

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BORUT BRATUŽ

**OPTIMIZACIJA STRUKTURE 2,4-TIAZOLIDINDIONSKIH
INHIBITORJEV LIGAZE MURD**

DIPLOMSKA NALOGA
UNIVERZITETNI ŠTUDIJ FARMACIJE

Ljubljana, 2010

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

BORUT BRATUŽ

**OPTIMIZACIJA STRUKTURE 2,4-TIAZOLIDINDIONSKIH
INHIBITORJEV LIGAZE MURD**

**STRUCTURAL OPTIMIZATION OF 2,4-THIAZOLIDINEDIONE-
BASED INHIBITORS OF MURD LIGASE**

Ljubljana, 2010

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

Zahvala

Ob tej priložnosti bi se rad zahvalil doc. dr. Luciji Peterlin Mašič, mag. farm., za posredovanje strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi diplomskega dela. Še posebej pa bi se rad zahvalil asist. Tihomirju Tomašiću, mag. farm. za strokovno pomoč in podarjeno znanje v laboratoriju.

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

Izjava

Izjavljam, da sem diplomsko delo izdelal sam, pod mentorstvom doc. dr. Lucije Peterlin Mašič, mag. farm.

Borut Bratuž

Ljubljana, 2010

Predsednik komisije: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Član komisije: izr. prof. dr. Odon Planinšek, mag. farm.

VSEBINA

1. UVOD	- 1 -
1.1 PEPTIDOGLIKAN	- 2 -
1.2 LIGAZE MUR	- 4 -
1.2.1 Ligaza MurD	- 6 -
1.2.2 Ligaza MurE	- 6 -
1.3 ZAVIRALCI LIGAZ MUR.....	- 7 -
2 NAČRT DELA	- 12 -
2.1 NAČRTOVANJE POTENCIALNIH INHIBITORJEV LIGAZ MURD IN MURE	- 12 -
2.2 SINTEZNI NAČRT.....	- 15 -
3 MATERIALI IN METODE	- 18 -
4 EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ.....	- 21 -
4.1 REAKCIJSKE SHEME	- 21 -
4.1.1 Reakcijska shema za aciliranje in poskus alkiliranja.....	- 21 -
4.1.2 Reakcijska shema derivatov z zamenjanim heterocikličnim obročem.....	- 22 -
4.1.3 Reakcijska shema derivatov s substuiuiranim benzilnim obročem	- 22 -
4.1.4 Poskus sinteze alkiliranih derivatov prek Weinrebovega amida.....	- 23 -
4.1.5 Poskus sinteze alkiliranih derivatov iz 4-nitrobenzilnega alkohola.....	- 24 -
4.2 PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA ACILIRANIH DERIVATOV IN POSKUS ALKILIRANJA	- 24 -
4.2.1 Sinteza (Z)-5-(4-nitrobenziliden)tiazolidin-2,4-diona (1).....	- 24 -
4.2.2 Sinteza (Z)-5-(4-aminobenziliden)tiazolidin-2,4-diona (2)	- 25 -
4.2.3 Sinteza (R)-1,5-dimetoksi-1,5-dioksopentan-2-aminijevega klorida (3).....	- 26 -
4.2.4 Sinteza (R)-dimetil 2-(3-formilbenzamido)pentandionata (4)	- 26 -
4.2.5 Sinteza (R,Z)-dimetil 2-[3-((4-{(2,4-dioksotiazolidin-5-iliden})metil}fenilamino}metil)benzamido]pentandionata (6).....	- 27 -
4.2.6 Sinteza (R,Z)-dimetil 2-(3-((N-(4-((2,4-dioksotiazolidin-5-iliden})metil)fenil)-3-metoksi-3-oksopropanamido)metil)benzamido)pentandionata (7)	- 28 -
4.2.7 Sinteza (R)-2-[3-((2-karboksi-N-[4-((2,4-dioksotiazolidin-5-iliden})metil]fenil)acetamido)metil]benzamido]pentandiojske kisline (8).....	- 29 -
4.2.8 Sinteza (R,Z)-dimetil 2-(4-[(4-{(2,4-dioksotiazolidin-5-iliden})metil}fenilamino}metil]benzamido)pentandionata (9).....	- 30 -
4.2.9 Sinteza (R,Z)-dimetil 2-(4-[{3-[(2-etoksi-2-oksoetil)-2,4-dioksotiazolidin-5-iliden}metil}fenilamino}metil]benzamido)pentandionata (10).....	- 31 -

Borut Bratuž: Diplomska naloga

4.2.10 <i>Sinteza (R,Z)-2-(4-[{3-[(karboksimetil)-2,4-dioksotiazolidin-5-iliden]metil]fenilamino}metil)benzamido)pentandiojska kisline (11)</i>	- 33 -
4.2.11 <i>Sinteza (R,Z)-dimetil 2-(4-[{N-(4-[{2,4-dioksotiazolidin-5-iliden]metil]fenil)-3-metoksi-3-oksopropanamido}metil] benzamido)pentandionata (12)</i>	- 33 -
4.3 PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA DERIVATOV Z ZAMENJANIM HETEROCIKLIČNIM OBROČEM	- 35 -
4.3.1 <i>Sinteza (Z)-2-imino-5-(4-nitrobenziliden)tiazolidin-4-oná (13)</i>	- 35 -
4.3.2 <i>Sinteza (Z)-5-(4-aminobenziliden)-2-iminotiazolidin-4-oná (14)</i>	- 35 -
4.3.3 <i>Sinteza (R,Z)-dimetil 2-(3-[{4-(2-imino-4-oksotiazolidin-5-iliden)metil]fenilamino}metil)benzamido pentandionata (15)</i>	- 36 -
4.3.4 <i>Sinteza (R,Z)-2-(3-[{4-(2-imino-4-oksotiazolidin-5-iliden)metil]fenilamino}metil)benzamido pentandiojske kisline (16)</i>	- 37 -
4.3.5 <i>Sinteza (Z)-5-(4-nitrobenziliden)imidazolidin-2,4-diona (17)</i>	- 38 -
4.3.6 <i>Sinteza (Z)-5-(4-aminobenziliden)imidazolidin-2,4-diona (18)</i>	- 39 -
4.3.7 <i>Sinteza (R,Z)-dimetil 2-(3-[{4-(2,5-dioksoimidazolidin-4-iliden)metil]fenilamino}metil)benzamido)pentandionata (19)</i>	- 40 -
4.3.8 <i>Sinteza (R,Z)-2-(3-[{4-((2,5-dioksoimidazolidin-4-iliden)metil]fenilamino}metil)benzamido)pentandiojske kisline (20)</i>	- 41 -
4.4 PRIPRAVA IN KARAKTERIZACIJA SPOJIN S SUBSTITUIRANIM BENZILNIM OBROČEM	- 42 -
4.4.1 <i>Poskus sinteze 2-acetoksi-5-formilbenzojske kisline (21)</i>	- 42 -
4.4.2 <i>Sinteza (R,Z)-dimetil 2-(5((-4-((2,4-dioksotiazolidin-5-iliden)metil)fenilamino)metil-2-fluorobenzamido)pentandionata (22)</i>	- 42 -
4.4.3 <i>Sinteza (R,Z)-2-(-5((-4-((2,4-dioksotiazolidin-5-iliden)metil)fenilamino)metil-2-fluorobenzamido)pentandiojske kisline (23)</i>	- 43 -
4.5 POSKUS PRIPRAVE ALKILIRANIH DERIVATOV PREK WEINREBOVEGA AMIDA	- 44 -
4.5.1 <i>Sinteza N-metoksi-N-metil-4-nitrobenzamida (24)</i>	- 44 -
4.5.2 <i>Sinteza 4-nitrobenzojske kisline (25)</i>	- 45 -
4.5.3 <i>Sinteza 4-amino-N-metoksi-N-metilbenzamida (26)</i>	- 45 -
4.5.4 <i>Sinteza etil 2-(4-(metoksi(metil)karbamoil)fenilamino)acetata (27)</i>	- 46 -
4.5.5 <i>Poskus sinteze 4-((2-etoksi-2-oksoetil)(4-(metoksi(metil)karbamoil)fenil)amino)metilbenzojske kisline (28)</i>	- 47 -
4.5.6 <i>Sinteza (R)-dimetil 2-(3-((4-(metoksi(metil)karbamoil)fenilamino)metil)benzamido)pentandionata (29)</i>	- 47 -
4.5.7 <i>Poskus sinteze (R)-dimetil 2-(3-((2-etoksi-2-oksoetil)(4-(metoksi(metil)karbamoil)fenil)amino)metil)benzamido)pentandionata (30)</i>	- 48 -
4.5.8 <i>Sinteza metil 3-(4-(metoksi(metil)karbamoil)fenilamino)-3-oksopropanoata (31)</i>	- 49 -
4.5.9 <i>Poskus sinteze metil 3-(4-formilfenilamino)-3-oksopropanoata (32)</i>	- 50 -
4.6 POSKUS PRIPRAVE ALKILIRANIH DERIVATOV PREK THP ZAŠČITE.....	- 51 -

