge bomo pripravili nove potencialne inhibitorje encimov MurC, MurD in MurE. Na podlagi predhodnega načrtovanja spojin s pomočjo molekulskega modeliranja in sidranja v aktivno mesto encimov bomo sintetizirali spojine z osnovno 3-aminobenzensulfoniltreoninsko strukturo in različnimi substituenti na karboksilni in aromatski aminski skupini. Končne spojine bodo analogi substratov in produktov encimov MurC in MurD ter analogi substrata encima MurE. Kompetitivni inhibitor se mora umestiti v aktivno mesto encima in tvoriti interakcije z aminokislinskimi ostanki. (slika 11)



**Slika 11:** Shematski prikaz vodikovih vezi, ion-ion in ion-dipol interakcij med substratom UMA in aktivnim mestom encima MurD

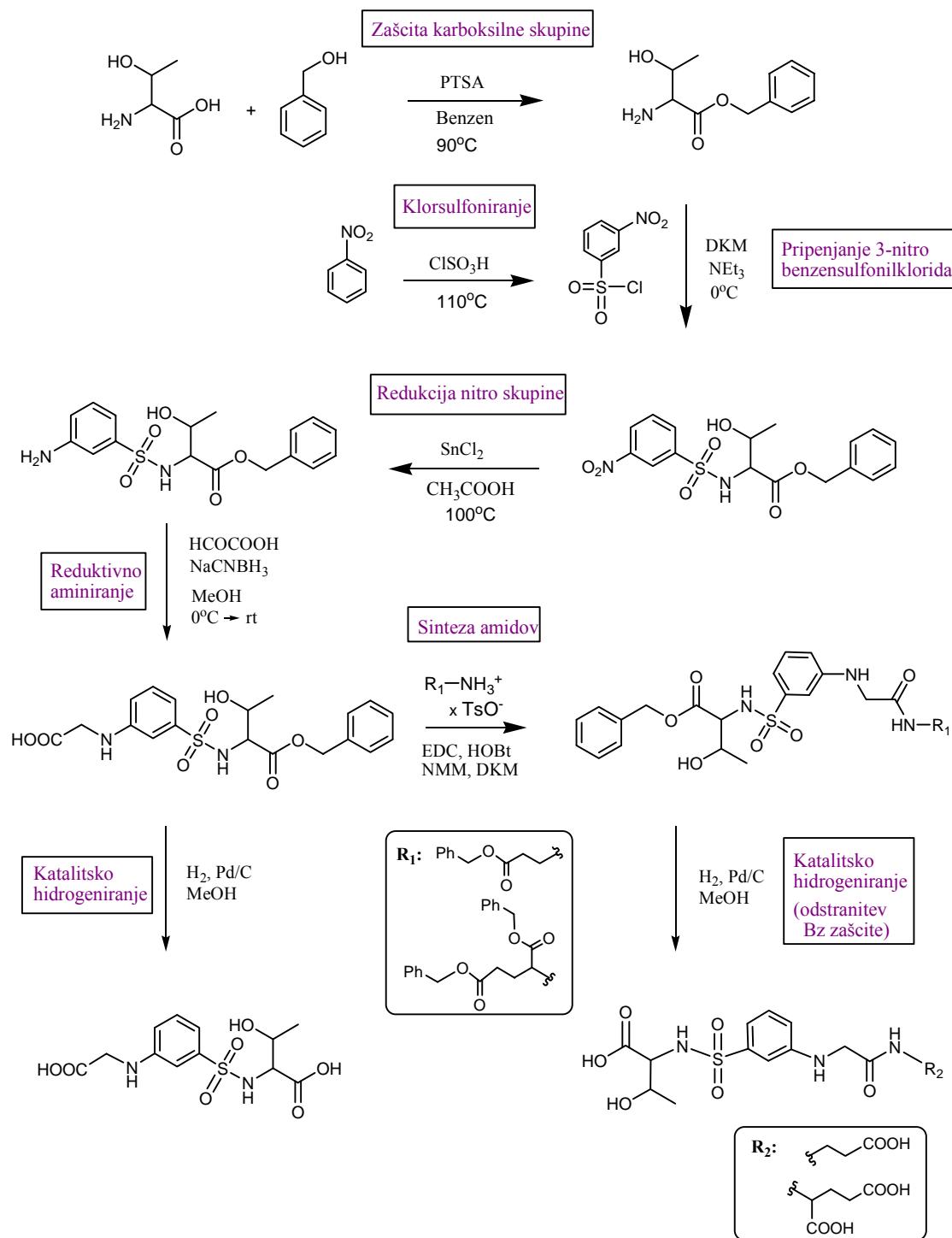
S sintetiziranimi spojinami bomo poskušali posnemati tiste fragmente naravnih substratov, ki so pomembni za tvorbo interakcij z aktivnim mestom encima. MurNAc bomo nadomestili s togim benzenovim obročem, peptidni del bomo zamenjali s podobnimi peptidi, aminokislinami in aminokislinskим analogom, benzenov obroč pa bomo na *meta* mestu substituirali z dvema različnima substituentoma, ki bosta nadomestila difosfatni del. (slika 12)



**Slika 12:** Primerjava strukture UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutaminske kisline z derivati 1,3-disubstituiranega benzena

## 1. Prva sintezna pot

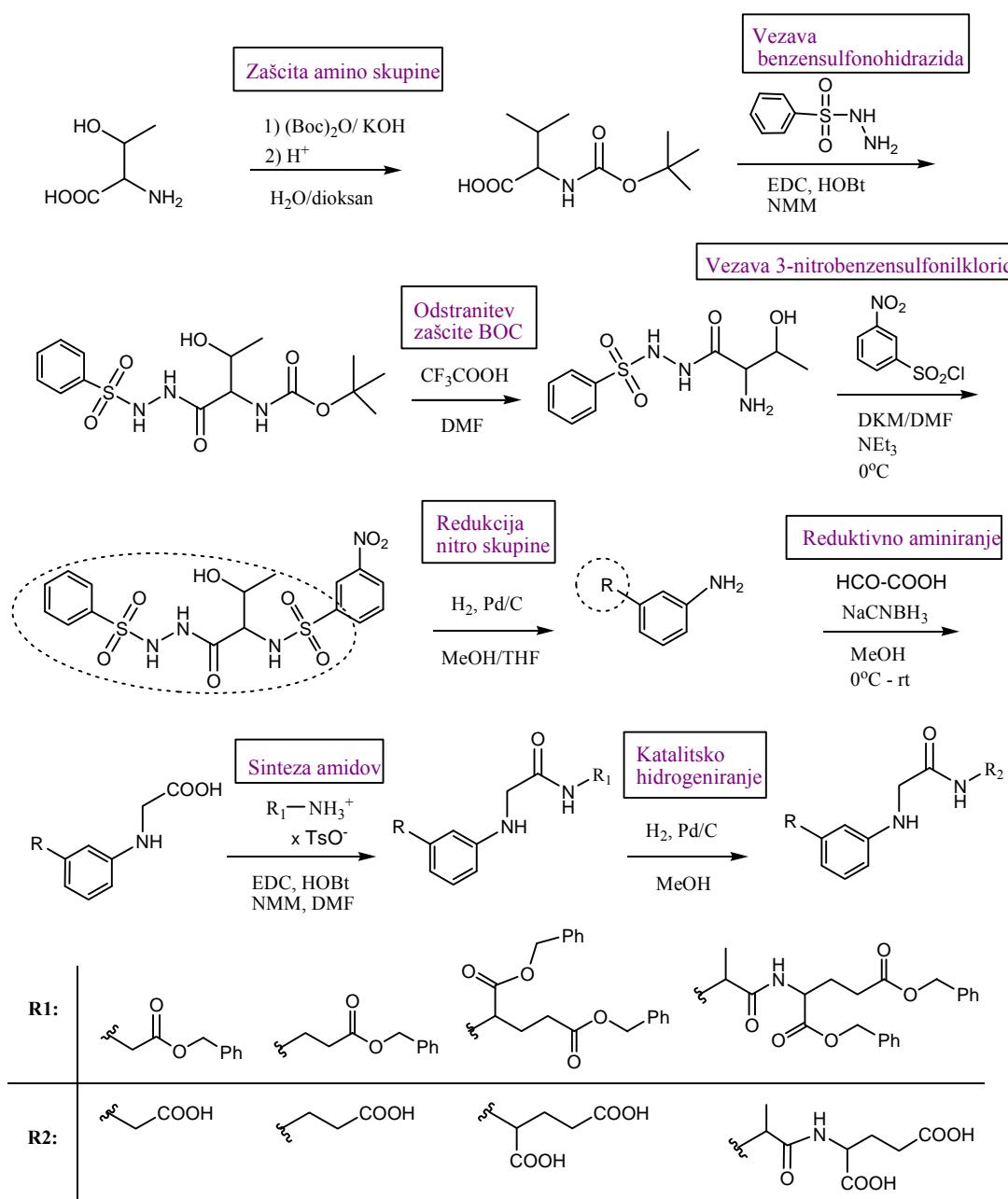
V prvi stopnji bomo L-treonin zaščitili v obliki benzilnega estra. Nato bomo na prosto aminsko skupino pripeli 3-nitrobenzensulfonilklorid, ki ga bomo pred tem pripravili iz nitrobenzena in klorsulfonske kisline. Sledila bo redukcija aromatske nitro skupine do amina, na katerega bomo pripeli glioksalno kislino, nastali imin pa bomo reducirali z  $\text{NaCNBH}_3$  (reduktivno aminiranje). Na prosto karboksilno skupino bomo preko amidne vezi pripeli različne aminokisline in dipeptide, zaščitene v obliki benzilnih estrov. Benzilne skupine bomo v zadnji stopnji odstranili s katalitskim hidrogeniranjem in tako dobili končne spojine.



*Slika 13: Reakcijska shema prve sintezne poti*

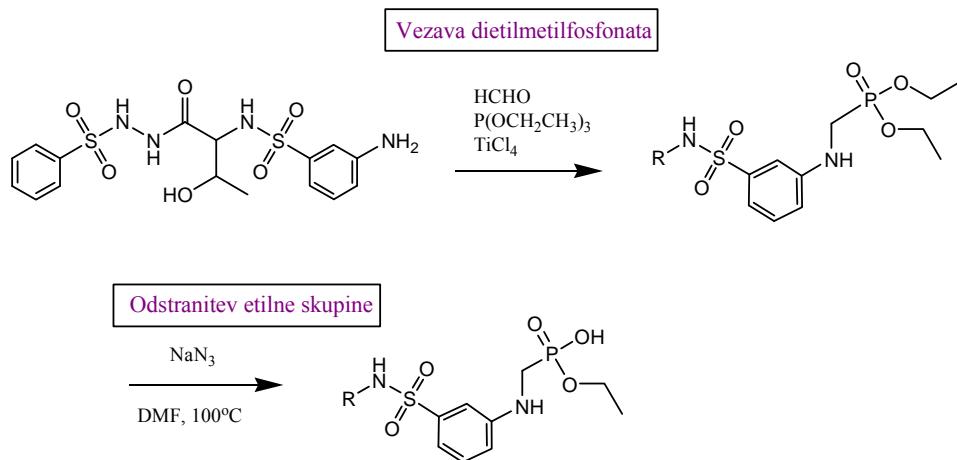
## 2. Druga sintezna pot

L-treonin bomo zaščitili v obliki *terc*-butilkarbamata in na prosto karboksilno skupino vezali benzensulfonohidrazid. Nato bomo z uporabo trifluorocetne kisline odstranili BOC zaščito in na prosto aminsko skupino pripeli predhodno sintetiziran 3-nitrobenzensulfonilklorid. Sledila bo redukcija nitro skupine v aminsko skupino, nadaljevanje pa bo analogno kot pri prvi sintezni poti.



*Slika 14: Reakcijska shema druge sintezne poti*

Pri sintezi spojine z metilfosfonatno skupino bomo uporabili predhodno sintetizirano spojino s prosto aromatsko aminsko skupino, na katero bomo najprej vezali dietilmelilfosfonat, v naslednji stopnji pa bomo ob segrevanju in prisotnosti natrijevega azida selektivno odstranili eno etilno skupino.



*Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine z metilfosfonatno skupino*

Sintetiziranim spojinam bomo *in vitro* določili inhibitorno aktivnost na izoliranih encimih MurC, MurD in MurE. Rezultati bodo pripomogli k razumevanju strukturnih zahtev za inhibitorno delovanje na omenjene encime. V primeru, da bodo spojine izkazovale aktivnost, bodo z nadaljnji raziskavami skušali optimizirati strukturo inhibitorjev ligaz Mur.

### 3 MATERIALI IN METODE

#### 3.1 Materiali

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

#### 3.2 Metode

##### Kromatografske metode

Za tankoplastno kromatografijo, s katero smo spremljali potek reakcij in postopke čiščenja, smo uporabljali TLC plošče Kieselgel 60 F<sub>254</sub> izdelovalca Merck z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem in različne mobilne faze, ki so navedene pri vsaki spojni posebej. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko ( $\lambda = 254$  nm) in različne orositvene reagente.

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

##### Spektroskopske metode

###### Jedrska magnetna resonanca (NMR)

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

###### Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti na spektrofotometru Varian-MAT 311 A z ESI tehniko na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Za nekatere spojine so bili posneti tudi HR-MS spektri kot nadomestilo elementne analize spojin.

### Infrardeča spektroskopija (IR)

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

### Elementna analiza

Relativno vsebnost ogljika, vodika in dušika so izmerili z analizatorjem Perkin Elmer 2400 CHN na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

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

### **Določevanje tališča**

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

### **Optična sučnost**

Optična sučnost spojin je bila izmerjena s polarimetrom Perkin-Elmer 1241MC na Fakulteti za farmacijo, na Katedri za farmacevtsko kemijo. Izmerjena je bila pri valovni dolžini 589,3 nm v kiveti dolžine 10 cm in tempertaturi 20°C.

### **Biološko testiranje**

Spojine, ki smo jih sintetizirali, so bile testirane na inhibitorno aktivnost na encimih MurC in MurD s testom z malahitnim zelenim. Test se izvaja na mikrotitrski ploščici s pripravljenimi raztopinami encima, substrata in testiranih spojin. Osnova testa je tvorba fosfomolibdatnega kompleksa med Pi, ki nastane pri hidrolizi ATP in barvilom malahitnim zeleno. Količino kompleksa določimo spektrofotometrično pri valovni dolžini 650 nm. Katalitično aktivnost encimov ovrednotimo na podlagi množine fosfata, ki nastane pri reakciji, pri čemer mora biti množina nastalega fosfata v linearinem 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 podamo z rezidualno aktivnostjo (RA), ki predstavlja razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti inhibitorja in aktivnostjo encima brez inhibitorja.

Testi so bili izvedeni na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo v okviru projekta INTAFAR.

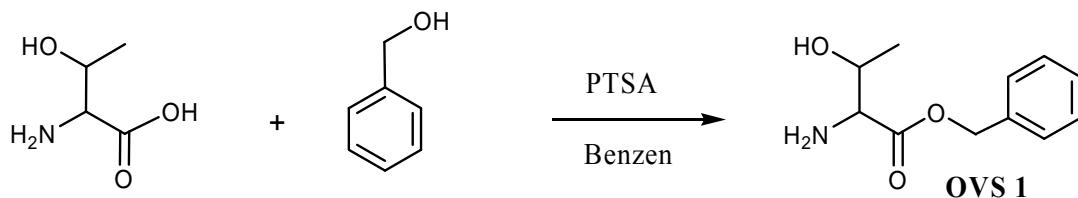
### **Nomenklatura in risanje spojin**

Pri poimenovanju spojin in risanju strukturnih formul smo uporabili program ChemDraw Ultra 9.0 podjetja CambridgeSoft.

## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1 Sintezni postopki in rezultati analiz (prva sintezna pot)

#### 4.1.1 Sinteza benzil 2-amino-3-hidroksibutanoata (OVS 1) (33)



20,0 g (168 mmol) L-treonina in 35,5 g (185 mmol) p-toluensulfonske kisline smo raztopili v 250 ml benzilnega alkohola in preko hladilnika dodali 500 ml benzena. Namestili smo Dean-Starkovo past in klorkalcijevo cevko ter segrevali 1 dan pri temperaturi vrenja. Nato smo odparili benzen pri znižanem tlaku, preostanku dodali 200 ml etilacetata in ekstrahirali s  $4 \times 200$  ml destilirane vode. Združene vodne faze smo naalkalili s 35 g (420 mmol) NaHCO<sub>3</sub> in ekstrahirali z etilacetatom, dokler ni ves produkt prešel v organsko fazo ( $14 \times 50$  ml). Zadnjih šest frakcij, ki niso vsebovale benzilnega alkohola, smo prelili z dietiletrom in petroletrom, pri tem so izpadeli beli kristali. Nato smo združili še prvih osem frakcij in z vakumsko destilacijo oddestilirali benzilni alkohol. Produkt smo prelili z dietiletrom in petroletrom in dobili bele kristale. Skupaj smo dobili 6,05 g (28,9 mmol) produkta.