4.6.1	Sinteza 2-(4-nitrobenziloksi)tetrahidro-2H-pirana (33).....	- 51 -
4.6.2	Poskus sinteze 4-nitrobenzaldehida (34).....	- 51 -
4.6.3	Sinteza 4-((tetrahidro-2H-piran-2-iloksi)metil)anilina (35).....	- 52 -
4.6.4	Sinteza terc-butil 4-formilbenzoata (36)	- 52 -
4.6.5	Sinteza metil 4-formilbenzoata (37).....	- 53 -
4.6.6	Sinteza metil 4-((4-((tetrahidro-2H-piran-2-iloksi)metil)fenilamino)metil)benzoata (38)	- 54 -
4.6.7	Poskus sinteze metil 4-((2-(benziloksi)-2-oksoetil)(4-((tetrahidro-2H-piran-2-iloksi)metil)fenil)amino)metilbenzoata (39).....	- 55 -
4.6.8	Poskus sinteze benzil 2-(4-((tetrahidro-2H-piran-2-iloksi)metil)fenilamino)acetata (40)	- 56 -
5	RAZPRAVA	- 57 -
5.1	RAZPRAVA O SINTEZAH	- 57 -
5.1.1	Knoevenaglova kondenzacija	- 57 -
5.1.2	Redukcija nitro skupine.....	- 58 -
5.1.3	Reduktivno aminiranje	- 58 -
5.1.4	Aciliranje	- 60 -
5.1.5	Alkiliranje	- 61 -
5.1.6	Alkalna hidroliza	- 62 -
5.1.7	Tvorba estra	- 62 -
5.1.8	Tvorba amidne vezi.....	- 64 -
5.1.9	Sinteza Weinrebovega amida in njegova odščita.....	- 64 -
5.1.10	Tvorba in poskus odščite tetrahidropiranilne skupine.....	- 65 -
5.2	REZULTATI BIOLOŠKEGA TESTIRANJA Z RAZPRAVO	- 67 -
6	SKLEP	- 75 -
7	LITERATURA	- 76 -

POVZETEK

Vse pogosteje se pojavljajo sevi bakterij, rezistentni na večino protimikrobnih učinkovin, zato je nujen razvoj novih protimikrobnih učinkovin, ki bi delovale na nove tarče. Peptidoglikan je nujen za sintezo bakterijske celične stene, ki vzdržuje stalno obliko in osmotski tlak bakterije ter jo brani pred škodljivimi vplivi iz okolja. Biosintezo peptidoglikana kot tarčo že izkoriščajo β -laktami, cefalosporini in glikopeptidni antibiotiki. V zgodnjih stopnjah izgradnje peptidoglikana pa sodelujejo tudi encimi iz družine ligaz Mur. Z inhibicijo oziroma oviranjem sinteze peptidoglikana pride do nepravilnosti v izgradnji celične stene, ki je zato manj odporna proti zunanjim vplivom, kar povzroči lizo bakterije.

Pri strukturno podprttem načrtovanju smo izhajali iz 5-benzilidentiazolidin-2,4-dionskega inhibitorja ligaze MurD, ki so ga sintetizirali Tomašič in sodelavci na Fakulteti za farmacijo ter mu skušali z različnimi modifikacijami (ovedbo dodatne alkilne oziroma acilne skupine na dušikov atom, uvedbo substituent na benzilni obroč, bioizosterno zamenjavo heterocikličnega obroča) izboljšati inhibitorno aktivnost.

Sintetizirali smo 4 nove spojine, od katerih je spojina **8** ((*R,Z*)-2-[3-{(2-karboksi-N-[4-((2,4-dioksotiazolidin-5-iliden)metil}fenil]acetamido)metil}benzamido]pentandiojska kislina) z dodatnim malonilnim fragmentom izkazala odlično inhibitorno aktivnost z IC₅₀ vrednostjo 15 μ M pri testiranju na izoliranem encimu MurD. Spojina **8** je tudi najmočnejši inhibitor ligaze MurD v seriji 5-benzilidentiazolidin-2,4-dionskih inhibitorjev, ki so jih sintetizirali na Fakulteti za farmacijo.

Z dobljenimi rezultati smo potrdili uspešnost načrtovanja spojin in dajejo iztočnice za sintezo novih alkiliranih in aciliranih derivatov, s katerimi bi bolje preučili odnos med strukturo in delovanjem 5-benzilidentiazolidin-2,4-dionskih inhibitorjev ligaze MurD.

ABSTRACT

Multi-drug resistant bacteria are getting more common, therefore the search for the novel antimicrobial agents, acting on different targets as compared to known drugs, represents a great need. Peptidoglycan is necessary for the synthesis of bacterial cell wall, which regulates the shape and osmotic pressure of bacteria and protects them from various environmental factors. β -lactams, cephalosporins and glycopeptide antibiotics already use the peptidoglycan biosynthesis as their target. The family of Mur ligase enzymes (MurC to MurF) is involved in the early stages of peptidoglycan biosynthesis. Consequently, the inhibition of these enzymes leads to improper building of the cell-wall structure, which becomes less resistant to environmental factors and may cause bacterial cell lysis.

The aim of our work was to optimize known 5-benzylidenethiazolidine-2,4-dione inhibitor of MurD ligase, synthesised by Tomašić et al. on the Faculty of Pharmacy, with several structure-based modifications (introduction of an alkyl or an acyl group on the nitrogen atom, substitution of the benzyl ring or bioisosteric replacement of the heterocyclic moiety).

We synthesised 4 new compounds, of which the compound **8** ((*R,Z*)-2-[3-((2-carboxy-N-[4-((2,4-dioxothiazolidine-5-ilydene)methyl}phenyl]acetamido)methyl]benzamido]pentandioic acid) with additional malonyl fragment on the nitrogen atom was the most potent with IC₅₀ value of 15 μ M tested on isolated MurD enzyme. Compound **8** is also the most potent inhibitor of MurD ligase in the series of 5-benzylidenethiazolidine-2,4-dione MurD inhibitors, synthesised on the Faculty of Pharmacy.

The given results confirm successful structure-based design of compounds and also give an excellent starting point for the synthesis of new alkylated or acylated derivatives to give further insight into the structure-activity relationship of 5-benzylidenethiazolidine-2,4-dione-based inhibitors of MurD ligase.

SEZNAM OKRAJŠAV

δ	kemijski premik
ADP	adenozindifosfat
Ar	aromatski
ATP	adenozintrifosfat
d	dublet
dd	dublet dubleta
DIBAL	diizobutilaluminijev hidrid
DMAP	dimetilaminopiridin
DMF	N,N-dimetil formamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EI	elektronska ionizacija
ESI	elektrosprej ionizacija
FAD	flavin-adenin-dinukleotid
G -	po Gramu negativen
G +	po Gramu pozitiven
GlcNAc	N-acetylglukozamin
GlmU	N-acetylglukozamin-1-fosfat- uridiltransferaza
HOBr	1-hidroksibenzotriazol
IC₅₀	koncentracija inhibitorja, ki zmanjša aktivnost encima za polovico
IR	infrardeča spektroskopija
J	sklopitvena konstanta
Lipid I	MurNAc-(pentapeptid) pirofosforil undekaprenol
Lipid II	GlcNAc-MurNAc-(pentapeptid)-pirofosforil undekaprenol
M	molarnost (mol/L)
m	multiplet

mezo-A2pm	mezo-diaminopimelinska kislina
MF	mobilna faza
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MraY	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-pentapeptid fosfotransferaza
MS	masna spektrometrija
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruviltransferaza
MurB	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat-alanin ligaza
MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat- <i>mezo</i> -diaminopimelat ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat- <i>mezo</i> diaminopimelat- D-Alanin-D-Alanin ligaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NADP+	nikotinamid-adenin-dinukleotid fosfat
NMR	jedrska magnetna resonanca
PEP	fosfoenolpiruvat
q	kvartet
R_f	retencijski faktor
s	singlet
SF	stacionarna faza
t	triplet
TBTU	N,N,N',N'-tetrametil-O-(benzotriazol-1-il)-uronijev tetrafluoroborat
THF	tetrahidrofuran
TPK	tankoplastna kromatografija
TMS	tetrametilsilan
UDP	uridindifosfat
UMA	UDP- <i>N</i> -acetil-muramoil-L-alanin
UMAG	UDP- <i>N</i> -acetil-muramoil-L-alanin-D-glutaminska kislina