**Izkoristek reakcije:** 0,17

**Rf:** 0,06 (Mf: heksan/AcOEt = 1/1)

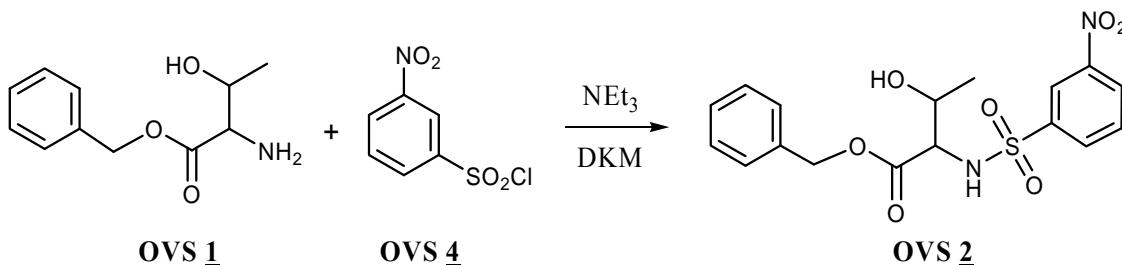
**orositveni reagent:** ninhidrin

**T<sub>tališča</sub>:** 58-60 °C

**T<sub>tališča v literaturi:</sub>** 65-66 °C

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = -15,1^\circ$  (c = 0,27 g/100 ml, MeOH)

#### 4.1.2 Sinteza benzil 3-hidroksi-2-(3-nitrofenilsulfonamido)butanoata (**OVS 2**)



4,84 g (23,1 mmol) benzilnega estra L-treonina (**OVS 1**) smo raztopili v 50 ml DKM, dodali 4,8 ml (34,7 mmol) trietylamina in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo s kapalnikom dodali 5,13 g (23,1 mmol) spojine **OVS 4** raztopljeni v DKM. Preverili smo bazičnost raztopine in mešali reakcijsko zmes preko noči. Nato smo odparili topilo pri znižanem tlaku, dodali 100 ml etilacetata, spirali z  $2 \times 30$  ml 10% citronske kisline, z  $2 \times 30$  ml nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$  in s 30 ml nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , filtrirali in pri znižanem tlaku odparili topilo. Ob dodatku dietiletra in petroletra so izpadli beli kristali. Dobili smo 5,63 g (14,3 mmol) produkta.

**Izkoristek reakcije:** 0,62

**Rf:** 0,28 (Mf: DKM/MeOH = 20/1)

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  1.04 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.98 (dd,  $J_1 = 3.4$  Hz,  $J_2 = 8.6$  Hz, 1H, CHNH), 4.04-4.14 (m, 1H, CHOH), 4.91 (AA'BB',  $J = 12.7$  Hz,  $\Delta\nu = 21.9$  Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 5.01 (d,  $J = 5.3$  Hz, 1H, OH), 7.17-7.23 (m, 2H, Ar-H), 7.28-7.33 (m, 3H, Ar-H), 7.79 (t,  $J = 8.0$  Hz, 1H, Ar-H), 8.19 (m, 1H, Ar-H), 8.38 (m, 1H, Ar-H), 8.53 (d,  $J = 9.2$  Hz, 1H, SO<sub>2</sub>NH), 8.57-8.59 (m, 1H, Ar-H) ppm.

**MS (ESI+):** m/z (%): 417 (MNa<sup>+</sup>, 68), 141 (100)

**HR-MS:** m/z: MNa<sup>+</sup> 417,0723 (izračunano za C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>SNa: 417,0732)

**IR (KBr):** 3463, 3276, 3145, 2985, 2935, 2907, 2361, 2343, 1717, 1609, 1531, 1484, 1448, 1354, 1276, 1155, 1081, 1027, 939, 838, 734, 662, 595 cm<sup>-1</sup>

**Elementna analiza za C<sub>17</sub>H<sub>18</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S:**

%C	%H	%N
----	----	----

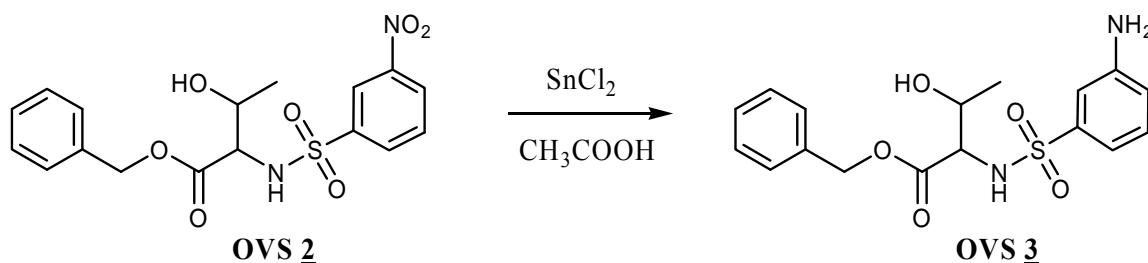
Izračunano: 51,77 4,60 7,10

Ugotovljeno: 51,99 4,62 7,12

**T<sub>tališča</sub>:** 128-131 °C

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = +34,6^\circ$  (c = 0,255 g/100 ml, MeOH)

#### 4.1.3 Sinteza benzil 2-(3-aminofenilsulfonamido)-3-hidroksibutanoata (OVS 3)



10,0 g (25,4 mmol) spojine **OVS 2** smo raztopili v 100 ml acetne kisline in dodali 30,2 g (133,8 mmol) kositrovega klorida. Reakcijsko zmes smo segrevali 4h pri temperaturi vrenja. Ocetno kislino smo odparili pri znižanem tlaku, dodali 200 ml etilacetata, sprali z 2 × 30 ml nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in s 30 ml nasičene raztopine NaCl, sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparili topilo pri znižanem tlaku. Dobili smo oljnat produkt, ki smo ga čistili s flash kromatografijo (Mf: DKM/MeOH = 20/1). Dobili smo 4,87 g (13,4 mmol) produkta skoraj bele barve.

**Izkoristek reakcije:** 0,53

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

**orositveni reagent:** ninhidrin

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d6): δ 0.99 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.79 (dd, *J*<sub>1</sub> = 4.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 9.1 Hz, 1H, CHNH), 3.89-4.01 (m, 1H, CHOH), 4.85 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, OH), 4.96 (AA'BB', *J* = 12.7 Hz, Δv = 19.5 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 5.51 (s, 2H, NH<sub>2</sub>Ar), 6.73 (m, 1H, Ar-H), 6.87 (m, 1H, Ar-H), 6.99 (m, 1H, Ar-H), 7.12 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.20-7.43 (m, 6H, Ar-H, SO<sub>2</sub>NH) ppm.

**MS (ESI+):** m/z (%): 365 (MH<sup>+</sup>, 48), 149 (100)

**HR-MS:** m/z: MH<sup>+</sup> 365,1172 (izračunano za C<sub>17</sub>H<sub>21</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S: 365,1171)

**IR (KBr):** 3457, 3372, 3283, 2983, 2909, 2361, 2342, 1734, 1628, 1598, 1454, 1333, 1242, 1189, 1162, 1097, 975, 933, 783, 754, 689, 594, 525 cm<sup>-1</sup>

**Elementna analiza za C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>S:**

%C	%H	%N
----	----	----

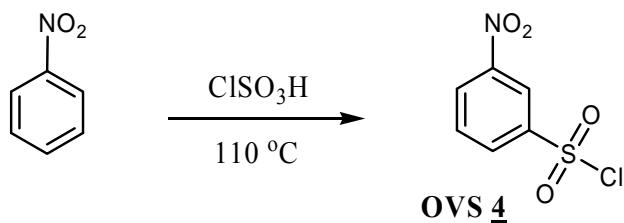
Izračunano: 56,03 5,53 7,69

Ugotovljeno: 56,12 5,68 7,73

**T<sub>tališča</sub>:** 97-99 °C

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +14,4 ° (c = 0,27 g/100 ml, MeOH)

#### 4.1.4 Sinteza 3-nitrobenzensulfonilklorida (OVS 4) (34)

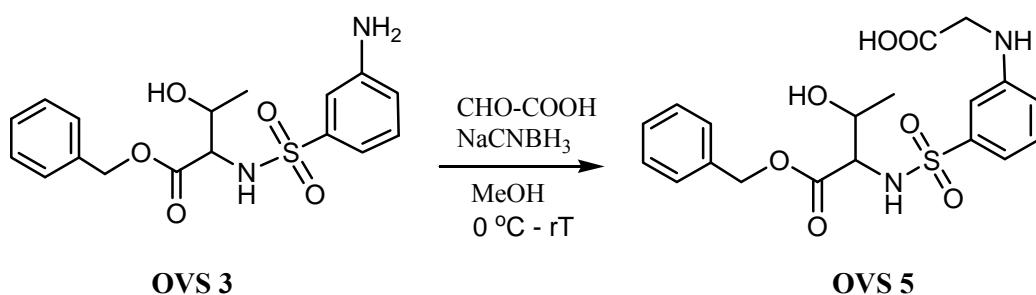


K 50 ml (0,488 mol) nitrobenzena smo dodali 162 ml (2,44 mol) klorsulfonske kisline, aparaturo opremili z vodnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter segrevali čez noč pri temperaturi vrenja. Zmes smo ohladili na sobno temperaturo ter počasi zlivali na led. Izpadla je oborina svetlo rjave barve, ki smo jo filtrirali z odsesavanjem in pustili sušiti na zraku 2 dni.

**T<sub>tališča</sub>:** 57-60 °C

**T<sub>tališča v literaturi:</sub>** 60-62 °C

#### 4.1.5 Sinteza 2-(3-(N-(1-(benziloksi)-3-hidroksi-1-oksobutan-2-il)sulfamoil)fenilamino)etanojske kisline (OVS 5)



2,98 g (8,18 mmol) spojine **OVS 3** in 0,83 g (9,00 mmol) monohidrata glioksalne kisline smo raztopili v 100 ml metanola ter ohladili na ledeni kopeli do 0 °C, nato smo počasi dodali 0,67 g (10,6 mmol) NaCNBH<sub>3</sub>. Ledeno kopel smo odstranili in mešali reakcijsko zmes preko noči. Pri znižanem tlaku smo odparili metanol, dodali 100 ml vode in ekstrahirali s 3 × 30 ml DKM. Združene organske faze smo spirali z 20 ml nasičene raztopine NaCl, sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparili topilo pri znižanem tlaku. Dobili smo oljnat produkt, ki smo ga adsorbirali na silikagel in čistili s flash kromatografijo (Mf: DKM/MeOH = 20/1). Dobili smo 0,48 g (1,14 mmol) rjavih kristalov.

**Izkoristek reakcije:** 0,14

**Rf:** 0,36 (Mf: DKM/MeOH/CH<sub>3</sub>COOH = 9/1/0,1)

**orositveni reagent:** ninhidrin

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d6):  $\delta$  0.97 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.42 (s, 2H, Ar NHCH<sub>2</sub>), 3.50 (s, 1H, OH), 3.74-3.84 (m, 1H, CHNH), 3.89-3.99 (m, 1H, CHOH), 4.95 (AA'BB',  $J$  = 12.7 Hz,  $\Delta v$  = 19.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 5.75 (s, 1H, NHAr), 6.76 (m, 1H, Ar-H), 6.88 (d,  $J$  = 7.6 Hz, 1H, Ar-H), 6.93 (s, 1H, Ar-H), 7.15 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.23-7.40 (m, 5H, Ar-H), 7.89 (s, 1H, SO<sub>2</sub>NH) ppm.

**MS (ESI+):** m/z (%): 423 (MH<sup>+</sup>, 14), 445 (MNa<sup>+</sup>, 100)

**HR-MS:** m/z: MNa<sup>+</sup> 445,1033 (izračunano za C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>SNa: 445,1045)

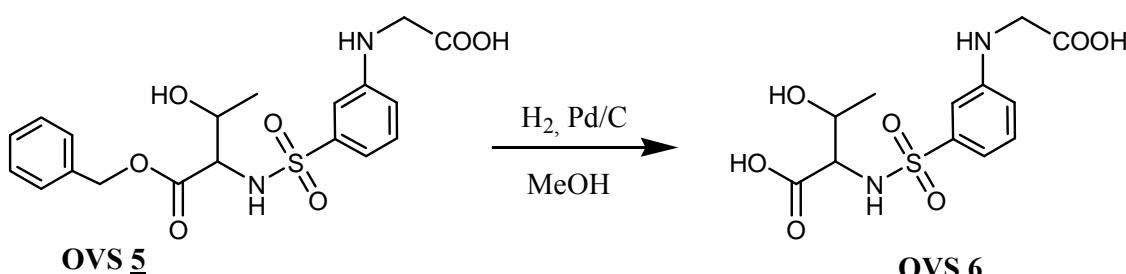
**IR (KBr):** 3392, 2563, 2359, 2340, 1602, 1411, 1325, 1160 cm<sup>-1</sup>

**Elementna analiza za C<sub>19</sub>H<sub>22</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S:**

**T<sub>tališča:</sub>** 112-115 °C

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = +21,7$  ° (c = 0,267 g/100 ml, MeOH)

#### 4.1.6 Sinteza 2-((3-karboksimetilamino)fenilsulfonamido)-3-hidroksibutanojske kisline (OVS 6)



0,470 g (1,11 mmol) spojine **OVS 5** smo raztopili v metanolu in prepihovali 15 minut z argonom. Nato smo pazljivo dodali 50 mg (10% mase reaktanta) Pd/C in bučko prepihovali z vodikom. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo odstranili katalizator in odparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt se je oboril v DKM. Oddekantirali smo topilo in produkt posušili z vakumsko črpalko. Dobili smo 250 mg (0,752 mmol) sivo-belega praška, ki smo ga čistili s flash kromatografijo (Mf: EtOAc/MeOH/NH<sub>3</sub> = 3/1/1). Dobili smo higroskopen rjav prašek.

**Izkoristek reakcije:** 0,68

**Rf:** 0,16 (Mf: EtOAc/MeOH/NH<sub>3</sub> = 3/1/1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 0.96 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.53 (s, 2H, CH<sub>2</sub>COOH), 3.68-3.83 (m, 2H, CHNH, CHOH), 3.88 (s, 1H, CHOH), 4.20 (s, 1H, OH) 6.03 (s, 1H, NHAr) 6.73-6.85 (m, 1H, Ar-H), 6.86-7.00 (m, 2H, Ar-H), 7.17-7.38 (m, 2H, Ar-H, SO<sub>2</sub>NH) ppm.

**MS (ESI-):** m/z (%): 331 ((M-H)<sup>-</sup>, 100)

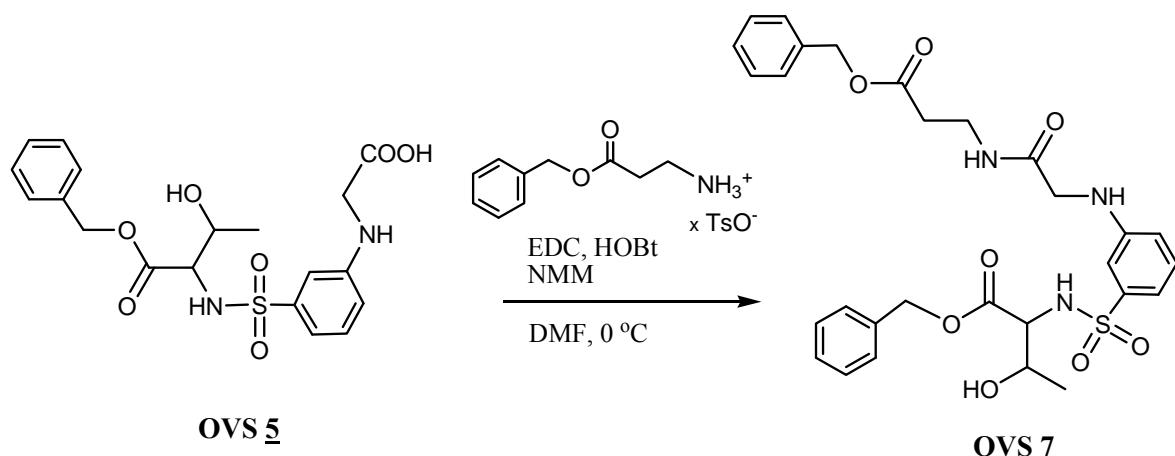
**HR-MS:** m/z: (M-H)<sup>-</sup> 331,0601 (izračunano za C<sub>12</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>7</sub>S: 331,0600)

**IR (KBr):** 3392, 3198, 2931, 2361, 2343, 1662, 1603, 1499, 1400, 1311, 1159, 1081, 1025, 913, 779, 705, 622 cm<sup>-1</sup>

**T<sub>tališča</sub>:** 68-70 °C

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +70,5 ° (c = 0,260 g/100 ml, MeOH)

#### 4.1.7 Sinteza benzil 2-(3-(3-benziloksi)-3-(oksopropilamino)-2-oksoetilamino)fenilsulfonamido-3-hidroksibutanoata (OVS 7)



300 mg (0,710 mmol) spojine **OVS 5** in 239 mg (0,710 mmol) zaščitene aminokisline (benzil β-glicinata) smo raztopili v 20 ml DMF, ohladili na ledeni kopeli na 0 °C in naalkalili z 0,3 ml NMM. Nato smo dodali 136 mg EDC (0,710 mmol) in 192 mg (1,42 mmol) HOBt, preverili, če je pH bazičen in mešali 1 dan pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odparili pri znižanem tlaku, dodali 100 ml etilacetata, spirali z 2 × 20 ml 1M HCl in z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 15 min z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo čistili s flash kromatografijo (DKM/MeOH = 20/1). Dobili smo 160 mg (0,274 mmol) spojine svetlo rjave barve.

**Izkoristek reakcije:** 0,39

**Rf:** 0,28 (Mf: DKM/MeOH = 9/1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d6):  $\delta$  0.97 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.51-2.55 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.25-3.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.63 (d,  $J$  = 5.8 Hz, 2H, ArNHCH<sub>2</sub>), 3.97 (dd,  $J_1$  = 4.0 Hz,  $J_2$  = 9.1 Hz, 1H, CH<sub>2</sub>NH), 3.87-4.02 (m, 1H, CH<sub>2</sub>OH), 4.85 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 1H, OH), 4.93 (AA'BB',  $J$  = 12.7 Hz,  $\Delta v$  = 20.4 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 5.06 (s, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 6.37 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1H, ArNHCH<sub>2</sub>), 6.70 (m, 1H, Ar-H), 6.95 (m, 2H, Ar-H), 7.19 (t,  $J$  = 8.2 Hz, 1H, Ar-H), 7.22-7.43 (m, 10H, Ar-H), 7.72 (d,  $J$  = 9.1 Hz, 1H, SO<sub>2</sub>NH), 8.01 (t,  $J$  = 5.8 Hz, 1H, CONH) ppm.