1. UVOD

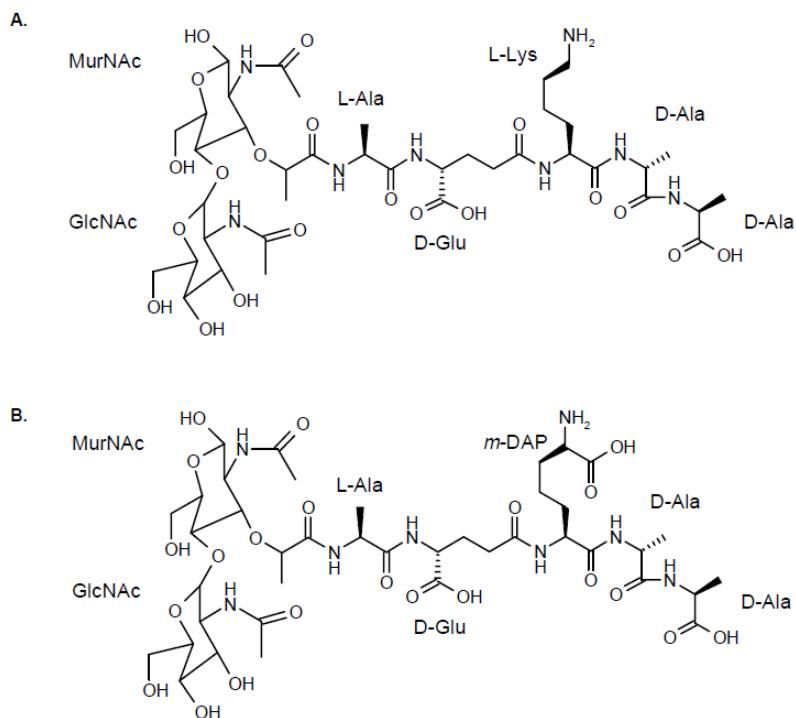
Protibakterijske učinkovine že več kot 50 let uspešno zmanjšujejo smrtnost in obolenost zaradi bakterijskih infekcij ter zato veljajo za zelo učinkovita zdravila. Sčasoma se je zaradi nepravilnega predpisovanja protibakterijskih učinkovin, njihovega nepravilnega jemanja s strani pacientov, jemanja v profilaktične namene in njihove uporabe v neterapevtske namene pri živalih začela razvijati odpornost mikrobov na protibakterijske učinkovine. S konstantnim protibakterijskim zdravljenjem izvajamo na bakterije selekcijski pritisk, ki pospešuje razrast rezistentnih sevov. Kratek generacijski čas in spremembe, ki lahko nastanejo v bakterijskem genomu zaradi mutacij ali z medsebojno izmenjavo plazmidov med bakterijami, omogočajo izredno hitro izražanje nastalih sprememb. V zadnjih letih se zato srečujemo z bakterijami, ki so odporne proti več protimikrobnim učinkovinam, poleg tega pa so bakterije tekom evolucije sprejele gene, ki povečajo njihovo virulentnost. Stanje dodatno poslabša še dejstvo, da se je pri večini farmacevtskih podjetij ustavil ali pa vsaj močno okrnil razvoj novih potencialnih protimikrobnih učinkovin. (1)

Hitrost, s katero bakterije razvijajo in razširjajo odpornost na protibakterijske učinkovine, postaja velik problem. Zato je potreba po razvoju novih strategij na področju terapije bakterijskih infekcij in s tem iskanje novih protimikrobnih učinkovin, ki delujejo na nove tarče, vedno večja. Ključna lastnost protibakterijske učinkovine je selektivna toksičnost, zato se raziskovalci pri identifikaciji novih potencialnih tarč osredotočajo na bistvene razlike med človeško in bakterijsko celico. Ena od najpomembnejših razlik je bakterijska celična stena, ki je človeške celice nimajo(2).

Peptidoglikan je pomemben gradnik celične stene tako pri Gram-pozitivnih (G+) kot pri Gram-negativnih (G-) bakterijah. Zunajcelične stopnje biosinteze peptidoglikana kot tarče so praktično že izčrpane, saj nanje delujejo tako β -laktamski kot tudi glikopeptidni antibiotiki. V znotrajceličnih stopnjah pa biosintezo peptidoglikana vršijo encimi iz družine ligaz Mur, ki so prav tako specifični za bakterijske celice in so zato postali pomembne tarče v razvoju novih potencialnih protimikrobnih učinkovin. (2)

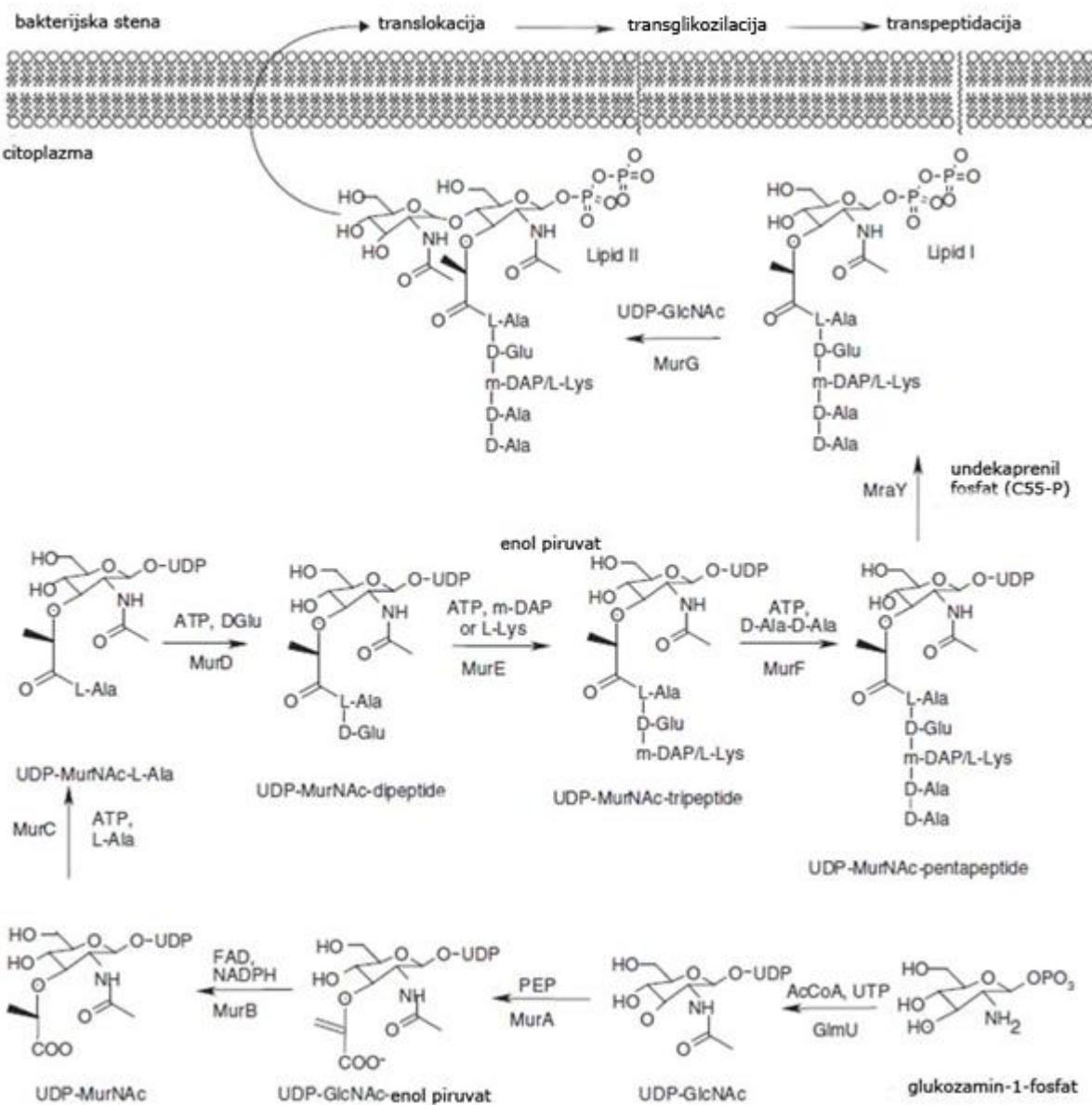
1.1 Peptidoglikan

Peptidoglikan je glavna komponenta celične stene v skoraj vseh evbakterijah. Njegova glavna funkcija je zagotavljanje mehanske trdnosti bakterijske celice, brez katere bi celična stena počila zaradi osmotskega tlaka. Odgovoren je tudi za vzdrževanje definirane oblike celice in sodeluje pri celični rasti in delitvi. Po sestavi je kompleksen heteropolimer, sestavljen iz dolgih polisaharidnih verig, ki so premrežene s krajsimi peptidi. Polisaharidna veriga sestoji iz izmenjujočih se enot *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kislino (MurNAc), povezanih z 1,4- β glikozidno vezjo. Vsaka enota MurNAc pa je na D-laktoilni skupini substituirana z verigo aminokislin. Peptidna veriga je sestavljena iz L-alanina (L-Ala), D-glutaminske kislino (D-Glu), diaminokisline ter dveh D-alaninov (D-Ala-D-Ala). Pri G+ bakterijah na mestu diaminokisline prevladuje *mezo*-diaminopimelinska kislina (*m*DAP), pri G- bakterijah pa L-lizin (L-Lys) (Slika 1). Aminski ostanek na teh dveh aminokislinah sodeluje pri premreženju v strukturi peptidoglikana z D-Ala na četrtem mestu v verigi bodisi direktno bodisi s krajšo vmesno polipeptidno verigo. (2,3)



Slika 1: Struktura peptidoglikana v Gram pozitivnih (A) in Gram negativnih (B) bakterijah.

Biosinteza peptidoglikana je kompleksen proces, ki poteka v dveh stopnjah (Slika 2). V prvi stopnji poteka sinteza prekurzorjev z encimi, ki so prisotni v citoplazmi ali na notranji strani citoplazemske membrane. Končni produkt prve stopnje je lipidni intermedijat, ki se prenese preko citoplazemske membrane. V drugi stopnji pa poteka polimerizacija s pomočjo glikoziltransferaz, ki katalizirajo tvorbo polisaharidne verige, in transpeptidaz, ki katalizirajo tvorbo peptidnih mostičkov med verigami in pripajanje na že obstoječo celično steno. (4)



Slika 2: Biosinteza enote peptidoglikana (prirejeno po 2).

Monomerne enote nastanejo v specifičnem linearinem zaporedju encimskih reakcij. Najprej se iz fruktoze-6-fosfata v 4 stopnjah sintetizira uridin difosfat *N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc). Ta se nato s pomočjo encimov MurA in MurB pretvori v uridin difosfat *N*-acetilmuraminsko kislino (UDP-MurNAc). MurA katalizira prenos enolpiruvata iz fosfoenolpiruvata (PEP) na 3'-hidroksilno skupino UDP-GlcNAc, čemur sledi redukcija enolpiruvata do laktata, ki poteče s pomočjo MurB. V naslednjih 4 stopnjah se nato s pomočjo od ATP odvisnih aminokislinskih ligaz (MurC, MurD, MurE in MurF) postopoma pripne veriga petih aminokislin (*L*-Ala-*D*-Glu-*mDAP(L-Lys)*-*D*-Ala-*D*-Ala). (2,3)

Tvorba lipidnih intermediatov nato poteka z encimi, ki so prisotni na notranji strani citoplazemske membrane. V prvem koraku encim transferaza MraY katalizira prenos fosfo-MurNAc-pentapeptidnega dela UDP-MurNAc-pentapeptida na membranski akceptor undekaprenil fosfat, pri čemer nastane lipid I (MurNAc-(pentapeptid)-pirofosforil undekaprenol). Nato encim MurG na lipid I pripne še *N*-acetilglukozaminski del, pri čemer nastane lipid II (GlcNAc-MurNAc-(pentapeptid)-pirofosforil undekaprenol). Po prenosu na zunanjo stran citoplazemske membrane se lipid II uporabi kot substrat v nadalnjih reakcijah polimerizacije. (4)

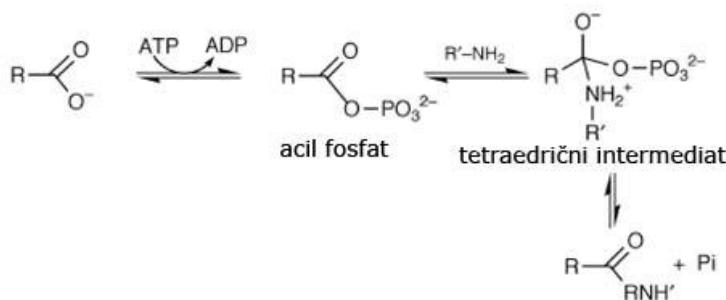
Končne stopnje sinteze peptidoglikana vključujejo zaporedje reakcij transglykobilacije in transpeptidacije. Pri transglykobilaciji se na že obstoječi peptidoglikan pripne lipid II, pri čemer nastane daljša polisaharidna veriga. Pri reakciji transpeptidacije pa pride do prečnega premreženja med peptidnimi verigami. Prva stopnja v tej reakciji je cepitev peptidne vezi *D*-Ala-*D*-Ala, ki poteče s pomočjo serina, ki se nahaja v aktivnem mestu encima. Nastane aktiviran acilni intermediat, ki reagira z donorjem aminske skupine druge peptidne verige (*mDAP* ali *L-Lys*) ali pa s pentaglicinskim mostom. Večina encimov, ki sodeluje v teh reakcijah, spada v družino proteinov, ki vežejo penicilin (penicilin binding proteins PBP) in predstavljajo tarčo za β -laktamske antibiotike.

1.2 Ligaze Mur

Ligaze Mur (MurC, D, E in F) so encimi, ki v zaporednih stopnjah sintetizirajo peptidno verigo peptidoglikana. Gre za pripenjanje *L*-Ala (MurC), *D*-Glu (MurD), diamino kisline *mDAP* ali *L-Lys* (MurE) in dipeptida *D*-Ala-*D*-Ala (MurF) na laktoilno skupino UDP-MurNAc. Ligaze Mur katalizirajo tvorbo amidne vezi s pomočjo ATP. Za reakcijo je nujno potreben

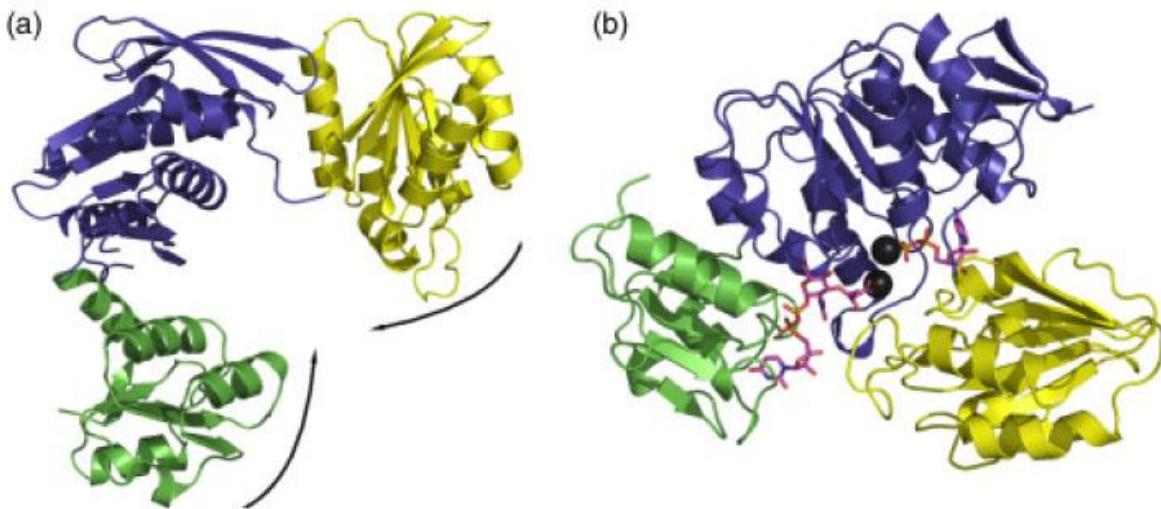
tudi dvovalentni kation (Mg^{2+} ali Mn^{2+}). Ugotovili so, da so si encimi podobni po naslednjih značilnostih:

- Vse ligaze Mur imajo enak reakcijski mehanizem, ki sestoji iz aktivacije karboksilne skupine UDP prekurzorja z molekulo ATP. Tako nastaneta acil fosfatni intermediat in ADP. Nastali acil fosfat nato nukleofilno napade aminska skupina pripenjajoče se aminokisline (oz. dipeptida v primeru MurF), pri čemer nastane visoko energijski tetraedrični intermediat, iz katerega po eliminaciji fosfata nastane peptidna vez.



Slika 3: Reakcijski mehanizem ligaz Mur (4).

- V svojem aminokislinskem zaporedju imajo še 6 nevariabilnih aminokislinskih ostankov poleg zaporedja, ki kodira za vezavno mesto za ATP. V kristalografskih študijah so ugotovili, da imajo encimi enako 3D strukturo, sestavljeno iz 3 domen. N-terminalna domena je odgovorna za vezavo UDP-prekurzorja, centralna domena veže ATP, C-terminalna domena pa veže pripenjajoče se aminokislino oziroma dipeptid. Centralna in C-terminalna domena sta si pri vseh encimih Mur zelo podobni, medtem ko sta si podobni N-terminalni domeni MurC in MurD ter MurE in MurF. Razlike so nastale zaradi različne dolžine UDP prekurzorjev. Vsak encim obstaja tudi v odprtih in zaprtih oblikah. Prehod v zaprto obliko povzroči vezava liganda. ATP se veže kot prvi, pri čemer pride do konformacijske spremembe (odprta v zaprto), temu sledi vezava UDP prekurzorja in nazadnje še pripenjajoče se aminokisline oziroma dipeptida (Slika 4).(3)



Slika 4: 3D struktura encimov MurC (a) v odprti obliki in encima MurD (b) v kompleksu z UDP-MurNAc-L-Ala, ADP in Mg²⁺.

1.2.1 Ligaza MurD

MurD katalizira pripenjanje druge aminokisline na karboksilno skupino L-Ala in je zelo specifičen encim, saj je substrat zanjo vedno D-Glu, ne glede na vrsto bakterije. (6) Raziskovalcem je uspelo izolirati in očistiti encim iz več vrst bakterij, največ raziskav pa so naredili na encimu, izoliranemu iz bakterije *Escherichia coli*. Ugotovili so, da je encim stereospecifičen, saj L-Glu ni substrat za encim, prav tako pa so spojine, sorodne D-Glu slabi substrati za ta encim.(3) Na podoben način so preučili tudi specifičnost MurD za UDP prekurzorski del (UMA). Ugotovili so, da specifičnost ni tako visoka kot za vezavo aminokisline, saj se je kot substrat vezal tudi fosfo-MurNAc-L-Ala. (4) MurD potrebuje za delovanje dva magnezijeva iona, pri čemer eden sodeluje pri vezavi ATP, drugi pa pri nastanku acil fosfata (3).