**MS (ESI-):** m/z (%): 582 ((M-H)<sup>-</sup>, 9), 375 (100)

**HR-MS:** m/z: (M-H)<sup>-</sup> 582,1917 (izračunano za C<sub>29</sub>H<sub>32</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S: 582,1910)

**IR (KBr):** 3434, 3338, 3194, 2927, 2361, 2342, 1751, 1731, 1645, 1603, 1514, 1418, 1325, 1247, 1157, 1107, 1026, 978, 928, 834, 740, 698, 591 cm<sup>-1</sup>

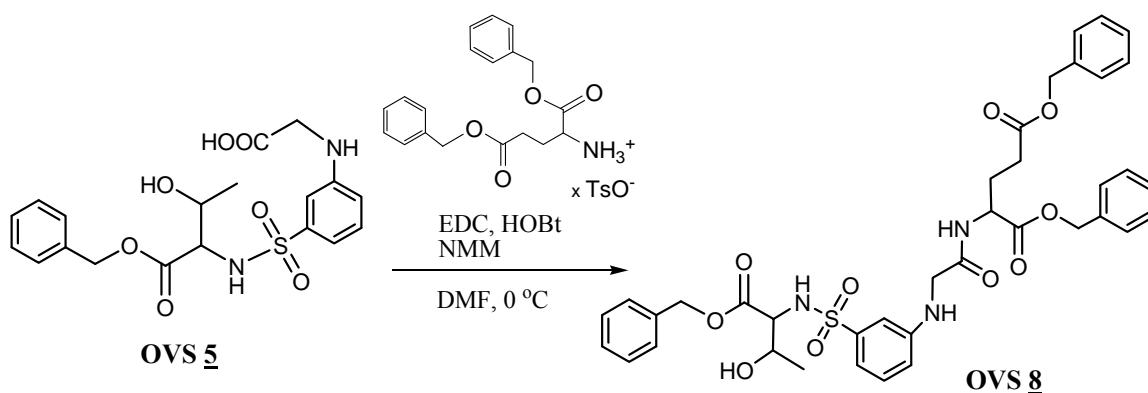
**Elementna analiza za C<sub>29</sub>H<sub>33</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S:**

	%C	%H	%N
Izračunano:	59,68	5,70	7,20
Ugotovljeno:	59,90	5,84	7,28

T<sub>tališča</sub>: 78-81 °C

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +20,2 ° (c = 0,258 g/100 ml, MeOH)

#### 4.1.8 Sinteza dibenzil 2-(2-(3-(N-(1-(benziloksi)-3-hidroksi-1-oksobutan-2-il)sulfamoil)fenilamino)acetamidopentandioata (OVS 8)



300 mg (0,710 mmol) spojine **OVS 5** in 354 mg (0,710 mmol) zaščitene aminokisline (dibenzil glutamata) smo raztopili v 20 ml DMF, ohladili na ledeni kopeli na 0 °C in naalkalili z 0,3 ml NMM. Nato smo dodali 136 mg EDC (0,710 mmol) in 192 mg (1,42 mmol) HOBr in mešali 1 dan pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odparili pri znižanem tlaku, dodali 100 ml etilacetata, spirali z 2 × 20 ml 1M HCl in z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 15 min z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo čistili s flash kromatografijo (DKM/MeOH = 20/1). Dobili smo 138 mg (0,189 mmol) oljnatega produkta oranžno-rjave barve.

**Izkoristek reakcije:** 0,27

**Rf:** 0,16 (Mf: DKM/MeOH = 20/1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d6): δ 0.95-1.01 (m, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.77-1.97 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 1.98-2.19 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.24-2.47 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.64-3.88 (m, 3H, SO<sub>2</sub>NHCH<sub>2</sub>, NHCH<sub>2</sub>CO), 3.90-4.01 (m, 1H, CHO<sub>H</sub>), 4.40 (dt, J<sub>1</sub> = 9.1 Hz, J<sub>2</sub> = 8.0 Hz 1H, NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>), 4.85 (d, J = 6.0 Hz, CHO<sub>H</sub>) 4.90 (AA'BB', J = 12.7 Hz, Δv = 20,1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>Ar), 5.02-5.15 (m, 4H, 2×OCH<sub>2</sub>Ar), 6.37 (t, J = 5.9 Hz, 1H, ArNHCH<sub>2</sub>), 6.65-6.76 (m, 1H, Ar-H), 6.92-7.05 (m, 1H, Ar-H), 7.24-7.28 (m, 1H, Ar-H), 7.30-7.39 (m, 16H, Ar-H), 7.68 (d, J = 9.1 Hz, 1H, SO<sub>2</sub>NH), 8.40 (d, J = 8.0 Hz, 1H, NHCO) ppm.

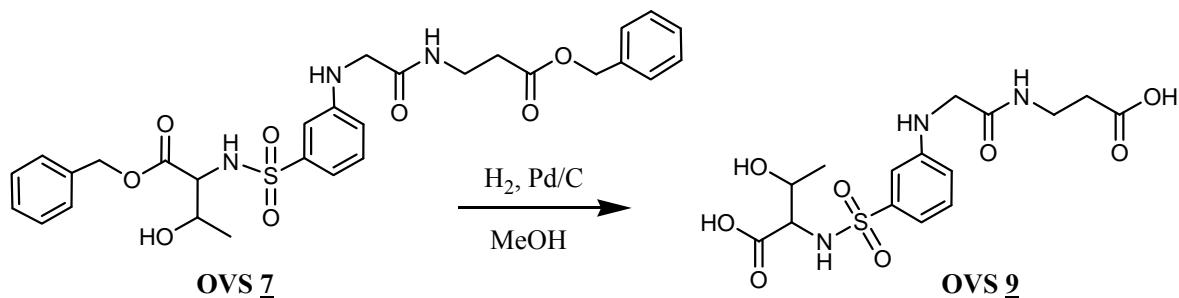
**MS (ESI+):** m/z (%): 732 (MH<sup>+</sup>, 100)

**HR-MS:** m/z: MH<sup>+</sup> 732,2591 (izračunano za C<sub>38</sub>H<sub>42</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>S: 732,2591)

**IR (KBr):** 3840, 3738, 3650, 3568, 3352, 3065, 3034, 2933, 2346, 2281, 1736, 1670, 1601, 1522, 1455, 1328, 1264, 1160, 1083, 1027, 988, 751, 698, 587 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +22,1 ° (c = 0,251 g/100 ml, MeOH)

#### 4.1.9 Sinteza 2-(3-(2-(2-karboksietilamino)-2-oksoetilamino)fenilsulfonamido)-3-hidroksibutanojske kisline (**OVS 9**)



128 mg (0,219 mmol) spojine **OVS 7** smo raztopili v metanolu in prepihovali 15 minut z argonom. Nato smo dodali 13 mg (10% mase spojine) Pd/C in prepihovali čez noč z vodikom. Po končani reakciji smo odstranili katalizator in odparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo čistili s flash kromatografijo (Mf: EtOAc/MeOH/NH<sub>3</sub> = 3/1/1). Ker je bil produkt zelo hidroskopen, smo ga sušili v vakumski pištoli in dobili 54 mg (0,134 mmol) svetlo rjave spojine.

**Izkoristek reakcije:** 0,61

**Rf:** 0,13 (Mf: EtOAc/MeOH/NH<sub>3</sub> = 3/1/1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d6):  $\delta$  0.97 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.24-2.39 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.13-3.33 (m, 2H, CONHCH<sub>2</sub>), 3.64 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 2H, ArNHCH<sub>2</sub>), 3.73-3.85 (m, 2H, CHNH, CHOH), 6.49 (s, 1H, ArNHCH<sub>2</sub>), 6.72 (d,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 6.88-7.06 (m, 2H, Ar-H), 7.24 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.82-8.08 (m, 2H, SO<sub>2</sub>NH, CONH) ppm.

**MS (ESI-):** m/z (%): 402 ((M-H)<sup>-</sup>, 100)

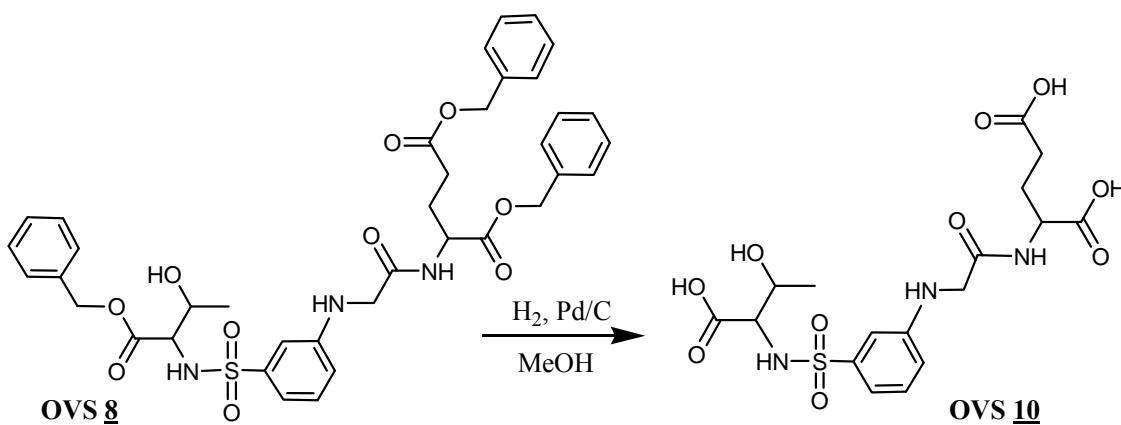
**HR-MS:** m/z: (M-H)<sup>-</sup> 402,0960 (izračunano za C<sub>15</sub>H<sub>20</sub>N<sub>3</sub>O<sub>8</sub>S: 402,0971)

**IR (KBr):** 3359, 2360, 2341, 1666, 1605, 1502, 1402, 1316, 1157, 916, 869, 488 cm<sup>-1</sup>

**T<sub>tališča</sub>:** / (zelo hidroskopna spojina)

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +6,7 ° (c = 0,305 g/100 ml, MeOH)

#### 4.1.10 Sinteza 2-(2-(3-(N-(1-karboksi-2-hidroksipropil)sulfamoil)fenilamino)acetamido)pentandiojske kisline (**OVS 10**)



108 mg (0,148 mmol) spojine **OVS 8** smo raztopili v metanolu in prepihovali 15 minut z argonom. Nato smo dodali 10 mg (10% mase spojine) Pd/C in prepihovali čez noč z vodikom. Po končani reakciji smo odstranili katalizator in odparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo oborili v DKM, oddekantirali topilo in posušili produkt z vakumsko črpalko. Zaradi prisotnosti DMF smo produkt raztopili v metanolu in ga oborili v DKM. Večkrat smo odlili topilo in oborino prelili z dietiletrom ter nato odparili topilo pri znižanem tlaku. Dobili smo 46 mg (0,100 mmol) belega praška.

**Izkoristek reakcije:** 0,67

**Rf:** 0,13 (Mf: EtOAc/MeOH/NH<sub>3</sub> = 2/1/1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 0.94 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.70-2.00 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.02-2.30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.67 (d, *J* = 6.8 Hz, 2H, ArNHCH<sub>2</sub>), 3.71-3.83 (m, 1H, CHOH), 3.93-4.06 (m, 2H, CHNH, CHCH<sub>2</sub>), 4.90 (s, 1H, OH), 6.60 (s, 1H, ArNHCH<sub>2</sub>), 6.72 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, Ar-H), 6.87-7.06 (m, 1H, Ar-H), 7.24 (t, *J* = 8.0, 1H, Ar-H), 7.54 (m, 1H, Ar-H), 7.69 (m, 1H, SO<sub>2</sub>NH), 8.51 (s, 1H, NHCO) ppm.

**MS (ESI-):** m/z (%): 460 ((M-H)<sup>-</sup>, 100)

**HR-MS:** m/z: (M-H)<sup>-</sup> 460,1008 (izračunano za C<sub>17</sub>H<sub>22</sub>N<sub>3</sub>O<sub>10</sub>S: 460,1026)

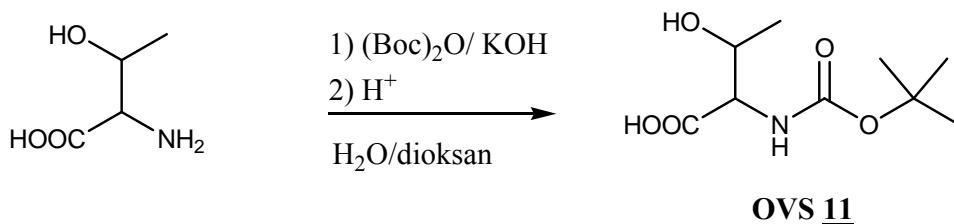
**IR (KBr):** 3358, 1676, 1603, 1522, 1407, 1323, 1159, 1083, 915, 791, 685, 588 cm<sup>-1</sup>

**T<sub>tališča</sub>:** 139-142 °C

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +15,4 ° (c = 0,215 g/100 ml, MeOH)

## 4.2 Druga sintezna pot

### 4.2.1 Sinteza N-(*terc*-butiloksikarbonil)-L-treonina (OVS 11)



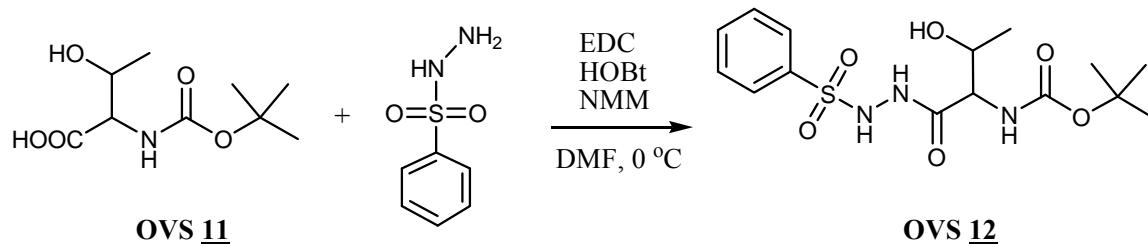
15,4 g (129 mmol) L-treonina smo raztopili v zmesi 100 ml vode in 50 ml dioksan ter dodali 7,24 g KOH (129 mmol). Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli in ob mešanju po kapljicah dodali 31,0 g (142 mmol) di-*terc*-butilkarbonata ((BOC)<sub>2</sub>O) raztopljenega v 50 ml dioksan. Reakcijsko zmes smo mešali 2 uri pri sobni temperaturi. Nato smo pri znižanem tlaku odparili topilo, preostanku dodali 100 ml vode in ekstrahirali z etilacetatom (2 × 50 ml). Z 1M HCl smo nakisali vodno fazo do pH 2 in ekstrahirali z etilacetatom, dokler ni ves produkt prešel v organsko fazo (10 × 30 ml). Pri znižanem tlaku smo odparili etilacetat in dobili 25,8 g (118 mmol) produkta svetlo rjave barve.

**Izkoristek reakcije:** 0,91

**T<sub>tališča</sub>:** 146-148 °C

**T<sub>tališča v literaturi:</sub>** 153-154 °C (35)

### 4.2.2 Sinteza *terc*-butil-3-hidroksi-1-okso-1-(2-(sulfonil)hidrazinil)butan-2-ilkarbamata (OVS 12)



25,8 g (0,118 mol) **OVS 11** in 20,2 g (0,118 mol) benzensulfonohidrazida smo raztopili v 200 ml DMF in naalkalili z 24,5 ml (0,177 mol) NMM. Reakcijsko zmes smo 15 minut hladili na ledu, nato smo dodali 23,7 g (0,124 mol) EDC in 16,7 g (0,124 mol) HOBT ter preverili, če je pH 8. Reakcijsko zmes smo mešali preko noči pri sobni

temperaturi. Naslednji dan smo segrevali 2 uri pri temperaturi vrenja in prepihovali z argonom. Topilo smo odparili pri znižanem tlaku, preostanku dodali 150 ml etilacetata in spirali z  $2 \times 30$  ml 10% citronske kisline, z  $2 \times 20$  ml  $\text{NaHCO}_3$  in z 20 ml nasičene raztopine  $\text{NaCl}$ . Organsko fazo smo sušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in odparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo prekristalizirali iz DKM z dietiletrom in petroletrom. Dobili smo 20,4 g (54,7 mmol) belih kristalov.

**Izkoristek reakcije:** 0,46

**Rf:** 0,16 (Mf: DKM/MeOH = 20/1)

**orositveni reagent:** ninhidrin

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  0.97 (d,  $J = 6.0$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.38 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3$ ), 3.54-3.82 (m, 2H,  $\text{CHNH}$ ,  $\text{CHOH}$ ), 4.67 (d,  $J = 5.17$  Hz, 1H,  $\text{CHOH}$ ), 5.36 (d,  $J = 8.1$  Hz, 1H,  $\text{NH-BOC}$ ), 7.45-7.58 (m, 3H, Ar-H,  $\text{SO}_2\text{NH}$ ), 7.85-7.74 (m, 3H, Ar-H), 9.85 (s, 1H,  $\text{NHNHCO}$ ), 10.02 (s, 1H,  $\text{NHNHSO}_2$ ) ppm.

**MS (ESI+):** m/z (%): 396 ( $\text{MNa}^+$ , 50), 141 (100)

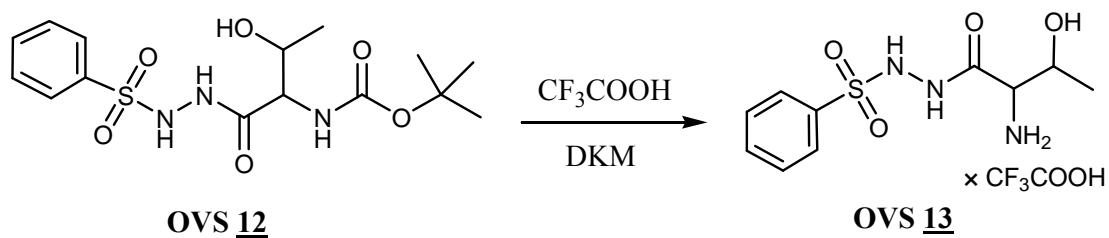
**HR-MS:** m/z:  $\text{MNa}^+$  396,1197 (izračunano za  $\text{C}_{15}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6\text{SNa}$ : 396,1205)

**IR (KBr):** 3321, 3203, 3065, 2832, 2361, 2343, 1678, 1521, 1449, 1392, 1368, 1345, 1248, 1163, 1092, 1057, 1023, 944, 883, 820, 733, 589  $\text{cm}^{-1}$

**T<sub>tališča</sub>:** 84-87 °C

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = -24.4^\circ$  (c = 0,279 g/100 ml, MeOH)

#### 4.2.3 Sinteza N<sup>1</sup>-(2-amino-3-hidroksibutanoil)benzensulfonohidrazida (OVS 13)



20,4 g (54,7 mmol) **OVS 12** smo raztopili v 160 ml DKM in dodali 18 ml trifluorocetne kisline. Reakcijsko zmes smo mešali 1 uro pri sobni temperaturi. Nato smo topilo odparili pri znižanem tlaku in dobili 18,9 g (49,9 mmol) rumeno-belih kristalov.

**Izkoristek reakcije:** 0,91

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

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d6):  $\delta$  1.09 (d,  $J = 6.3$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.44 (d,  $J = 7.1$  Hz, 1H, CHNH), 3.62-3.78 (m, 1H, CHOH), 5.50 (s, 1H, CHOH), 7.50-7.70 (m, 3H, Ar-H, SO<sub>2</sub>NH), 7.76-7.90 (m, 3H, Ar-H), 8.18 (s, 3H, NH<sub>3</sub>), 10.18 (s, 1H, NHNHCO), 10.51 (s, 1H, NHNSO<sub>2</sub>) ppm.

**MS (ESI+):** m/z (%): 274 (MH<sup>+</sup>, 100)

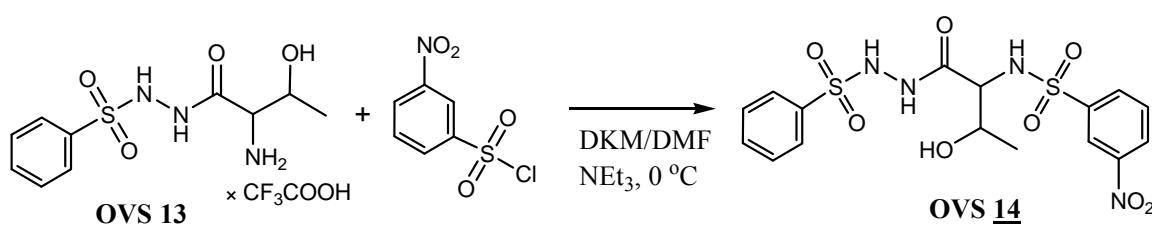
**HR-MS:** m/z: MH<sup>+</sup> 274,0851 (izračunano za C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S: 274,0862)

**IR (KBr):** 3285, 3099, 2983, 2832, 2360, 2343, 1686, 1529, 1451, 1394, 1339, 1160, 1129, 1088, 950, 922, 832, 802, 758, 722, 612, 548 cm<sup>-1</sup>

**T<sub>tališča</sub>:** 149-153 °C

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = -35,2$  ° (c = 0,264 g/100 ml, MeOH)

#### 4.2.4 Sinteza N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-(fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamida (OVS 14)



18,9 g (49,9 mmol) spojine **OVS 13** smo raztopili v 150 ml DMF, dodali 17,3 ml (0,125 mol) trietilamina in pustili 10 min na ledeni kopeli. Nato smo s kapalnikom dodali 12,2 g (54,9 mmol) v DKM raztopljenega nitrobenzensulfonilklorida in s trietilaminom naalkalili do pH 8. Reakcijsko zmes smo mešali preko noči na ledeni kopeli. Pri znižanem tlaku smo odparili topilo, dodali 200 ml etilacetata in ekstrahirali z 2 × 50 ml 10% raztopino citronske kisline, z 2 × 30 ml nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> in z nasičeno raztopino NaCl. Dodali smo sušilno sredstvo Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, filtrirali in odparili topilo pri znižanem tlaku. Dobili smo 14,3 g (31,2 mmol) rumeno-belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 0,63

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

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d6):  $\delta$  0.94 (d,  $J$  = 5.4 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.55-3.67 (m, 2H, CHNH, CHO<sub>H</sub>), 4.69 (d,  $J$  = 4.7 Hz, 1H, CHO<sub>H</sub>), 7.46-7.57 (m, 2H, Ar-H), 7.58-7.68 (m, 1H, Ar-H), 7.68-7.78 (m, 2H, Ar-H), 7.83 (t,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.10-8.25 (m, 2H, Ar-H, SO<sub>2</sub>NH), 8.44 (m, 1H, Ar-H), 8.55 (s, 1H, Ar-H), 9.76 (s, 1H, NHN<sub>H</sub>CO), 9.99 (s, 1H, NHNHSO<sub>2</sub>) ppm.

**MS (ESI-):** m/z (%): 457 ((M-H)<sup>-</sup>, 36), 202 (100)

**HR-MS:** m/z: (M-H)<sup>-</sup> 457,0488 (izračunano za C<sub>16</sub>H<sub>17</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>; 577,1192)

**IR (KBr):** 3543, 3283, 3087, 2979, 2851, 2361, 2342, 1706, 1608, 1536, 1442, 1353, 1244, 1162, 1072, 981, 926, 818, 733, 671, 607, 566 cm<sup>-1</sup>

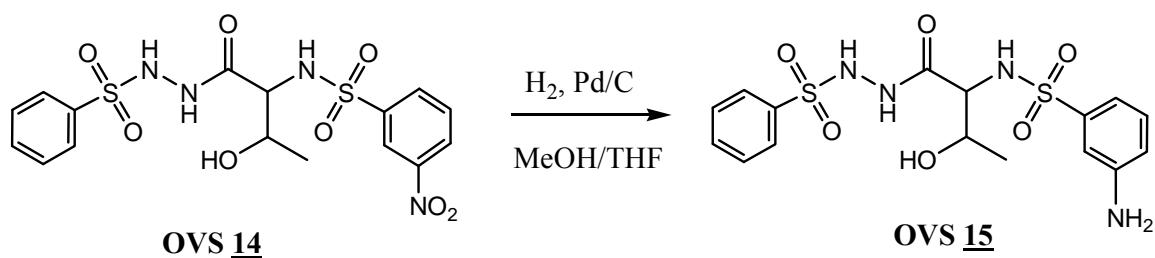
**Elementna analiza za C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub> x ½ H<sub>2</sub>O:**

	%C	%H	%N
Izračunano:	41,11	4,10	11,99
Ugotovljeno:	41,07	4,26	11,63

**T<sub>tališča</sub>:** 211-214 °C

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = -23,1^\circ$  ( $c = 0,26$  g/100 ml, MeOH)

#### **4.2.5 Sinteza 3-amino-N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il)benzensulfonamida (OVS 15)**



8,47 g (18,5 mmol) spojine **OVS 14** smo raztopili v 100 ml metanola in 100 ml THF ter prepihovali 20 min z argonom. Nato smo pazljivo dodali 1,62 g Pd/C (20% mase izhodne spojine) in bučko prepihovali z vodikom. Reakcijo zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo odstranili katalizator in odparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo adsorbirali na silikagel in očistili s flash kromatografijo (DKM/MeOH = 15/1). Dobili smo 4,80 g (11,2 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 0,61

**Rf:** 0.40 (Mf: DKM/MeOH = 9/1)

**orositveni reagent:** ninhidrin

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d6): δ 0.85 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.55 (dd,  $J_1 = 4.8$  Hz,  $J_2 = 8.3$  Hz, 1H, CHNH), 3.58-3.71 (m, 1H, CHO<sub>H</sub>), 4.60 (d,  $J = 5.2$  Hz, 1H, CHO<sub>H</sub>), 4.48 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 6.73 (m, 1H, Ar-H), 6.87 (d,  $J = 7.7$  Hz, 1H, Ar-H), 6.96 (m, 1H, Ar-H), 7.14 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, Ar-H), 7.22 (d,  $J = 8.3$  Hz, 1H, SO<sub>2</sub>NH), 7.51 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H, Ar-H), 7.62 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, Ar-H), 7.77 (d,  $J = 7.8$  Hz, 2H, Ar-H), 9.79 (s, 1H, NHNHC<sub>O</sub>), 9.86 (s, 1H, NHNHSO<sub>2</sub>) ppm.

MS (ESI+): m/z (%): 429 ( $\text{MH}^+$ , 50), 451 ( $\text{MNa}^+$ , 100)

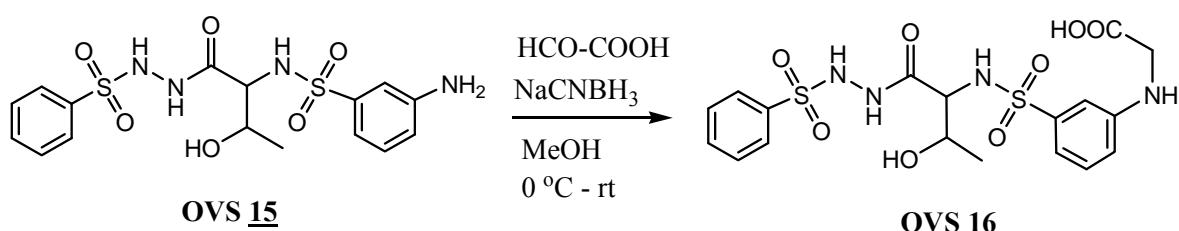
**HR-MS:** m/z:  $MH^+$  429.0912 (izračunano za C<sub>16</sub>H<sub>21</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>; 429.0903)

**IR (KBr):** 3488, 3388, 3292, 3232, 3067, 2976, 2361, 2343, 1689, 1599, 1528, 1450, 1409, 1335, 1284, 1156, 1066, 1030, 921, 872, 735, 686, 633, 587, 502 cm<sup>-1</sup>

T<sub>tališča</sub>: 90-93 °C

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = -45.9^\circ$  ( $c = 0.255$  g/100 ml, MeOH)

#### **4.2.6 Sinteza 2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il)sulfamoil)fenilamino)etanojske kisline (OVS 16)**



1,340 g (3,13 mmol) spojine **OVS 15** smo raztopili v 80 ml metanola, dodali 0,317 g (3,44 mmol) monohidrata glioksalne kisline, ohladili na ledeni kopeli do temperature 0 °C in dodali 0,197 g (3,13 mmol) NaCNBH<sub>3</sub>. Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri sobni temperaturi, nevtralizirali z 1 M NaOH in odparili topilo pri znižanem tlaku. Preostanku smo dodali 100 ml destilirane vode in nakisali z 1 M HCl do pH 2. Ekstrahirali smo z etilacetatom, dokler ni ves produkt prešel v organsko fazo ( $6 \times 30$  ml). Sprali smo z nasičeno raztopino NaCl, sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparili topilo pri znižanem tlaku. Dobili smo 1,42 g (2,92 mmol) belih kristalov.

**Izkoristek reakcije:** 0,93

**R<sub>f</sub>:** 0,12 (Mf: DKM/MeOH/CH<sub>3</sub>COOH = 7/1/0,1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d6): δ 0.85 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.56 (dd, *J*<sub>1</sub> = 5.0 Hz, *J*<sub>2</sub> = 8.1 Hz, 1H, CHNH), 3.59-3.70 (m, 1H, CHO<sub>H</sub>), 3.84 (s, 2H, CH<sub>2</sub>COOH), 4.61 (d, *J* = 3.8 Hz, 1H, CHO<sub>H</sub>), 6.20 (s, 1H, ArNHCH<sub>2</sub>), 6.77 (m, 1H, Ar-H), 6.92-6.99 (m, 2H, Ar-H), 7.21 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.32 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, SO<sub>2</sub>NH), 7.50 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.62 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.76 (d, *J* = 7.9 Hz, 2H, Ar-H), 9.79 (d, *J* = 2.9 Hz, 1H, NHNHC<sub>O</sub>), 9.87 (d, *J* = 2.8 Hz, NHNHSO<sub>2</sub>), 12.55 (br, 1H, COOH) ppm.

**MS (ESI+):** m/z (%): 487 (MH<sup>+</sup>, 17), 509 (MNa<sup>+</sup>, 100)

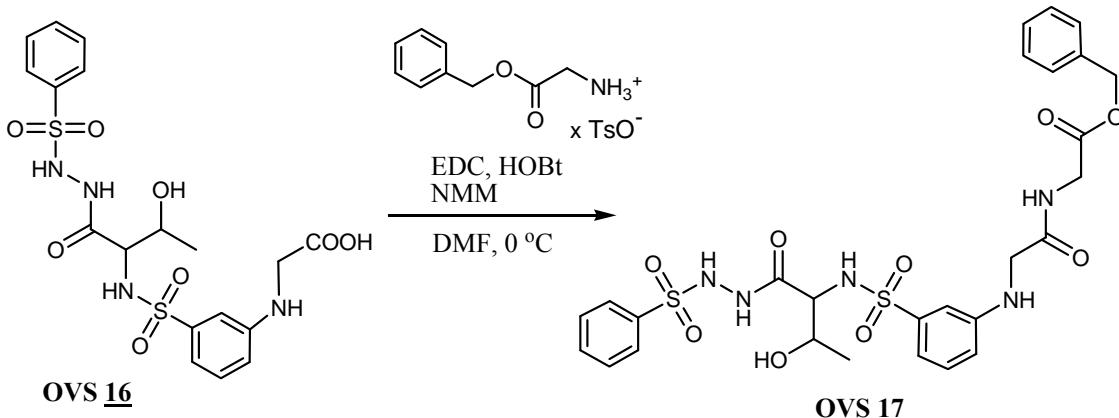
**HR-MS:** m/z: MH<sup>+</sup> 487,0959 (izračunano za C<sub>18</sub>H<sub>23</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>: 487,0957)

**IR (KBr):** 3405, 3257, 2983, 2361, 2342, 1707, 1604, 1515, 1449, 1333, 1220, 1164, 1090, 1026, 924, 783, 757, 728, 686, 584 cm<sup>-1</sup>

**T<sub>tališča</sub>:** 76-79 °C

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -43,9 ° (c = 0,255 g/100 ml, MeOH)

#### 4.2.7 Sinteza benzil 2-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il)sulfamoil)fenilamino)acetamidoacetata (OVS 17)



300 mg (0,617 mmol) spojine **OVS 16** in 208 mg (0,617 mmol) zaščitene aminokisline (benzil glicinata) smo raztopili v 20 ml DMF, ohladili na ledeni kopeli na 0 °C in naalkalili z 0,3 ml NMM. Nato smo dodali 118 mg EDC (0,617 mmol) in 166 mg (1,234 mmol) HOBT ter mešali čez noč pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odparili pri znižanem tlaku, dodali 100 ml etilacetata, sprali z 2 × 20 ml 1M HCl in z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 15 min z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparili

Dobili smo 245 mg (0,387 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 0,63

Rf: 0,32 (Mf: DKM/MeOH = 9/1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d6): δ 0.85 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.54 (m, 1H, CHNH), 3.58-3.66 (m, 1H, CHO<sub>H</sub>), 3.74 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2H, ArNHCH<sub>2</sub>), 3.92 (d,  $J = 5.9$  Hz, 2H, NHCH<sub>2</sub>COO), 4.61 (d,  $J = 4.8$  Hz, 1H, CHO<sub>H</sub>), 5.12 (s, 2H, OCH<sub>2</sub>Ar), 6.44 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H, ArNHCH<sub>2</sub>), 6.74 (m, 1H, Ar-H), 6.94-7.00 (m, 2H, Ar-H), 7.20 (t,  $J = 8.1$  Hz, 1H, Ar-H), 7.30-7.42 (m, 6H, Ar-H), 7.49 (m, 2H, Ar-H), 7.60 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H, Ar-H), 7.72-7.79 (m, 2H, Ar-H, SO<sub>2</sub>NH), 8.35 (t,  $J = 5.9$  Hz, 1H, CONH), 9.37 (s, 1H, NHNHC<sub>O</sub>), 9.80 (s, 1H, NHNHSO<sub>2</sub>) ppm.