1.2.2 Ligaza MurE

Ligaza MurE pripenja tretjo aminokislino na UDP prekurzor. Večinoma je to mDAP pri G-bakterijah ter L-Lys pri G+ bakterijah. Pri nekaterih vrstah bakterij pa se kot substrat pojavljajo še druge diaminokisline (L-ornitin, L-2,4-diaminobutirna kislina, D-Lys) ali monoaminokisline (L-homoserin, L-Ala, L-Glu). (6) Kljub temu je encim MurE znotraj vrste bakterij visoko

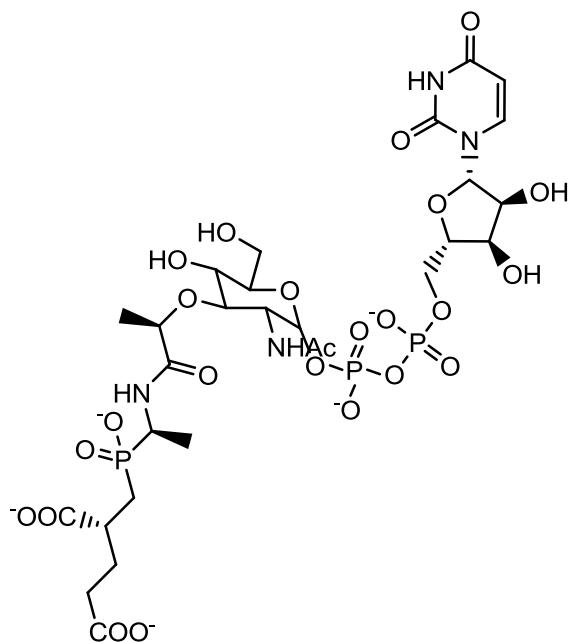
specifičen za določeno aminokislino, saj vezava L-Lys v *E. coli* povzroči lizo celice. (3) MurE je tudi visoko specifičen za vezavo UMAG substrata, saj se njegovi strukturni analogi niso vezali na mesto substrata, le redki pa so imeli inhibitorno aktivnost. (4)

1.3 Zaviralci ligaz Mur

Ker so si encimi MurC, D, E in F podobni po strukturi, vezavnem mestu in kinetičnem mehanizmu, je možno doseči inhibicijo večih encimov hkrati z eno samo molekulo, kar bi lahko znatno povečalo protibakterijsko aktivnost. Dodatno pa bi bil pojav rezistence do takega inhibitorja precej zmanjšan, saj bi se mutacija morala pojavit na več kot enim tarčnem genu hkrati (7).

Fosfinatni inhibitorji, derivati fosfinske kisline, so najmočnejši inhibitorji aminokislinskih ligaz. Z rentgensko difrakcijsko analizo so dokazali, da primerno substituirani derivati fosfinske kisline inhibirajo encim tako, da se γ -fosfat iz molekule ATP veže na inhibitor, tako da nastaneta ADP in fosforiliran inhibitor. Poleg tega pa nastali fosforilirani fosfinat oponaša tetraedrični intermediat, ki drugače nastane pri encimski reakciji, ki jo katalizirajo ligaze Mur. Zaradi te podobnosti s substratom pa se tudi močno veže v aktivno mesto encima. (7)

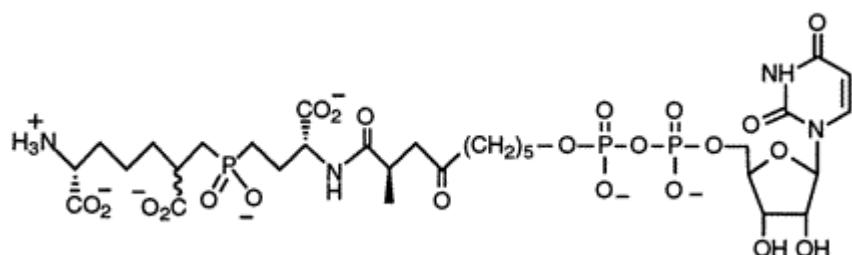
Prve fosfinatne inhibitorje so sintetizirali Tanner in sodelavci. Strukture so zelo oponašale reakcijski intermediat, saj so vsebovale UDP skupino, za inhibitorno aktivnost pa je bila glavna fosfinska kislina s tetraedrično geometrijo na mestu, kjer bi se tvorila amidna vez. Fosfinska kislina se nato encimsko fosforilira in s tem oponaša tetraedrični intermediat. (8,7) Gegnas in sodelavci pa so inhibitorje tega tipa še bolj približali UDP prekurzorju, saj so v inhibitor vgradili še N-acetyl muraminsko kislino. Tako so dobili zelo močan inhibitor ligaze MurD z IC_{50} 1 nM, kar je bilo za približno 3 velikostne rede močnejše od Tannerjevih inhibitorjev. (Slika 5) (9)



Slika 5: Fosfinatni inhibitor, ki ga je sintetiziral Tanner (9).

Štrancar in sodelavci so poskušali znane fosfinatne inhibitorje poenostaviti. Izhajali so iz molekule, ki je bila brez uridin monofosfata. Peptidni del, vmesni linker in fosfosladkorni del so poskušali zamenjati z ustreznim substituentom. Ugotovili so, da lahko fosfosladkorni del nadomestijo z aromatskim obročem, ki pa mora ohraniti možnost tvorbe interakcij z istim delom v aktivnem mestu encima. Kot distančnik se je najbolj izkazal ustrezeno substituiran sulfonamidni fragment. Če pa so metilno skupino v fosfinoalaninskem delu zamenjali z večjim fragmentom, se je jakost zmanjšala. (10)

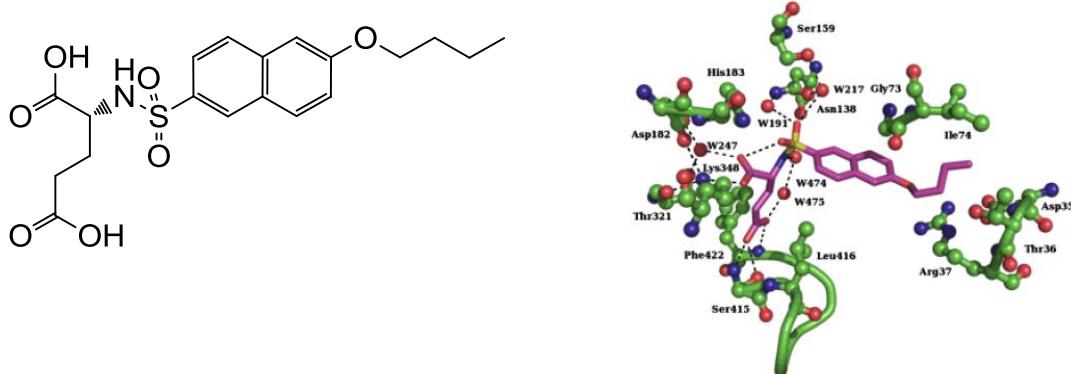
Fosfinatne inhibitorje so poskušali razviti tudi za encim MurE. Zeng in sodelavci so sintetizirali inhibitor na osnovi Tannerjevega inhibitorja MurD (Slika 6). Na splošno velja, da so se kot najbolj aktivni inhibitorji izkazale tiste molekule, ki so najbolj učinkovito posnemale substrat za MurE ter se tako obnašale kot kompetitivni inhibitorji. (7)



Slika 6: Fosfinatni inhibitor ligaze MurE, ki so ga razvili Zeng in sodelavci.

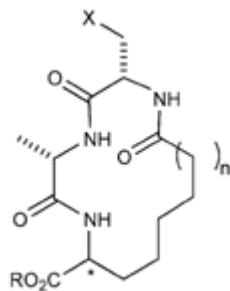
Kljub močni inhibiciji ligaz MurD in MurE, do sedaj še noben fosfinat ni izkazal protimikrobnne aktivnosti, kar je lahko posledica neučinkovitega prehajanja molekul v citoplazmo in s tem nezmožnost doseganja dovolj visokih koncentracij, ki bi imele inhibitoren učinek. Vzrok za takšen izid je najverjetneje v odsotnosti aktivnih transporterjev, ki bi omogočili prehod preko membrane in v prisotnosti močno polarnih fragmentov v spojinah (fosfinatna skupina). V potencialnih novih inhibitorjih bi torej morali polarne fragmente poenostaviti in jih nadomestiti z bolj hidrofobnimi, da bi izboljšali prehajanje v bakterijsko celico. (7)

Pomemben napredek pri načrtovanju sinteze novih inhibitorjev ligaz Mur je bila določitev kristalne strukture encima MurD brez substrata in z UMA substratom. (11) Kasneje so določili še kristalne strukture tega encima v kompleksu z UMA substratom, ADP in Mg²⁺ ali Mn²⁺, ter kompleks MurD z njegovim produkтом UMAG. (12) Pomembna pa je bil tudi določitev kompleksa MurD z inhibitorjem N-sulfonil-D-Glu (Slika 7) in N-sulfonil-L-Glu.(3)



Slika 7: Vezavno mesto za N-sulfonil-D-Glu tip inhibitorja in njegova struktura (levo) v aktivnem mestu encima MurD.