**MS (ESI+):** m/z (%): 634 ( $\text{MH}^+$ , 57), 656 ( $\text{MNa}^+$ , 100)

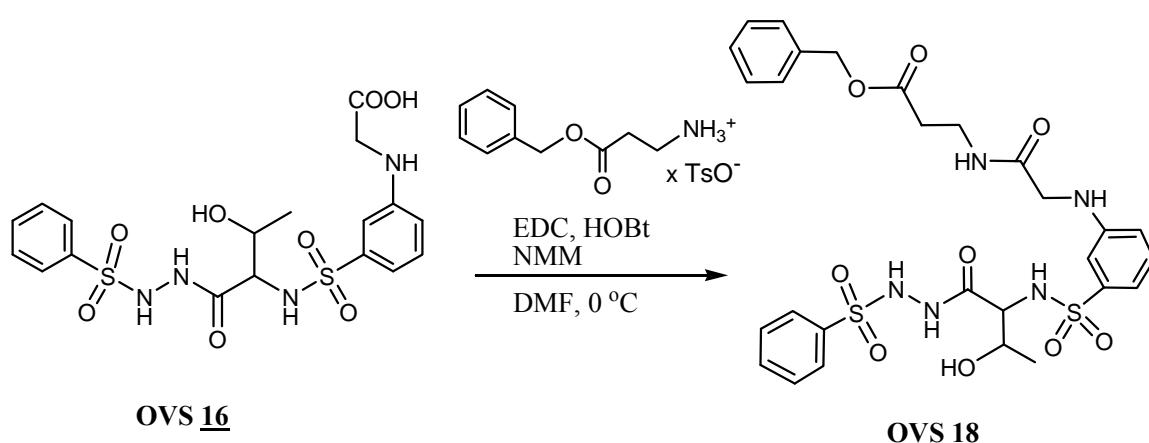
**HR-MS:** m/z: MH<sup>+</sup> 634.1668 (izračunano za C<sub>27</sub>H<sub>32</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>: 634.1641)

**IR (KBr):** 3530, 3392, 3279, 3064, 2361, 2343, 1741, 1691, 1605, 1530, 1448, 1321, 1207, 1159, 1088, 1031, 987, 939, 886, 740, 685, 618, 476 cm<sup>-1</sup>

**T<sub>tališča</sub>:** 202-205 °C

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = +41,2^\circ$  ( $c = 0,256$  g/100 ml, MeOH)

#### **4.2.8 Sinteza benzil 3-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il)sulfamoil)fenilamino)acetamidopropanoata (OVS 18)**



300 mg (0,617 mmol) spojine **OVS 16** in 216 mg (0,617 mmol) zaščitene aminokisline (benzil  $\beta$ -glicinata) smo raztopili v 20 ml DMF, ohladili na ledeni kopeli na 0 °C in naalkalili z 0,3 ml NMM. Nato smo dodali 118 mg EDC (0,617 mmol) in 166 mg (1,234 mmol) HOBr ter mešali 1 dan pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odparili pri znižanem tlaku, dodali 100 ml etilacetata in spirali z  $2 \times 20$  ml 1M HCl in z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 15 min z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in odparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo čistili s flash kromatografijo (DKM/MeOH = 20/1). Dobili smo 236 mg (0,364 mmol) belih kristalov.

**Izkoristek reakcije:** 0,59

**Rf:** 0,30 (Mf: DKM/MeOH = 9/1)

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz, DMSO-d6):  $\delta$  0.85 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 2.52-2.56 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 3.33-3.40 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{NHCO}$ ), 3.54 (dd,  $J_1 = 4.9$  Hz,  $J_2 = 8.0$  Hz, 1H,  $\text{CHNH}$ ), 3.59-3.64 (m, 1H,  $\text{CHOH}$ ), 3.66 (d,  $J = 5.8$  Hz, 2H,  $\text{NHCH}_2\text{CO}$ ), 4.61 (d,  $J = 5.0$  Hz, 1H,  $\text{CHOH}$ ), 5.07 (s, 2H,  $\text{OCH}_2\text{Ar}$ ), 6.34 (t,  $J = 5.8$  Hz, 1H,  $\text{ArN}\underline{\text{H}}\text{CH}_2$ ), 6.71 (m, 1H,  $\text{Ar-H}$ ), 6.91-7.00 (m, 2H,  $\text{Ar-H}$ ), 7.21 (t,  $J = 7.8$  Hz, 1H,  $\text{Ar-H}$ ), 7.27-7.39 (m, 6H,  $\text{Ar-H}$ ,  $\text{SO}_2\text{NH}$ ), 7.50 (t,  $J = 7.5$  Hz, 2H,  $\text{Ar-H}$ ), 7.61 (t,  $J = 7.4$  Hz, 1H,  $\text{Ar-H}$ ), 7.76 (d,  $J = 7.9$  Hz, 2H,  $\text{Ar-H}$ ), 8.02 (t,  $J = 5.6$  Hz, 1H,  $\text{CONH}$ ), 9.77 (s, 1H,  $\text{NHNHCO}$ ), 9.85 (s, 1H,  $\text{NHNHSO}_2$ ) ppm.

**MS (ESI+):** m/z (%): 648 ( $\text{MH}^+$ , 38), 670 ( $\text{MNa}^+$ , 100)

**HR-MS:** m/z:  $\text{MH}^+$  648,1793 (izračunano za  $\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{N}_5\text{O}_9\text{S}_2$ : 648,1798)

**IR (KBr):** 3526, 3358, 3262, 3060, 2940, 2361, 2343, 1742, 1690, 1639, 1605, 1534, 1448, 1329, 1263, 1168, 1073, 987, 939, 793, 733, 686, 592  $\text{cm}^{-1}$

**Elementna analiza za  $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{N}_5\text{O}_9\text{S}_2$ :**

%	C	H	N
---	---	---	---

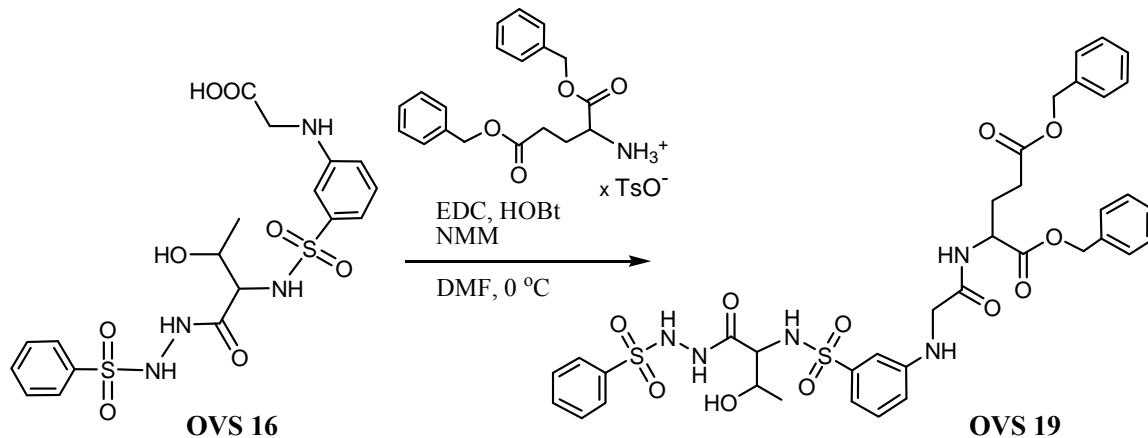
Izračunano:	51,92	5,14	10,81
-------------	-------	------	-------

Ugotovljeno:	52,00	5,16	10,69
--------------	-------	------	-------

**T<sub>tališča</sub>:** 111-114 °C

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = -27,4^\circ$  ( $c = 0,256$  g/100 ml, MeOH)

**4.2.9 Sinteza dibenzil 2-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il)sulfamoil)fenilamino)acetamido)pentadioata (OVS 19)**



300 mg (0,617 mmol) spojine **OVS 16** in 308 mg (0,617 mmol) zaščitene aminokisline (dibenzil glutaminata) smo raztopili v 20 ml DMF, ohladili na ledeni kopeli na 0 °C in naalkalili z 0,3 ml NMM. Nato smo dodali 118 mg EDC (0,617 mmol) in 166 mg (1,234 mmol) HOBr ter mešali 1 dan pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odparili pri znižanem tlaku, dodali 100 ml etilacetata in spirali z  $2 \times 20$  ml 1M HCl in z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 15 min z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  in odparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo očistili s flash kromatografijo (DKM/MeOH = 20/1). Dobili smo 165 mg (0,207 mmol) belih kristalov.

**Izkoristek reakcije:** 0,34

**Rf:** 0,35 (Mf: DKM/MeOH = 9/1)

**$^1\text{H-NMR}$**  (300 MHz, DMSO-d6):  $\delta$  0.84 (d,  $J = 6.2$  Hz, 3H,  $\text{CH}_3$ ), 1.82-1.98 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 1.98-2.14 (m, 1H,  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CO}$ ), 2.40 (t,  $J = 7.6$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{COO}$ ), 3.55 (dd,  $J_1 = 7.6$  Hz,  $J_2 = 4.9$  Hz, 1H,  $\text{CHNHSO}_2$ ), 3.59-3.68 (m, 1H,  $\text{CHOH}$ ), 3.68-3.81 (d,  $J = 5.7$  Hz, 2H,  $\text{ArNHCH}_2$ ), 4.41 (dt,  $J_1 = 8.0$  Hz,  $J_2 = 5.3$  Hz, 1H,  $\text{NHCHCH}_2$ ), 4.62 (d,  $J = 5.1$  Hz, 1H,  $\text{OH}$ ), 5.09 (AA'BB',  $J = 12.9$  Hz,  $\Delta\nu = 25.8$  Hz, 4H,  $2 \times \text{CH}_2\text{Ar}$ ), 6.33 (t,  $J = 5.7$  Hz, 1H,  $\text{ArNHCH}_2$ ), 6.70 (m, 1H, Ar-H), 6.95 (d,  $J = 7.6$  Hz, 1H, Ar-H), 6.99 (s, 1H, Ar-H), 7.15 (t,  $J = 7.9$  Hz, 1H, Ar-H), 7.27 (d,  $J = 8.4$  Hz, 1H,  $\text{NHSO}_2$ ), 7.29-7.42 (m, 10H, Ar-H), 7.49 (m, 2H, Ar-H), 7.60 (t,  $J = 7.3$  Hz, 1H, Ar-H), 7.75 (m, 2H, Ar-H), 8.41 (d,  $J = 8.0$  Hz, 1H, CONH), 9.77 (s, 1H,  $\text{NHNHCO}$ ), 9.85 (s, 1H,  $\text{NHNHSO}_2$ ) ppm.

**MS (ESI+):** m/z (%): 796 ( $\text{MH}^+$ , 45), 818 ( $\text{MNa}^+$ , 100)

**HR-MS:** m/z:  $\text{MH}^+$  796,2327 (izračunano za  $\text{C}_{37}\text{H}_{42}\text{N}_5\text{O}_{11}\text{S}_2$ : 796,2322)

**IR (KBr):** 3395, 3302, 3246, 3066, 2974, 2361, 2342, 1735, 1671, 1604, 1524, 1449, 1334, 1263, 1164, 1091, 1026, 921, 733, 686, 584 cm<sup>-1</sup>

**Elementna analiza za C<sub>37</sub>H<sub>41</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>S<sub>2</sub> x 1/6 H<sub>2</sub>O:**

%C	%H	%N
----	----	----

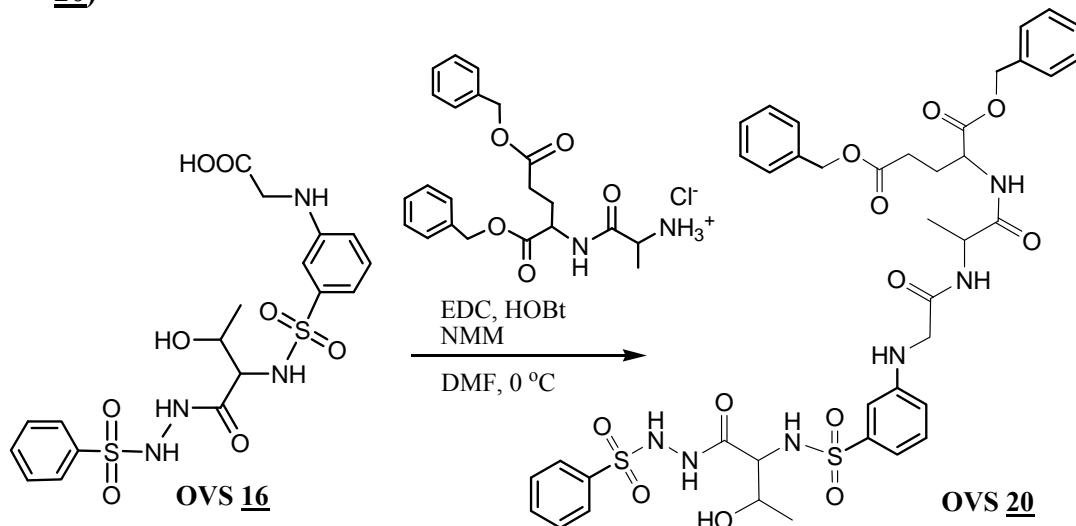
Izračunano:	55,63	5,21
-------------	-------	------

Ugotovljeno:	55,51	5,20
--------------	-------	------

**T<sub>tališča:</sub>** 108-111 °C

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -11,6 ° (c = 0,263 g/100 ml, MeOH)

**4.2.10 Sinteza dibenzil 2-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il)sulfamoil)fenilamino)acetamido)propanamido)pentadioata (OVS 20)**



300 mg (0,617 mmol) spojine **OVS 16** in 268 mg (0,617 mmol) zaščitene aminokisline (dibenzil glutaminilalaninata) smo raztopili v 20 ml DMF, ohladili na ledeni kopeli na 0 °C in naalkalili z 0,3 ml NMM. Nato smo dodali 118 mg EDC (0,617 mmol) in 166 mg (1,234 mmol) HOBr ter mešali 1 dan pri sobni temperaturi. Po končani reakciji smo topilo odparili pri znižanem tlaku, dodali 100 ml etilacetata ter spirali z 2 × 20 ml 1M HCl in z 20 ml nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo sušili 15 min z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo očistili s flash kromatografijo (DKM/MeOH = 20/1). Dobili smo 310 mg (0,357 mmol) svetlo zelene spojine.

Izkoristek reakcije: 0,58

Rf: 0.34 (Mf: DKM/MeOH = 9/1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d6):  $\delta$  0.85 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CHOH), 1.19 (d,  $J$  = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CHNH), 1.78-1.96 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 1.96-2.14 (m, 1H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.41 (t,  $J$  = 7.1 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.50-3.57 (m, 1H CHNHSO<sub>2</sub>), 3.58-3.69 (m, 1H, CHOH), 3.73 (dd,  $J_1$  = 6.1 Hz,  $J_2$  = 8.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>NHAr), 4.26-4.46 (m, 2H, CHCONH, CHCOO), 4.62 (s, 1H, CHOH), 5.01-5.18 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>Ar), 6.31 (t,  $J$  = 5.9 Hz, 1H, ArNHCH<sub>2</sub>), 6.73 (m, 1H, Ar-H), 6.96 (d,  $J$  = 7.2 Hz, 2H, Ar-H), 7.20 (t,  $J$  = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.28-7.40 (m, 11H, Ar-H, SO<sub>2</sub>NH), 7.49 (t,  $J$  = 7.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.61 (t,  $J$  = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.75 (dd,  $J_1$  = 1.4 Hz,  $J_2$  = 7.9 Hz, 2H, Ar-H), 8.01 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, CONHCHCH<sub>3</sub>), 8.42 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, CONHCHCH<sub>2</sub>), 9.83 (s, 2H, NHNH) ppm.

**MS (ESI+):** m/z (%): 867 ( $\text{MH}^+$ , 34), 77 (100)

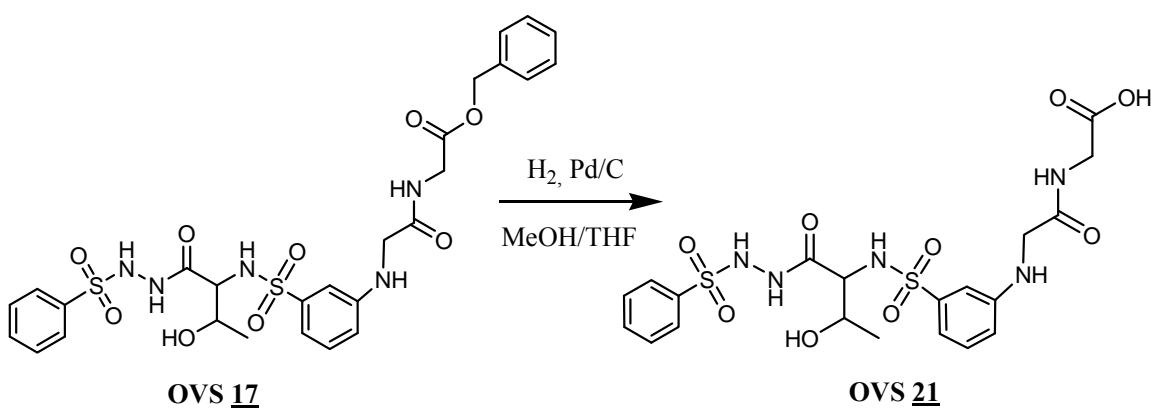
**HR-MS:** m/z:  $\text{MH}^+$  867,2685 (izračunano za  $\text{C}_{40}\text{H}_{47}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}_2$ : 867,2693)

**IR (KBr):** 3362, 3065, 2926, 2361, 2343, 1736, 1657, 1604, 1527, 1449, 1387, 1333, 1263, 1166, 1091, 1026, 922, 754, 698, 583 cm<sup>-1</sup>

**T<sub>tališča</sub>:** 78-81 °C

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = +9,1^\circ$  ( $c = 0,259$  g/100 ml, MeOH)

#### **4.2.11 Sinteza 2-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-(fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il)sulfamoil)fenilamino)acetamido)etanojske kisline (OVS 21)**



195 mg (0,308 mmol) spojine **OVS 17** smo raztopili v metanolu in prepihovali 15 minut z argonom. Nato smo dodali 20 mg (10% mase spojine) Pd/C in prepihovali z vodikom. Reakcijsko zmes smo mešali preko noči, odstranili katalizator in odparili topilo

pri znižanem tlaku. Produkt smo čistili s flash kromatografijo (Mf: DKM/MeOH = 3/1). Dobili smo 70 mg (0,129 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 0,42

Rf: 0,16 (Mf: DKM/MeOH =3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 0.73 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 3.40-3.51 (m, 3H, NHCH<sub>2</sub>CO, CHNH), 3.52-3.63 (m, 1H, CHOH), 3.66 (d, *J* = 5.0 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH), 6.55 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, ArNHCH<sub>2</sub>), 6.80 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 6.88-6.97 (m, 2H, Ar-H), 7.19 (t, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.48 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.53-7.64 (m, 2H, Ar-H, SO<sub>2</sub>NH), 7.70-7.94 (m, 3H, CONH, Ar-H), 9.40 (s, 2H, NH-NH) ppm.