Horton s sodelavci je *de novo* načrtoval nove inhibitorje ligaze MurD s pomočjo analize aktivnega mesta. Ugotovil je, da je v vezavnem mestu prisoten hidrofobni žep, ki ga naravni substrat ne zasede pri vezavi. Pri nadaljnji analizi so ugotovili, da se jakost vezave inhibitorja poveča, če ima ta prisotno hidrofobno verigo. Izkazalo se je, da je najbolj ugodno, če se ta veriga poveže z L-alaninskim delom, tako da nastane makrociklični obroč. Tako je nastal nov makrociklični tip inhibitorjev MurD z IC₅₀ med 1 in 10 μM.(Slika 8) (13)



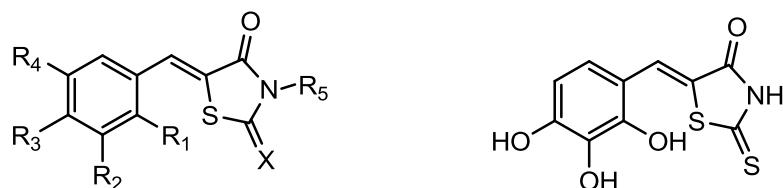
Slika 8: Makrociklični inhibitor, ki ga je sintetiziral Horton.

V zadnjem času na Katedri za farmacevtsko kemijo poskušajo s sintezo novih tipov inhibitorjev ligaz Mur s spodbudnimi rezultati. Ker so kristalne strukture encimov v kompleksu z njihovimi substrati, produkti in inhibitorji znane, je to omogočilo razvoj novih inhibitorjev na osnovi strukture encima s pomočjo virtualnega rešetanja knjižnice spojin (14). Tomašić in ostali so poskušali sintetizirati nove inhibitorje, ki bi delovali na več ligaz Mur hkrati, kar bi bilo lahko terapevtsko veliko bolj ugodno. Ker imajo ligaze Mur (MurC-F) enak katalitični mehanizem in podobno zgradbo aktivnega mesta, so sklepali, da bi lahko vse ligaze Mur inhibirali z eno samo spojino. Inhibicija večih ligaz Mur hkrati se lahko doseže na sledeče načine:

- z ATP kompetitivnim inhibitorjem
- z inhibitorjem, ki bi oponašal UDP-MurNAc del UDP substrata
- z vezavo na alosterično mesto encima, ki je skupno vsem štirim ligazam Mur (14)

Ker so rodanini in njihovi derivati znane spojine s protibakterijskim delovanjem ter se nasprostno pojavljajo kot del skeleta različnih vrst farmakološko aktivnih spojin(15), so se osredotočili na sintezo inhibitorjev na osnovi tega heterocikla. Rodaninski obroč je že bil uporabljen kot mimetik difosfata ali fosfata, zato je primeren za načrtovanje sinteze potencialnih inhibitorjev ligaz Mur. (14)

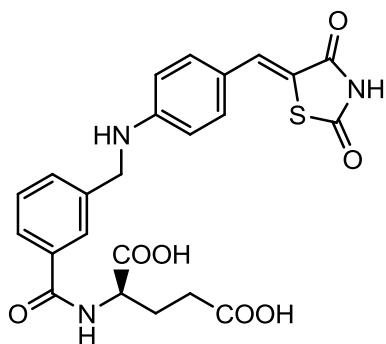
Prvi tip spojin je temeljil na 5-benzilidentiazolidin-4-onskem skeletu, ki bi se glede na možnost tvorbe vodikovih vezi lahko vezal tako v ATP kot v UDP vezavni žep encima, kar bi lahko doprineslo k inhibiciji večih ligaz Mur hkrati. Z dodatno uvedbo hidroksilnih skupin na benzilidenski obroč so želeli povečati možnost tvorbe vodikovih vezi v aktivnem mestu encima. Sintetizirali so več spojin s splošno struktурno formulo (Slika 9) najboljše rezultate pa je dajala spojina I, ki je inhibirala MurD, MurE in MurF z IC₅₀ vrednostmi med 2 in 6 µM.



Slika 9: Splošna strukturna formula 5-benzilidene-1,3-dihydro-2H-thiazolidin-4-onskih inhibitorjev ($X=O, S$; $R_1, R_2, R_3, R_4=H, OH$; $R_5=CH_2COOH$) in Spojina **I** (desno).

Ugotovili so, da imajo najboljšo aktivnost spojine, ki vsebujejo trihidroksi substituiran benzilidenski obroč. Zamenjava rodanina s tiazolidin-2,4-dionom in rodanin-N-ocetno kislino ($R^5=CH_2COOH$) je zmanjšala inhibicijo MurD, delno pa se je ohranila aktivnost na MurE in MurF. (14)

Drugi tip inhibitorjev ligaze MurD Tomašiča in ostalih pa temelji na D-glutaminski kislini, kar je posledica visoke specifičnosti ligaze MurD za D-Glu. S pomočjo virtualnega rešetanja so različne spojine sidrali v kristalno strukturo encima MurD iz *E. coli*. Na osnovi najboljše rangiranih spojin virtualnega rešetanja so najprej poskušali s kinazolinskimi derivati ter derivati folne kisline, ki pa niso izkazovali bistvene inhibicije. Kljub temu so s sidranjem teh šibkih inhibitorjev ugotovili, da se pirimidinski obroč kinazolina veže v področje difosfatne skupine UDP, zato so se odločili, da bodo kinazolinski obroč zamenjali z mimetiki fosfata, kot sta rodanin in tiazolidin-2,4-dion. Prišli so do spojine **II** (Slika 10), ki ima IC₅₀, merjeno z radiaktivnim testom, na ligazi MurD 35 μM, pri klasičnem spektrofotometričnem testu pa je IC₅₀ spojine **II** 85 μM. (16)

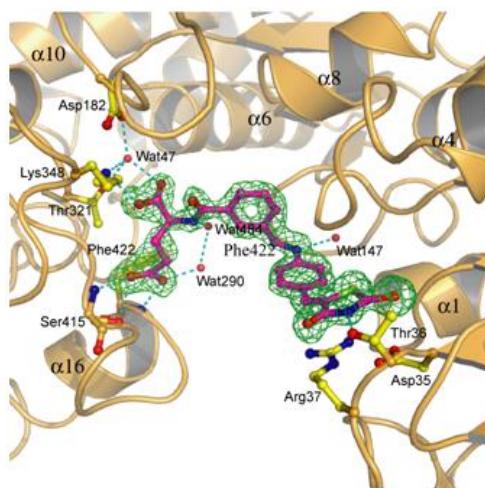


Slika 10: Spojina **II**.

2 NAČRT DELA

2.1 Načrtovanje potencialnih inhibitorjev ligaz MurD in MurE

V eksperimentalnem delu diplomske naloge želimo s strukturno podprtим načrtovanjem pripraviti nove potencialne inhibitorje ligaze MurD, ki sodeluje pri znotrajceličnih stopnjah biosinteze peptidoglikana, na osnovi spojine **II** (Slika 11). S pomočjo literaturnih podatkov o zgradbi aktivnega mesta teh encimov, struktur znanih inhibitorjev, strukture produkta MurD UMAG ter sidranja načrtovanih spojin s potencialno inhibitorno aktivnostjo bomo poskušali sintetizirati spojine, ki bodo izkazovale izboljšano inhibicijo ligaz Mur napram znanim spojinam.

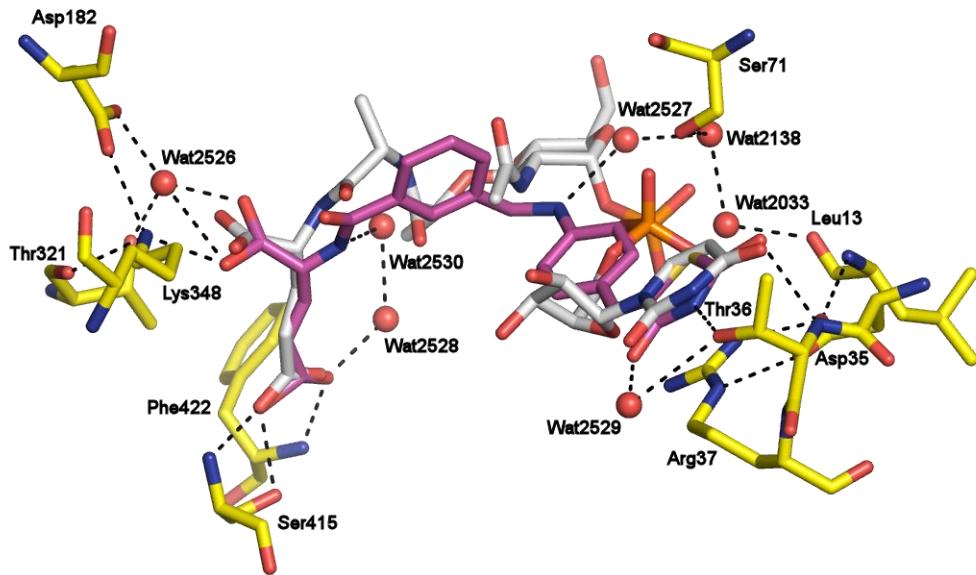


Slika 11: Položaj spojine **II** v aktivnem mestu encima MurD.

Ligaza MurD tvori peptidno vez med D-Glu in molekulo UMA. Z načrtovanimi spojinami želimo posnemati UMAG (Slika 12), ki nastane kot produkt encimske reakcije ligaze MurD, hkrati pa je tudi substrat za ligazo MurE, zato upamo, da bodo spojine inhibitorno delovale na oba encima.

S kristalno strukturo kompleksa MurD-inhibitor so pokazali, da se rodaninski oz. tiazolidin-2,4-dionski obroč veže na mesto uracilnega obroča UMAG, del z D-Glu v inhibitorju pa tvori enake interakcije kot D-Glu pri produktu encima. Vmesni del z dvema fenilnima obročema in amino skupino, ki služi kot distančnik med omenjenima skupinama ter tvori eno vodikovo vez

z encimom preko mreže molekul vode, bomo poskušali optimizirati z uvedbo skupin, ki bi tvorile dodatne vodikove ali ionske interakcije z encimom.



Slika 12: Superpozicija spojine II (vijolična) in UMAG (siv) v aktivnem mestu MurD.

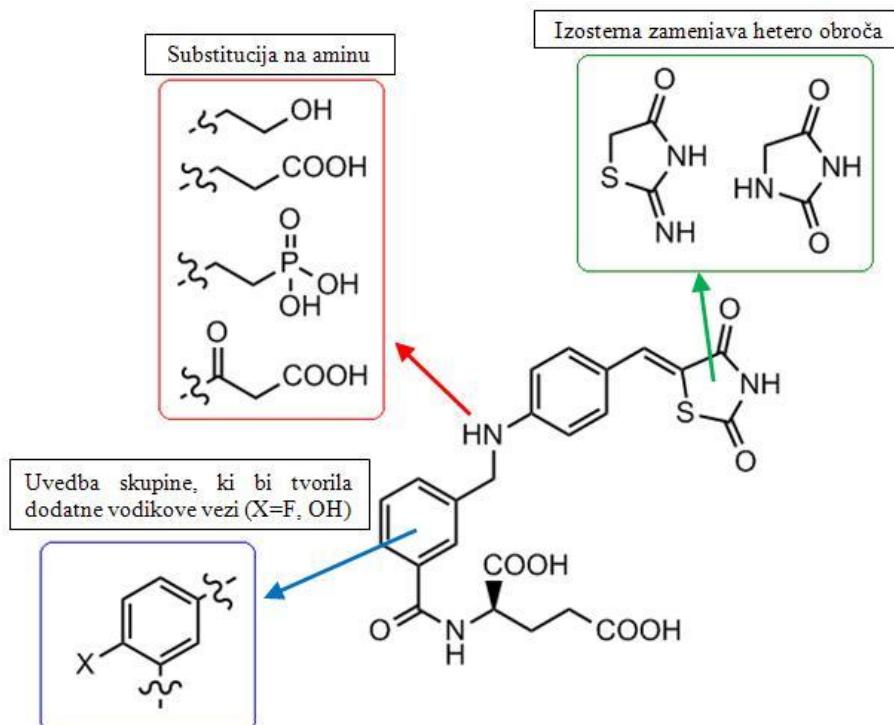
Tomašić in sodelavci so sintetizirali različne inhibitorje na osnovi glutaminske kisline, s katerimi so ugotovili tudi določeno povezavo med strukturo in delovanjem teh spojin. Za inhibitorno delovanje je nujno potrebna glutaminska kislina ter heterociklični obroč, ki nadomesti uracilni del UMAG-a (rodanin, tiazolidin-2,4-dion), kar se lepo vidi pri superpoziciji inhibitorja z UMAG (Slika 12). Spojine z rodaninskim obročem imajo sicer boljšo inhibitorno konstanto kot spojine s tiazolidin-2,4-dionskim obročem, vseeno pa so konstante primerljive. Nujna za delovanje je tudi dvojna vez med hetero obročem ter benzilnim obročem, saj redukcija eksociklične dvojne vezi močno zmanjša inhibitorno aktivnost (24). Poskušali so zamenjati tudi benzilaminski del z alkilnimi verigami, vendar je to vodilo do zmanjšane aktivnosti. Pri obeh spremembah je šibkejša aktivnost najverjetneje posledica večje fleksibilnosti molekule, pri reduciranih derivatih pa ima vpliv tudi izguba konjugacije med obročema. Poskušali so tudi z različnimi substitucijami na aromatskih obročih, vendar se je izkazalo, da imajo najboljše aktivnosti spojine, ki so *para* substituirane

na benzilidenskem obroču ter *meta* substituirane na obroču s pripeto D-glutaminsko kislino.

(17)

V okviru diplomske naloge bomo poskušali dodatno raziskati odnos med strukturo in delovanjem inhibitorjev, ki temeljijo na glutaminski kislini. Načrtovane spojine bodo temeljile na inhibitorju **II**, ki so ga sintetizirali Tomašič in sodelavci in ima IC_{50} 85 μM (Slika 10).

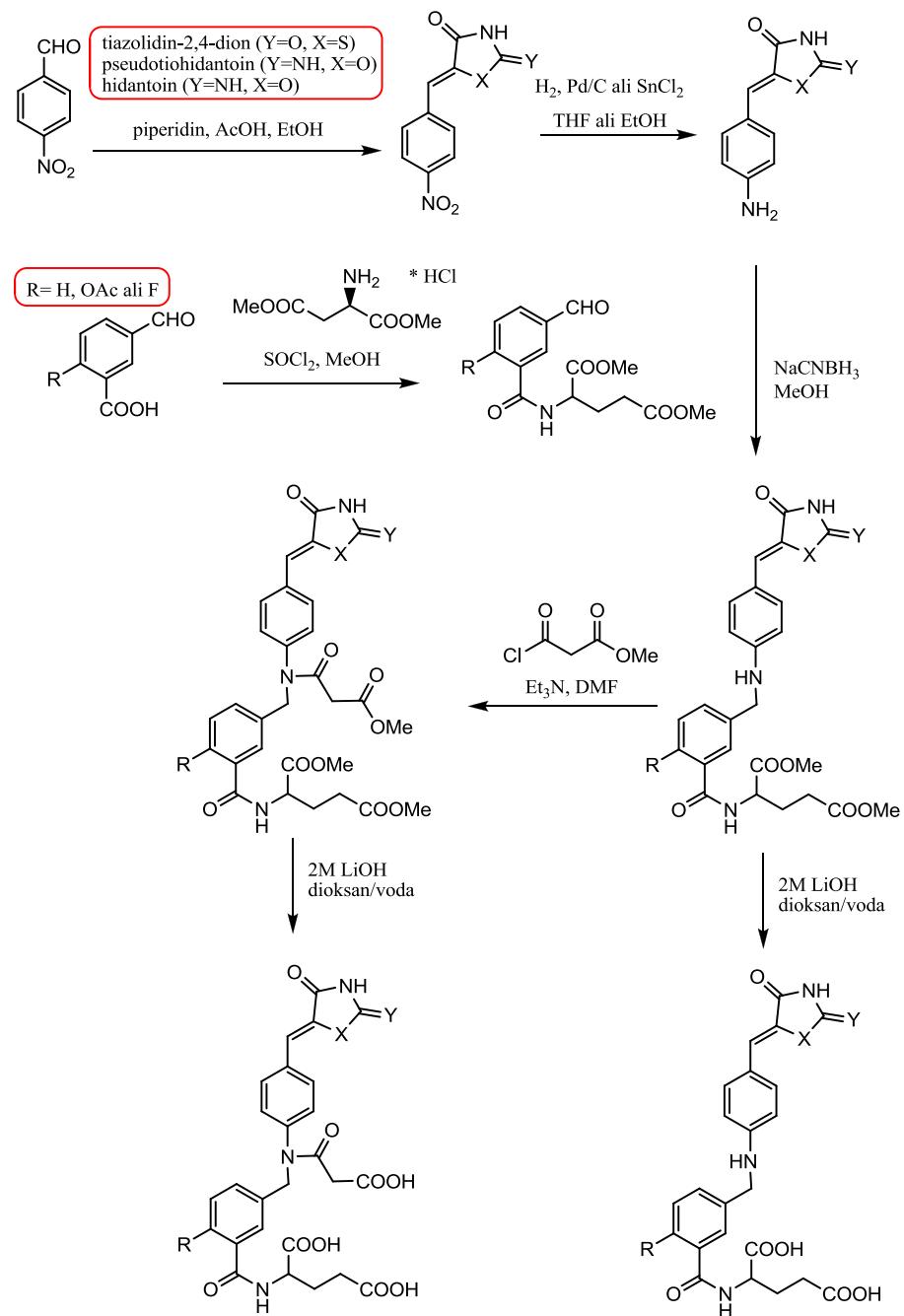
Spojino bomo poskušali modificirati na treh delih (Slika 13). S pomočjo molekulskega modeliranja smo ugotovili, da bi uvedba alkilne oziroma acilne verige na dušikov atom lahko tvorila dodatne interakcije z encimom. Poskušali bomo uvesti 2-hidroksietylni, acetatni, etilfosfatni in malonatni fragment. Ugotoviti želimo tudi, kako na aktivnost vpliva zamenjava heterocikličnega obroča. Spojine s tiazolidin-2,4-dionskim obročem so namreč zelo slabo topne, žveplo v obroču pa tudi vpliva na slab izkoristek pri katalitskem hidrogeniranju, zato smo želeli z uvedbo psevdotiohidantoina in predvsem hidantoina dobiti spojine, ki bi ohranile inhibitorno aktivnost, vendar bi bila sinteza takih derivatov lažja. Z molekulskim modeliranjem smo prav tako ugotovili, da bi lahko na obroč s pripeto glutaminsko kislino uvedli še kakšno skupino, ki bi tvorila dodatne vodikove vezi z encimom. Tako bomo poskušali na obroč uvesti fluoro ali hidroksilno skupino.