**MS (ESI+):** m/z (%): 544 ( $\text{MH}^+$ , 58), 566 ( $\text{MNa}^+$ , 100)

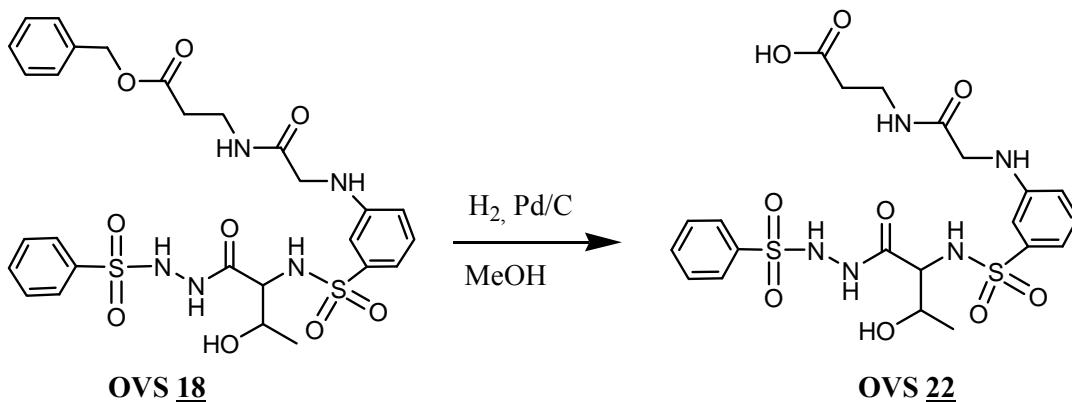
**HR-MS:** m/z:  $\text{MH}^+$  544,1166 (izračunano za  $\text{C}_{20}\text{H}_{26}\text{N}_5\text{O}_9\text{S}_2$ : 544,1172)

**IR (KBr):** 3377, 2983, 2927, 2361, 2343, 1658, 1604, 1445, 1408, 1323, 1263, 1162, 1090, 1026, 987, 928, 757, 588 cm<sup>-1</sup>

T<sub>tališča</sub>: 178-181 °C

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = -8,0^\circ$  (c = 0,212 g/100 ml, MeOH)

#### **4.2.12 Sinteza 3-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-(fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il)sulfamoil)fenilamino)acetamido)propanojske kisline (OVS 22)**



180 mg (0,278 mmol) spojine **OVS 18** smo raztopili v metanolu in preprihovali 15 minut z argonom. Nato smo dodali 20 mg (10% mase izhodne spojine) Pd/C in preprihovali z vodikom. Reakcijsko zmes smo mešali preko noči, odstranili katalizator in odparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo čistili s flash kromatografijo (Mf: DKM/MeOH = 3/1). Dobili smo 62 mg (0,111 mmol) belih kristalov.

Izkoristek reakcije: 0,40

Rf: 0.16 (Mf: DKM/MeOH = 3/1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 0.81 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 2.08-2.23 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.10-3.30 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.32-3.66 (m, 4H, CHNH, CHO<sub>H</sub>, ArNHCH<sub>2</sub>), 6.42 (t, *J* = 5.9 Hz, 1H, ArNHCH<sub>2</sub>), 6.77 (m, 1H, Ar-H), 6.82 (s, 1H, Ar-H), 6.95 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.20 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.49 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar-H), 7.60 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.69 (t, *J* = 5.5 Hz, 1H, Ar-H), 7.79 (d, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.95 (s, 2H, SO<sub>2</sub>NH, CONH), 8.77-9.74 (br, 2H, NHNH) ppm.

**MS (ESI-):** m/z (%): 556 ((M-H)<sup>-</sup>, 44), 255 (85), 285 (100), 369 (49)

**HR-MS:** m/z: (M-H)<sup>-</sup> 556,1164 (izračunano za C<sub>21</sub>H<sub>26</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>: 556,1172)

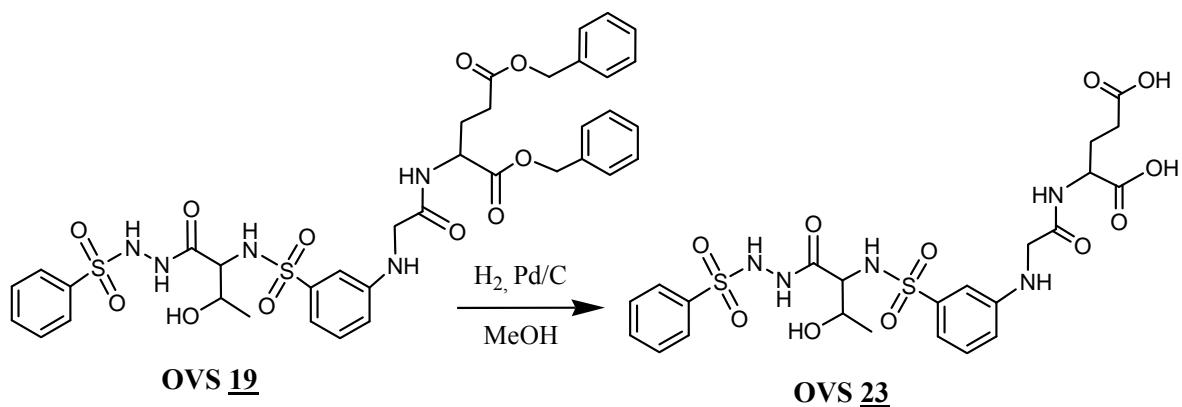
**IR (KBr):** 3378, 2978, 2935, 2361, 2343, 1654, 1604, 1561, 1448, 1415, 1327, 1265, 1163, 1090, 1025, 928, 730, 587  $\text{cm}^{-1}$

### **Elementna analiza za C<sub>21</sub>H<sub>27</sub>N<sub>5</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>**

T<sub>tališča</sub>: 144-147 °C

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = -47.2^\circ$  ( $c = 0,224$  g/100 ml, MeOH)

#### **4.2.13 Sinteza 2-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-(fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il)sulfamoil)fenilamino)acetamido)pentadiojske kisline (OVS 23)**



109 mg (0,137 mmol) spojine **OVS 19** smo raztopili v metanolu in prepihovali 15 minut z argonom. Nato smo dodali 12 mg (10% mase spojine) Pd/C in prepihovali z vodikom. Reakcijsko zmes smo mešali preko noči, odstranili katalizator in odparili topilo pri znižanem tlaku. Dobili smo 71 mg (0,115 mmol) spojine bele barve.

**Izkoristek reakcije:** 0,84

**Rf:** 0,22 (EtOAc/MeOH/NH<sub>3</sub> = 4/1/1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 0.81 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>), 1.58-1.80 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.13 (t, *J* = 8.8 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>COOH), 3.40-3.90 (m, 4H, CHNHSO<sub>2</sub>, ArNHCH<sub>2</sub>, CHOH), 3.92-4.04 (m, 1H, CHCOOH), 6.60 (t, *J*<sub>1</sub> = 5.3 Hz, 1H, ArNHCH<sub>2</sub>), 6.84 (m, 1H, Ar-H), 6.87-7.02 (m, 2H, Ar-H), 7.22 (t, *J* = 7.9 Hz, 1H, Ar-H), 7.44-7.54 (m, 3H, Ar-H, SO<sub>2</sub>NH), 7.57 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, Ar-H), 7.71-7.86 (m, 3H, Ar-H, CONH), 10.02 (s, 1H, NHNHC), 10.48 (s, 1H, NHNHSO<sub>2</sub>) ppm.

**MS (ESI-):** m/z (%) 614 ((M-H)<sup>-</sup>, 86), 229 (100)

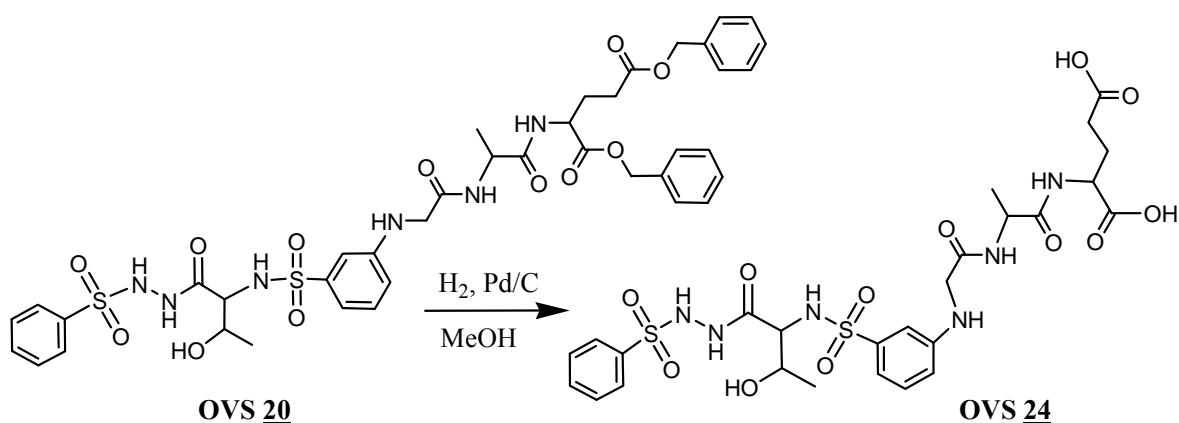
**HR-MS:** m/z: (M-H)<sup>-</sup> 614, 1239 (izračunano za C<sub>23</sub>H<sub>28</sub>N<sub>5</sub>O<sub>11</sub>S<sub>2</sub>: 614,1227)

**IR (KBr):** 3376, 3069, 2978, 2927, 2361, 2343, 1660, 1604, 1529, 1408, 1331, 1165, 1091, 1024, 987, 928, 730, 686, 583 cm<sup>-1</sup>

**T<sub>tališča</sub>:** 151-154 °C

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -29,1 ° (c = 0,292 g/100 ml, MeOH)

#### 4.2.14 Sinteza 2-(2-(2-(3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-(fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il)sulfamoil)fenilamino)acetamido)pentandiojske kisline (**OVS 24**)



257 mg (0,296 mmol) spojine **OVS 20** smo raztopili v metanolu in prepihovali 15 minut z argonom. Nato smo dodali 25 mg (10% mase spojine) Pd/C in prepihovali z vodikom. Reakcijsko zmes smo mešali preko noči, odstranili katalizator in odparili topilo pri znižanem tlaku. Zaradi prisotnosti DMF smo produkt raztopili v metanolu ter ga oborili v DKM. Večkrat smo topilo odlili in produkt prelili z dietiletrom ter nato produkt posušili pri znižanem tlaku. Dobili smo 114 mg (0,166 mmol) spojine v obliki belega praška.

**Izkoristek reakcije:** 0,56

**Rf:** 0,24 (DKM/MeOH/CH<sub>3</sub>COOH = 3/1/0,1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 0.86 (d, *J* = 6.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CHOH), 1.21 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>CHNH), 1.71-1.93 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 2.12-2.24 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO), 3.53-3.59 (m, 1H, CHNH), 3.59-3.68 (m, 1H, CHOH), 3.74 (d, *J* = 5.3 Hz, 2H, ArNHCH<sub>2</sub>), 3.99-4.10 (m, 1H, CHCOOH), 4.27-4.48 (m, 1H, NHCHCH<sub>3</sub>), 6.35 (t, *J* = 5.3 Hz, 1H, ArNHCH<sub>2</sub>), 6.76 (m, 1H, Ar-H), 6.94 (d, *J* = 8,6 Hz, 2H, Ar-H), 7.20 (t, *J* = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.44-7.55 (m, 2H, Ar-H), 7.60 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.70-7.83 (m, 3H, SO<sub>2</sub>NH, Ar-H), 7.89 (d, *J* = 7.3 Hz, 1H, CONHCHCH<sub>3</sub>), 8.11 (d, *J* = 7.8 Hz, CONHCHCH<sub>2</sub>), 9.94 (s, 1H, NHNH) ppm.

**MS (ESI-):** m/z (%): 685 ((M-H)<sup>-</sup>, 100)

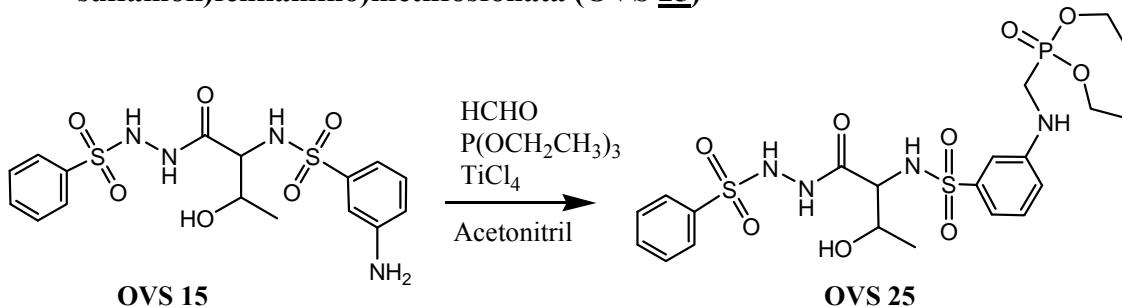
**HR-MS:** m/z: (M-H)<sup>-</sup> 685,1612 (izračunano za C<sub>26</sub>H<sub>33</sub>N<sub>6</sub>O<sub>12</sub>S<sub>2</sub>: 685,1598)

**IR (KBr):** 3368, 3073, 2983, 2361, 2342, 1658, 1603, 1525, 1448, 1412, 1258, 1165, 1092, 1026, 931, 785, 729, 687, 584 cm<sup>-1</sup>

**T<sub>tališča</sub>:** 144-147 °C

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -22,6 ° (c = 0,251 g/100 ml, MeOH)

#### 4.2.15 Sinteza dietil (3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-(fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il)sulfamoil)fenilamino)metilfosfonata (OVS 25)



0,570 mg (1,33 mmol) spojine **OVS 15** smo raztopili v 5 ml acetonitrila in dodali 0,11 ml (1,33 mmol) formaldehida, 0,22 ml (1,33 mmol) trietilfosfita in 0,015 ml (10 mol%) titanovega klorida. Reakcija je potekala čez noč pri sobni temperaturi. Nato smo odparili topilo pri znižanem tlaku, raztopili produkt v 80 ml etilacetata, sprali s 3 × 15 ml vode in z 20 ml nasičene raztopine NaCl ter dodali Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparili topilo pri znižanem tlaku. Produkt smo čistili s flash kromatografijo (Mf: DKM/MeOH = 20/1). Dobili smo 475 mg (0,821 mmol) svetlo rumenih kristalov.

**Izkoristek reakcije:** 0,62

**Rf:** 0,24 (Mf: DKM/MeOH = 9/1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 0.85 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 1.22 (t, *J* = 7.0 Hz, 6H, 2×CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 3.47-3.68 (m, 4H, CH<sub>2</sub>NHAr, CHNH, CHO<sub>H</sub>), 3.96-4.10 (m, 4H, 2×CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 4.62 (d, *J* = 5.1 Hz, 1H, CHO<sub>H</sub>), 6.18-6.30 (m, 1H, Ar-NHCH<sub>2</sub>), 6.92 (m, 1H, Ar-H), 6.95 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.11 (s, 1H, Ar-H), 7.21 (t, *J* = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.28 (d, *J* = 8.1 Hz, 1H, SO<sub>2</sub>NH) 7.50 (t, *J* = 7.6 Hz, 2H, Ar-H), 7.61 (t, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.76 (d, *J* = 8.0 Hz, 2H, Ar-H), 9.79 (d, *J* = 2.8 Hz, 1H, NHN<sub>H</sub>CO), 9.87 (d, *J* = 2.6 Hz, NHNHSO<sub>2</sub>) ppm.

**<sup>31</sup>P-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 25,23 (s) ppm.

**MS (ESI-):** m/z (%): 577 ((M-H)<sup>-</sup>, 24), 306 (100)

**HR-MS:** m/z: (M-H)<sup>-</sup> 577,1198 (izračunano za C<sub>21</sub>H<sub>30</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>P: 577,1192)

**IR (KBr):** 3388, 3219, 2984, 2361, 2342, 1694, 1604, 1514, 1480, 1449, 1335, 1230, 1166, 1023, 976, 758, 729, 687, 684 cm<sup>-1</sup>

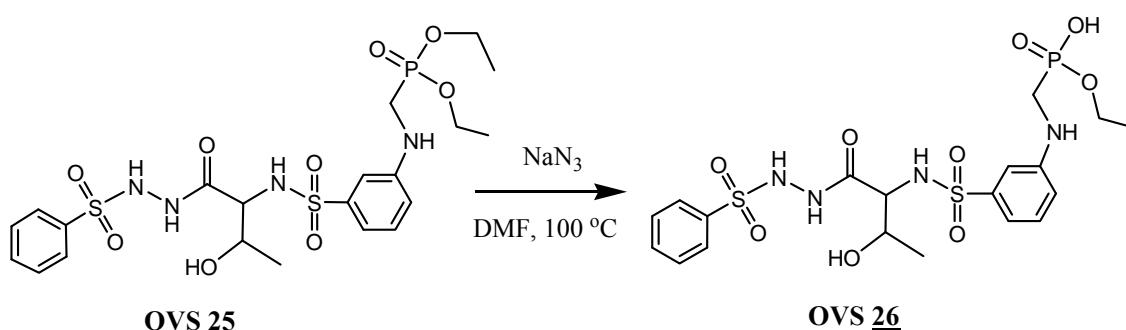
**Elementna analiza za C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>P:**

	%C	%H	%N
Izračunano:	43,59	5,40	9,68
Ugotovljeno:	43,31	5,49	9,74

T<sub>tališča</sub>: 80-84 °C

Optična sučnost: [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -27,0 ° (c = 0,263 g/100 ml, MeOH)

#### 4.2.16 Sinteza etil 3-(N-(3-hidroksi-1-oxso-(2-(fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il)sulfamoil)fenilamino)metilfosfonata (OVS 26)



90 mg (0,156 mmol) spojine **OVS 25** smo raztopili v 2 ml DMF, dodali 75,8 mg (1,167 mmol) natrijevega azida in segrevali čez noč pri temperaturi vrenja. Nato smo odparili topilo pod znižanim tlakom, dodali 30 ml destilirne vode, preverili bazičnost raztopine in sprali z  $2 \times 10$  ml etilacetata. Nato smo nakisali z 1 M HCl do pH 1 in ekstrahirali z etilacetatom ( $5 \times 20$  ml). Združeno organsko fazo smo sprali z nasičeno raztopino NaCl, dodali Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 40 mg (0,0727 mmol) rumeno-oranžnega praška.

**Izkoristek reakcije:** 0,47

**Rf:** 0,14 (EtOAc/MeOH/NH<sub>3</sub> = 4/1/1)

**<sup>1</sup>H-NMR** (300 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ 0.86 (d, *J* = 6.4 Hz, 3H, CHCH<sub>3</sub>), 1.18-1.25 (m, 3H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) 3.43-3.52 (m, 3H, CH<sub>2</sub>NHAr, CHNH), 3.67-3.76 (m, 1H, CHOH), 3.94-4.10 (m, 2H, CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 6.69-6.78 (m, 1H, Ar-NHCH<sub>2</sub>), 6.86 (m, 1H, Ar-H), 7.01 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.09 (m, 1H, Ar-H), 7.22-7.34 (m, 2H, Ar-H, SO<sub>2</sub>NH), 7.43 (t, *J* = 7.5 Hz, 2H, Ar-H), 7.54 (t, *J* = 7.4 Hz, 2H, Ar-H), 7.78 (m, 1H, Ar-H) ppm.

**MS (ESI+):** m/z (%): 551 (MH<sup>+</sup>, 26), 141 (100)

**HR-MS:** m/z: MH<sup>+</sup> 551,1052 (izračunano za C<sub>19</sub>H<sub>28</sub>N<sub>4</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>P: 551,1035)

**IR (KBr):** 3410, 1638, 1615, 1448, 1338, 1162, 684, 586, 486

**T<sub>tališča</sub>:** 94-97 °C

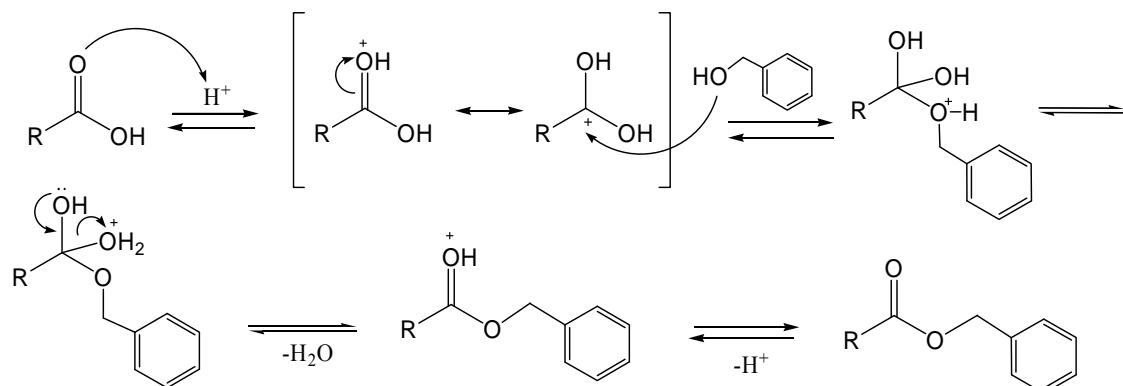
**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -39,7 ° (c = 0,145 g/100 ml, MeOH)

## 5 RAZPRAVA IN REZULTATI

### 5.1 Razprava o sintezah spojin

#### 5.1.1 Zaščita karboksilne skupine L-treonina (OVS 1)

Karboksilno skupino L-treonina smo zaščitili v obliki benzilnega estra s kislinsko katalizirano esterifikacijo. *p*-toluensulfonska kislina protonira kisik karbonilne skupine. Zaradi resonančnega efekta pride do nastanka karbokationa, ki je dober elektrofil in reagira s hidrosilno skupino benzilnega alkohola. (slika 16) Mehanizem reakcije je nukleofilna adicija s sledičejo eliminacijo vode. Da bi dosegli čim večji izkoristek, smo uporabili 5-kratni pribitek benzilnega alkohola, reakcijski zmesi smo dodali benzen in segrevali pri 90°C. Benzen tvori z vodo azeotropno zmes, ki ima nižjo temperaturo vrelišča kot posamezno topilo. Aparaturo smo opremili z vodnim hladilnikom in Dean-Starkovim nastavkom, ki služi za odstranjevanje vode, ki je stranski produkt reakcije in tako usmerimo ravnotežje v nastajanje produktov. Benzilna zaščita spada med zaščitne skupine, ki jih odstranjujemo s katalitskim hidrogeniranjem.

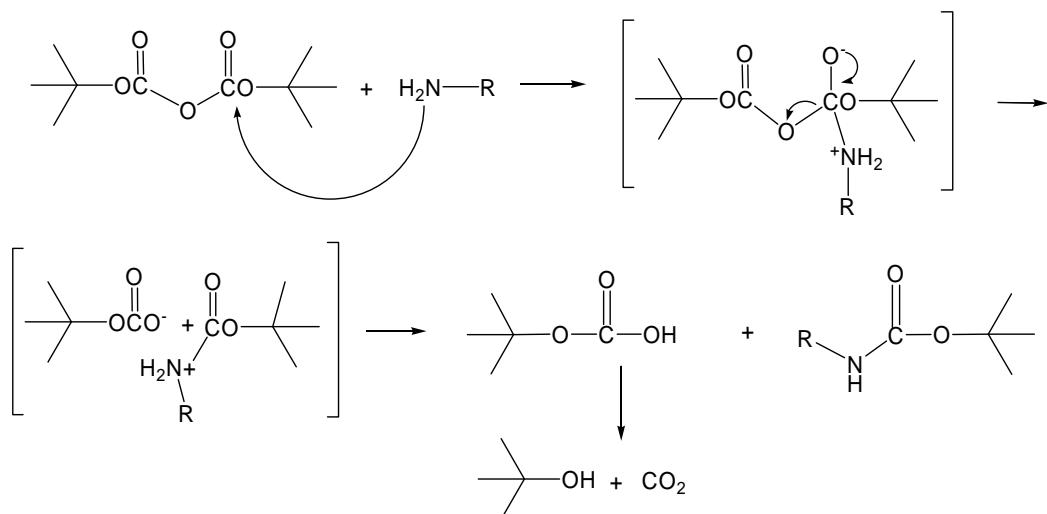


Slika 16: Mehanizem nastanka estrske vezi

#### 5.1.2 Zaščita aminske skupine L-treonina (OVS 11)

Aaminsko skupino L-treonina smo zaščitili v obliki karbamata z uporabo di-*terc*-butildikarbonata ((BOC)<sub>2</sub>O). Reakcija poteka po mehanizmu nukleofilne adicije s sledičejo eliminacijo. (slika 17) Zaščito smo uvedli, ker je aaminska skupina L-treonina boljši nukleofil kot karboksilna skupina in bi lahko motila nadaljnji potek reakcij. Večja

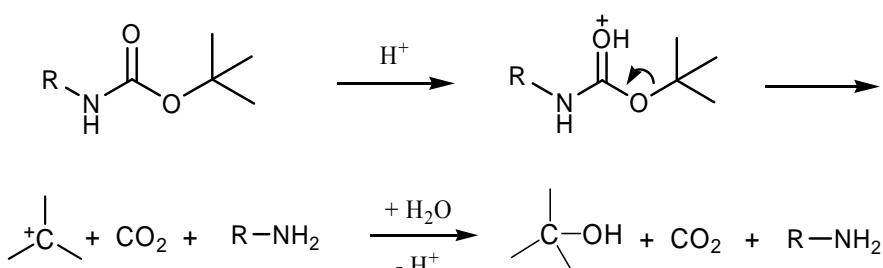
nukleofilnost aminske skupine in izbira primernih reakcijskih pogojev (voda/dioksan kot topilo, kontrolirana nižja temperatura) usmerijo reakcijo pretežno v nastajanje N-aciliranega produkta. Dioksan smo uporabili, ker je dovolj polaren, da se meša z vodo in dovolj nepolaren, da sta v njem topna  $(BOC)_2O$  in naš produkt. Z dodatkom KOH smo preprečili protoniranje amino skupine in tako ohranili njene nukleofilne lastnosti. Poleg tega z zvišanjem pH-ja izboljšamo topnost aminokisline in s tem pospešimo reakcijo. Z nizko temperaturo in počasnim dodajanjem reagenta  $(BOC)_2O$  smo preprečili njegovo hidrolizo. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo, dodali hladno vodo in ekstrahirali z etilacetatom. Vodno fazo smo nakisali z 1M HCl do pH 2, s tem smo produkt pretvorili v neionizirano obliko in ga nato iz vode ekstrahirali z etilacetatom. Pribitni L-treonin, ki se je pri nakisanju protoniral, je ostal v vodni fazi. Preostalo vodo iz organske faze smo odstranili s sušilnim sredstvom  $Na_2SO_4$ , nato pa odparili etilacetat pod znižanim tlakom.



Slika 17: Mehanizem zaščite aminske skupine z uporabo di-terc-butildikarbonata

### 5.1.3 Odstranitev *terc*-butilosikarbonilne (BOC) zaščite (OVS 13)

Pri reakciji uporabimo diklormetan in trifluorocetno kislino v razmerju 9/1. V kislem BOC zaščita razпадa na *terc*-butanol in  $CO_2$ . Karbokation, ki nastane pri cepitvi BOC, je stabiliziran zaradi pozitivnega induktivnega efekta metilnih skupin. (slika18) Prebitno frifluorocetno kislino in *terc*-butanol odparimo pri znižanem tlaku. Produkt je v obliki soli s trifluorocetno kislino.

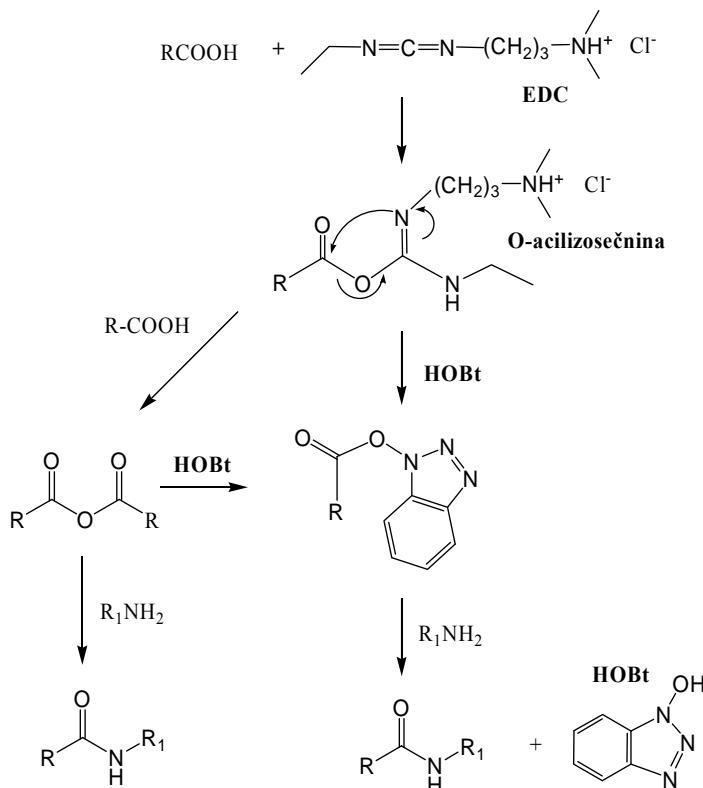


**Slika 18:** Mehanizem odstranitve BOC-zaščite v kislem

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

Amidno vez smo tvorili s karbodiimidno metodo z uporabo EDC in HOBT. Karbonilna skupina kisline je šibek elektrofil, zato smo jo aktivirali z EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidijev klorid), s katerim tvori aktiviran ester in tako povečali elektrofilnost karbonilnega C-atoma. Karboksilatni anion se kot nukleofil veže na protoniran karbodiimid, pri čemer nastane reaktivna O-acilizosečnina. Ta reagira z aminsko skupino, nastane amid in vodotopen derivat sečnine (slika 19), ki ga pri ekstrakciji z vodo odstranimo. Mehanizem reakcije je nukleofilna substitucija na karbonilnem C-atomu. O-acilizosečnina lahko po alternativni poti reagira s še eno molekulo karboksilne kisline, nastane simetričen anhidrid, ki je prav tako aktiviran za reakcijo z aminsko skupino in nastane amid. Neželena stranska reakcija je premestitev O-acilizosečnine v stabilno N-acilsečnino. Potek te reakcije in nastanek drugih stranskih produktov (ciklizacija, racemizacija, tvorbo simetričnih anhidridov) smo preprečili z dodatkom HOBT (1-hidroksibenzotriazola), ki tvori z O-acilizosečnino manj reaktiven benzotriazolni ester. Reakcija s HOBT poteče hitreje kot intramolekularna premestitev.

Izhodno spojino smo raztopili v DMF in dodali bazičen N-metilmorfolin. Z alkalnim medijem smo dosegli ionizacijo karboksilne kisline, ki tako lažje napade ogljikov atom karbodiimida EDC. DMF, bazične spojine (EDC in NMM) in vodotopen derivat sečnine smo odstranili pri ekstrakciji z 10% raztopino citronske kisline oz. z 1M HCl. Opisano metodo smo uporabili pri spojinah **OVS 7**, **OVS 8**, **OVS 12**, **OVS 17**, **OVS 18**, **OVS 19** in **OVS 20**.

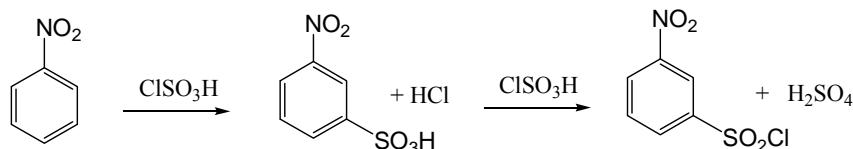


*Slika 19:* Sinteza amidne vezi z uporabo reagentov EDC in HOBt

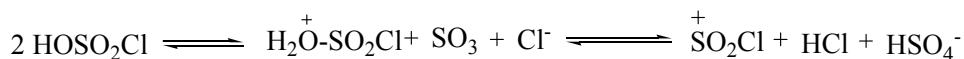
### 5.1.5 Priprava 3-nitrobenzensulfonilklorida (OVS 4)

Reakcija klorsulfoniranja poteka po mehanizmu elektrofilne aromatske substitucije, in sicer v dveh stopnjah. Najprej nastane sulfonski derivat, v drugi stopnji pa dobimo 3-nitrosulfonilklorid. (slika 20) Pribitek klorsulfonske kisline in povišana temperatura reakcijske zmesi sta odločilni, da se reakcija ne ustavi na prvi stopnji. Optimalna je uporaba 5-kratnega prebitka kisline.

Reakcijsko zmes smo segrevali čez noč pri temperaturi 110 °C. Vodnemu hladilniku smo dodali klorkalcijevo cevko, saj je klorsulfonska kislina občutljiva na vлагo. Produkt smo izolirali tako, da smo reakcijsko zmes počasi ob mešanju zlivali na led. Produkt se je v vodi oboril, z nizko temperaturo pa smo preprečili hidrolizo sulfonilklorida do sulfonske kisline. Prebitna klorsulfonska kislina je hidrolizirala do HCl in žveplove (VI) kisline, pri tem sproščena toplota se je porabila za taljenje ledu. Suspenzijo smo prefiltrirali z odsesavanjem.



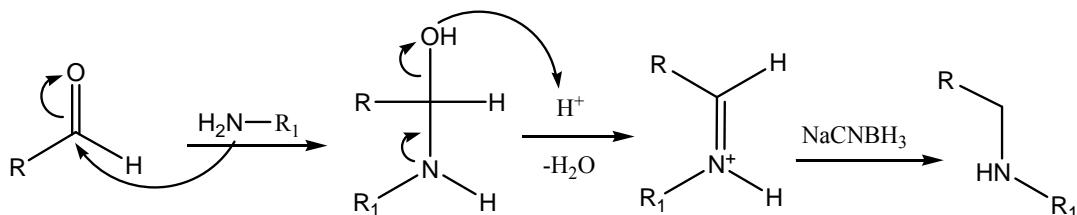
Nastanek elektrofila:



Slika 20: Klorsulfoniranje in nastanek elektrofila

### 5.1.6 Sinteza sekundarnih aminov z metodo reduktivnega aminiranja (OVS 5)

Sekundarna aminska skupina v bioloških sistemih deluje kot bazični center. Ena od metod za sintezo je reduktivno aminiranje, ki poteka v dveh stopnjah. Najprej poteče nukleofilna adicija aminske skupine na karbonilno skupino aldehida ali ketona s sledečo eliminacijo vode, nastane iminijev kation. V naslednji stopnji se hidridni ion veže na ogljik ob pozitivno nabitem dušiku in iminijev kation se tako reducira do amina. (slika 21) Uporabljena metoda je direktno reduktivno aminiranje, pri katerem tvorba imina in redukcija potekata istočasno. NaCNBH<sub>3</sub> je šibek reducent, ki v rahlo kislem okolju selektivno reducira slabo obstojen iminijev kation. Nadaljevanje reakcije do terciarnega amina preprečimo z ustreznimi pogoji. Ravnotežno reakcijo pomaknemo v nastajanje imina z uporabo molekularnih sit, ki vežejo vodo. NaCNBH<sub>3</sub> dodajamo počasi na ledeni kopeli, ker v stiku s kislino pride do eksotermne reakcije pri kateri se sprošča vodik.

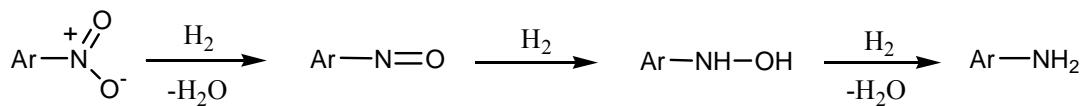


Slika 21: Mehanizem rekuktivnega aminiranja

### 5.1.7 Katalitsko hidrogeniranje

Pri katalitskem hidrogeniranju spojina reagira z vodikom v prisotnosti katalizatorja, v našem primeru je bil to paladij, adsorbiran na aktivni ogljik (Pd/C). Pomembna je izbira topila, s katerim vplivamo na potek reakcije ter na topnost reaktanta in vodika. Za

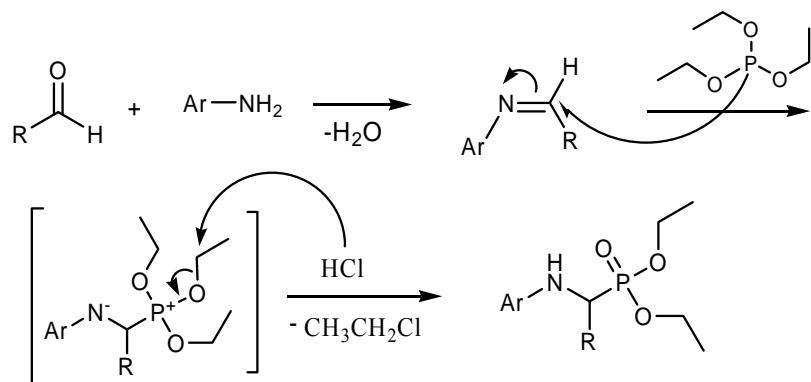
redukциjo nitro skupine je najboljša zmes topil metanol/THF v razmerju 1/1, pri odstranjevanju benzilne zaščite smo uporabili metanol.



*Slika 22: Mehanizem redukcije nitro skupine*

### 5.1.8 Sinteza $\alpha$ -aminofosfonata (OVS 25)

$\alpha$ -Aminofosfonati so fosforjevi analogi aminokislin. Sinteza poteka v dveh stopnjah, in sicer poteče najprej nukleofilna adicija aminske skupine na karbonilno skupino aldehyda s sledečo eliminacijo vode, nastali imin nato reagira s triethylfosfitom. (slika 23) Tudi druga reakcija je nukleofilna adicija in poteka v prisotnosti titanovega klorida.

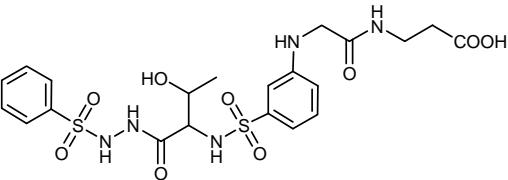
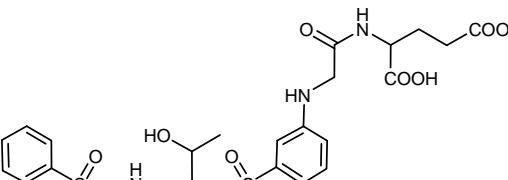
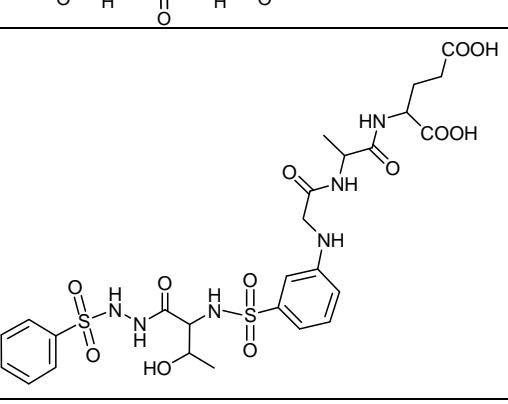
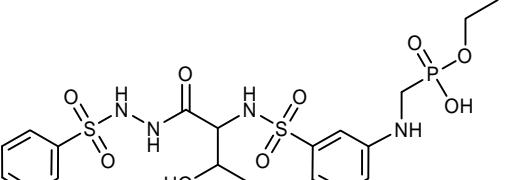


*Slika 23: Mehanizem nastanka  $\alpha$ -aminofosfonata*

## 5.2 Rezultati biokemijskega testiranja spojin

Preglednica XI: Rezultati testiranja inhibitorne aktivnosti na encima MurC in MurD

Oznaka spojine	Struktura	Mm (gmol <sup>-1</sup> )	Konc. (μM)	RA%	
				MurC	MurD
OVS 5		422,45	500	<b>100</b>	<b>92</b>
OVS 6		332,33	500	<b>95</b>	<b>83</b>
OVS 9		403,41	500	<b>96</b>	<b>82</b>
OVS 10		461,44	500	<b>101</b>	<b>90</b>
OVS 14		458,47	500	<b>97</b>	<b>93</b>
OVS 15		428,48	500	<b>97</b>	<b>85</b>
OVS 16		486,52	500	<b>99</b>	<b>85</b>
OVS 21		543,57	500	<b>103</b>	<b>82</b>

<b>OVS 22</b>		557,60	500	<b>99</b>	<b>88</b>
<b>OVS 23</b>		615,13	500	<b>87</b>	<b>98</b>
<b>OVS 24</b>		686,71	500	<b>95</b>	<b>85</b>
<b>OVS 26</b>		550,54	500	<b>56</b>	<b>82</b>

**Rezidualna aktivnost (RA%)** encima predstavlja razmerje katalitičnih aktivnosti encima v prisotnosti testiranega inhibitorja in brez njega. Izračunamo jo iz razmerja absorbanc, izrazimo v odstotkih in je merilo učinkovitosti inhibitorja. Manjša kot je RA, večji meri inhibitor pri dani koncentraciji upočasni encimsko katalizirano reakcijo. Vrednosti RA od 80 – 100% so v mejah eksperimentalne napake, zato spojine s takšno aktivnostjo označimo kot neaktivne. Tudi vrednosti nad 100% so posledica eksperimentalne napake. Na encimih MurC in MurD je bila RA izmerjena 12 sintetiziranim spojinam. Določili so jo s testom z malehitnim zelenim, pri katerem so merili količino nastalega Pi. Pri testiranju so bile uporabljene 500 µM koncentracije spojin.

Vrednost  $IC_{50}$  se določi z merjenjem RA pri več različnih koncentracijah inhibitorja in predstavlja koncentracijo pri kateri je RA 50%.

Iz preglednice XI, v kateri so zbrani rezultati biokemijskih testiranj naših spojin, lahko razberemo, da je edina spojina, ki izkazuje inhibitorno aktivnost **OVS 26**, ki je bila načrtovana kot kompetitivni inhibitor substrata UDP-MurNAc-L-Ala. Glede na rezultate testiranj domnevamo, da gre pri spojini **OVS 26** za koncentracijsko neodvisno 50% inhibicijo encima v intervalu 200-2000 µM. Ker je bila pri določanju IC<sub>50</sub> v tako širokem koncentracijskem intervalu izmerjena le 50% RA sklepamo, da je to pri izbranih pogojih testiranja maksimalna možna inhibicija. Rezultati testiranj so nas presenetili in jih ne moremo zadovoljivo pojasniti z mehanizmi kompetitivne inhibicije, za katerega je bila spojina načrtovana in je teoretično možna tudi 100% inhibicija encima. Bolj ustreznii bi lahko bili alosterični, akompetitivni in nekompetitivni (mešani) mehanizmi inhibicije, pri katerih z inhibitorjem zmanjšamo največjo možno doseženo začetno hitrost ( $v_{max}$ ) encimsko katalizirane reakcije. Za natančnejšo interpretacijo rezultatov bi bilo potrebno opraviti dodatne teste, kot sta npr. obsežnejša encimska kinetika in rentgenska kristalografija. Čeprav spojina izkazuje določeno inhibitorno aktivnost, ne moremo sklepiti o odnosu med strukturo in delovanjem, ker ne poznamo pravega mehanizma inhibicije.

Med spojinami z in brez benzensulfonohidrazidnega substituenta ni opaziti nobene razlike v aktivnosti. Prav tako vezava različnih aminokislin oz. peptidov na *meta* mesto benzenovega obroča ne poveča inhibitorne aktivnosti v primerjavi s spojinami, ki imajo vezano aminsko ali nitro skupino.

Pričakovali smo, da bodo spojine **OVS 9**, **OVS 10**, **OVS 21**, **OVS 22**, **OVS 23** in **OVS 24**, ki vsebujejo fragment glicina, β-glicina, glutaminske kisline in dipeptida alanil-glutaminske kisline, sposobne tvoriti interakcije z encimom in bodo izkazovale določeno inhibitorno aktivnost, vendar se niso izkazale kot učinkovite. Spojine so zaradi OH skupine treonina, karboksilnih in drugih funkcionalnih skupin precej polarne, kar lahko otežuje umestitev v aktvno mesto encima in tako vpliva na slabo aktivnost spojin. Spojine so tudi precej velike in verjetno nimajo ustrezne konfiguracije za tvorbo interakcij z aktivnim mestom.

## 6 SKLEP

V okviru diplomske naloge smo sintetizirali 12 novih potencialnih inhibitorjev ligaz Mur s 3-aminobenzensulfoniltreoninsko strukturo. Na osnovno strukturo smo pripeli različne substituente, ki bi čim bolje posnemali tiste fragmente substratov oz. produktov encimov Mur, ki so pomembni za vezavo v aktivno mesto encima. Rezultati encimskih testov so pokazali, da so bile spojine, ki imajo na karboksilno skupino treonina vezan benzensulfonohidrazid in spojine s prosto karboksilno skupino neaktivne. Ugotovili smo tudi, da vezava različnih aminokislin oz. peptidov na *meta* mesto benzena ne poveča inhibitorne aktivnosti spojin.

Z ustreznimi analiznimi postopki smo dokazali strukturno ustreznost in čistost spojin ter jim z *in vitro* testiranjem na izoliranih encimih MurC in MurD določili inhibitorno aktivnost. Na testiranje za encim MurE smo dali spojine **OVS 10**, **OVS 23** in **OVS 24**, vendar rezultatov v času diplomskega dela še nismo dobili.

Edina spojina, ki je izkazovala inhibitorno aktivnost na encim MurC je etil 3-(N-(3-hidroksi-1-okso-1-(2-(fenilsulfonil)hidrazinil)butan-2-il)sulfamoil)fenilamino)metilfosfonat (**OVS 26**). Domnevamo, da gre pri tej spojini za koncentracijsko neodvisno 50% inhibicijo encima v intervalu 200-2000  $\mu\text{M}$ , kar nas je presenetilo, saj so bile spojine načrtovane kot kompetitivni inhibitorji. Ena od nadaljnjih modifikacij te spojine bi bila odstranitev etilne skupine s fosfonata. Nobena od sintetiziranih spojin se ni izkazala kot učinkovit inhibitor encima MurD.

Iz rezultatov lahko sklepamo, da benzensulfonamidne spojine, ki imajo v svoji strukturi vezan treonin, niso ugodne za vezavo v aktivno mesto encimov Mur in zato niso zanimive za nadaljne raziskave.

## 7 LITERATURA

1. Goodman & Gilman: The pharmacological Basis of Therapeutics 10<sup>th</sup> Ed., The McGrawHill Companies, New York, 2001; 1143-1146.
2. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5<sup>th</sup> Ed, Lippincott Williams & Wilkins, 2002; 759-802.
3. Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi 2002; 3-56, 137-158, 427-46.
4. Wright GD: The Antibiotic resistome: the nexus of chemical and genetic diversity. March 2007; 5: 175-86.
5. Vila J, Sanchez-Cespedes J, Giralt E: Old and New Strategies for the Discovery of Antibacterial Agents, Curr. Med. Chem.-Anti.Infective Agents 2005; 4: 337-353.
6. <http://biocyc.org/META/new-image?type=PATHWAY&object=TEICHOICACID-PWY> (marec, 2009)
7. [http://pathmicro.med.sc.edu/fox/cell\\_envelope.htm](http://pathmicro.med.sc.edu/fox/cell_envelope.htm) (marec, 2009)
8. Volmer W, Blanot D, De Pedro MA: Peptidoglycan structure and architecture. FEMS Microbiol Rev II 2007; 1-19.
9. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. FEMS Microbiol Rev II 2008:1-40.
10. <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/sa-pep.jpg> (marec, 2009)
11. <http://pathmicro.med.sc.edu/fox/ec-pep.jpg> (marec, 2009)
12. van Heijenoort J: Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. Nat.Prod.Rep. 2001; 18: 503-19.
13. <http://faculty.ircc.edu/faculty/tfischer/GramPos.jpg> (marec, 2009)
14. <http://faculty.ircc.edu/faculty/tfischer/Gram%20neg%20cell%20wall3.jpg> (marec, 2009)
15. Bouhs A, Traunkfield AE, Bugg TDH, Mengin-Lecreulux D: The biosynthesis of peptidoglycan lipid –linked intermediates. FEMS Microbiol Rev 32 2008: 208-33.
16. Welzel P: Syntheses around the Transglycosylation Step in Peptidoglycan Biosynthesis. Chem. Rev. 2005; 4610-4660.
17. Clyde A Smith: Structure, Function and Dynamics in the *mur* Family of bacterial Cell Wall Ligases. Journal of Molecular Biology 2006; 362: 640-55.

18. Zoeby EA, Sanschagrin F, Levesque RC: Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Molecular Microbiology* 2003; 47: 1-12.
19. Mol CD, Brooun A, Dougan DR, Hilgers MT, Tari LW, Wijnands RA, Knuth MW, McRee DE, Swanson RV: Crystal Structures of Active Fully Assembled Substrate- and Product-Bound Complexes of UDP-N-Acetylmuramic Acid:L-Alanine Ligase (MurC) from *Haemophilus influenzae*. *J Bacteriol* 2003; 185: 4152-4162.
20. Deva T, Baker EN, Squirea CJ, Smith CA: Structure of Escherichia coli UDP-N-acetylmuramoyl:L-alanine ligase (MurC). *Acta Crist.*, 2006; 62: 1466-1474.
21. Reck F, Marmor S, Fisher S, Wuonola MA: Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurC. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2001; 11: 1451-1454.
22. Sim MM, Ng BS, Buss AD, Crasta SC, Goh KL, Lee SK: benzylidene Rhodanines as Novel Inhibitors of UDP-N-Acetylmuramat/L-Alanine Ligase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2002; 12: 697-99.
23. Frlan R, Kovač A, Blanot D, Gobec S, Pečar S, Obreza A: design and Synthesis of Novel *N*-Benzylidenesulfonohydrazide Inhibitors of MurC and MurD as Potencial Antibacterial Agents, *Molecules* 2008; 13: 11-30.
24. Antane S, Caufield CE, Hu W, Keeney D, Labthavikul P, Morris K, Naughton SM, Petersen PJ, Rasmussen BA, Singh G, Yang Y: Pulvinones as bacterial cell wall biosynthesis inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2005; 1-5.
25. Li Z, Francisco GD, Hu W, Labthavikul P, Petersen PJ, Severin A, Singh G, Yang Y, Rasmussen BA, Lin Y, Skotnicki JS, Mansour TS: 2-Phenyl-5,6dihydro-2H-thieno[3,2c]pyrazol-3-ol Derivates as New Inhibitors of Bacterial Cell Wall Biosynthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003; 13: 2591-2594.
26. Katz AH, Caufield CE: Structure-Based Design approaches to Cell Wall Biosynthesis Inhibitors. *Current Pharmaceutical Design*, 2003; 9: 857-66.
27. Bertrand JA, Auger G, Martin L, Fanchon E, Blanot D, Le Beller D, von Heijenoort J, Dideberg O: Determination of the MurD Mechanism Through Crystallographic Analysis of Enzyme Complexes. *J. Mol. Biol.*, 1999; 289: 579-590.
28. Gegnas LD, Waddell ST, Chabin RM, Reddy S, Wong KK: Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurD. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 1998; 8: 1643-1648.

29. Horton JR, Bostock JM, Chopra I, Hesse L, Phillips SEV, Adams DJ, Johnson AP, FishWick CWG: Macrocyclic Inhibitors of the Bacterial Cell Wall Biosynthesis Enzyme MurD. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003; 13: 1557-1560.
30. Gordon E, Flourent B, Chantalat L, van Heijenoort J, Mengin-Lecreux D, Dideberg O: Crystal Structure of UDP-N-acetylmuramoyl-L-alanyl-D-glutamate: *meso*-Diaminopimelate Ligase from *Escherichia Coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 2001; 276: 10999-11006.
31. Štrancar K, Boniface A, Blanot D, Gobec S: Phosphinate Inhibitors of UDP-N-Acetylmuramoyl-L-Alanyl-DGlutamate: L-Lysine Ligase (MurE). *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.*, 2007; 340: 127-134.
32. 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.
33. Baldwin JE, Peursson S: Synthesis of d-(L-a-Aminoadipoyl)-L-cysteinyl-D-(O-methyl)-D-allothreonine a Substrate for Isopenicillin-N Synthase and its O-Methyl-D-threonine Epimer. *Tetrahedron*, 1998; 54: 6001-6010.
34. Houen G, Struve C, Friis T: Substrate specificity of the bovine serum amine oxidase and in situ characterisation of aminoaldehydes by NMR spectroscopy. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 2005; 13: 3783-3796.
35. Gowda DC, Abiraj K, Augustine P: New hydrogenation catalyst: An advantageous method for the removal of hydrogenolysable protecting groups in peptide synthesis. *Letters in Peptide Science*, 2002; 9: 43-47.