Slika 13: Spremembe, ki jih želimo uvesti na spojini **II**.

2.2 Sintezni načrt

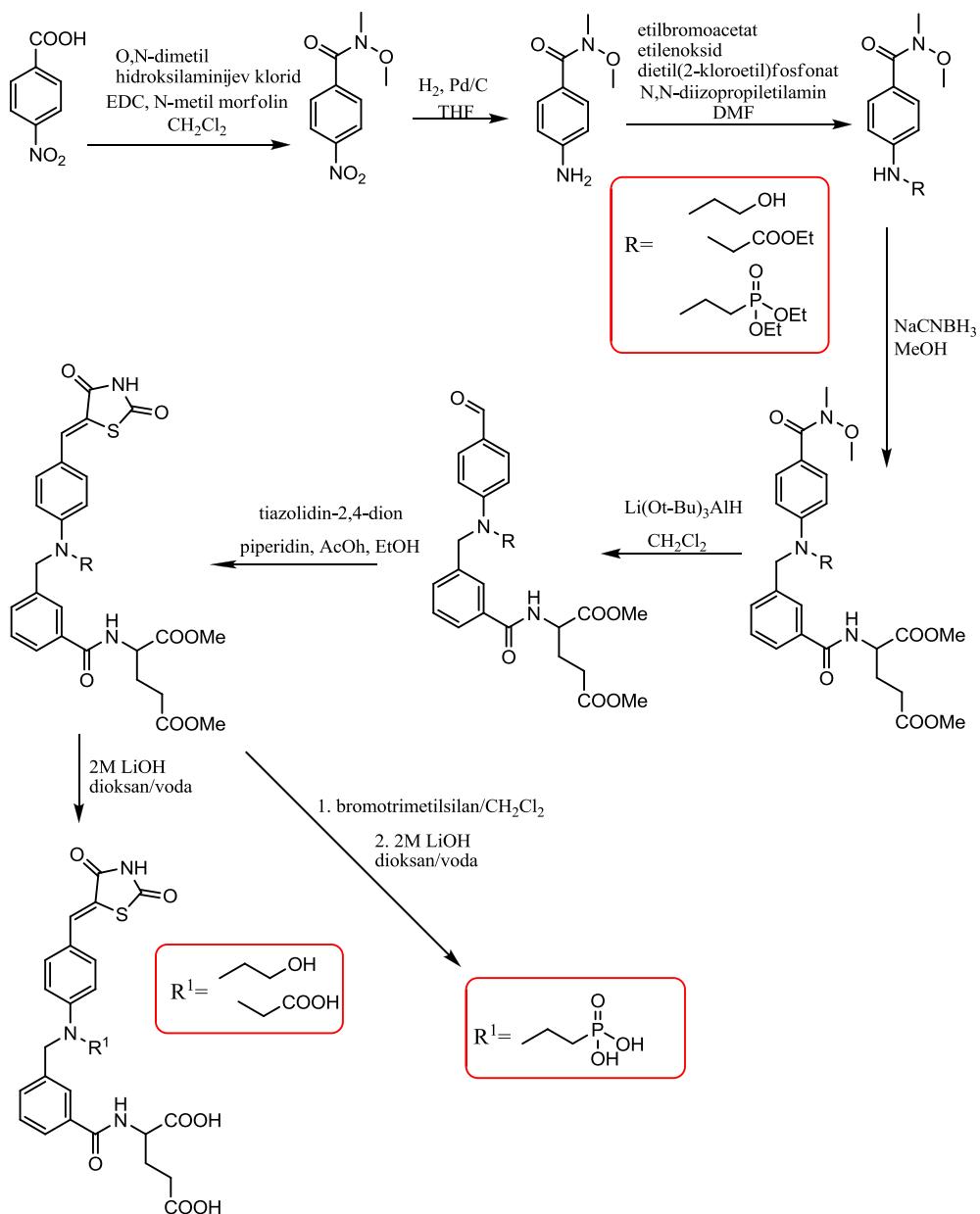
Spojine, pri katerih bomo zamenjali heterociklični obroč, acilirali dušik ali uvedli skupino, ki bi tvorila dodatne vodikove vezi (Shema 1), bomo sintetizirali na podoben način kot so Tomašić in ostali sintetizirali spojino **II**. V prvi stopnji bomo na 4-nitrobenzaldehid s Knoevenaglovo kondenzacijo pripeli enega izmed heterocikličnih obročev. V naslednji stopnji bomo izvedli redukcijo nitro skupine v amino skupino s pomočjo katalitskega hidrogeniranja pri hidantoinskem derivatu ali s kositrovim(II) kloridom v primeru tiazolidin-2,4-diona ali psevdotiohidantoina. Nato bo sledilo reduktivno aminiranje s spojino, ki jo bomo predhodno pripravili iz dimetilnega estra D-glutaminske kisline in derivata 3-karboksibenzaldehida. Pri sintezi aciliranega derivata bomo nato spojino acilirali z ustreznim kislinskim kloridom. V zadnji stopnji bomo izvedli še alkalno hidrolizo estrov, tako da bomo dobili željene končne spojine.



Shema 1: Sintezni načrt za spojine z izosterno zamenjanim heterocikličnim obročem, aciliranih derivatov na dušiku in derivatov s substituiranim fenilnim obročem.

Spojine, ki bodo substituirane z alkilno verigo na aminski skupini med obema fenilnima obročema pa bomo morali pripraviti na drugačen način (Shema 2), saj bi sicer lahko prišlo do nastanka stranskih produktov. Najprej bomo iz 4-nitrobenzojske kisline pripravili Weinrebov

amid. Nato bomo analogno kot pri prejšnji shemi s katalitskim hidrogeniranjem reducirali nitro v amino skupino. V naslednji stopnji bomo z različnimi alkil halidi pripravili alkilirane spojine, ki jih bomo nato še reduktivno aminirali. Weinrebov amid bomo reducirali do aldehyda ter na nastali derivat benzaldehida s Knoevenaglovo kondenzacijo pripeli tiazolidin-2,4-dion. Ko bomo delali s fosfonatnim fragmentom, bomo najprej izvedli odščito na fosfonatnem delu, nato pa bo v vseh primerih sledila še alkalna hidroliza do končnih spojin.



Shema 2: Sintezni načrt za spojine, ki bodo alkilirane na dušiku.

3 MATERIALI IN METODE

- **reagenti in topila**

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

- **kromatografske metode**

Za *tankoplastno kromatografijo* (TPK) smo uporabljali plošče Kieselgel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck z 0,25 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Za ločbo spojin smo uporabljali različne mobilne faze, ki so navedene pri sintezi vsake spojine posebej.

Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko ($\lambda=254$ nm) in orositvene reagente (ninhidrin, bromkrezol zeleno, 2,4-dinitrofenilhidrazin in raztopino Fe³⁺ ionov).

Za *flash kolonsko kromatografijo* smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel 60 z velikostjo zrnc 0,040-0,063 mm proizvajalca Merck. Za ločbo in elucijo spojin smo uporabili različne mobilne faze, ki so navedene pri sintezi posamezne spojine.

Za visokotlačno tekočinsko kromatografijo (HPLC) smo uporabili instrument Agilent Technologies HP 1100 z G1365B UV-vis detektorjem (254 nm). Kot stacionarno fazo smo uporabili kolono Luna HC-C18 (4,6 * 250 mm), pretok 1 mL/min, kot eluent pa 0.1 % trifluoroocetno kislino v vodi (A) in metanol (B). Uporabili smo gradient 10 % B do 80 % B v 20 min, 80 % B do 90 % B do 21 min in nato 90 % B do 23 min.

Na sistemu za kromatografsko ločbo srednjega pritiska Isolera smo uporabili kolono Biotage SNAP Cartridge (KP-C18-HS, 60g) kot stacionarno fazo in metanol:0.1 % trifluoroocetna kislina (gradient od 10 % do 95 %).

- **določanje tališča**

Tališča smo določili na mikroskopu Leica z ogrevalno mizico in so nekorigirana.

- **infrardeča spektroskopija**

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

- **jedrska magnetna resonanca**

NMR spektri so bili posneti na Brucker Avance DPX₃₀₀ spektrometru pri 300 MHz s tetrametilsilanom (TMS) kot internim standardom v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani. Kot topila smo uporabili DMSO-d₆, D₂O, CDCl₃ in NaOD.

- **masna spektroskopija**

Masne spektre so posneli na spektrometu Varian-MAT 311 A s EI, ESI ali HRMS tehnikami na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani.

- **elementna analiza**

Elementne analize so izvedli na analizatorju Perkin Elmer C,H,N 240C na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani.

- **optična sučnost**

Sučnost spojin smo izmerili na Perkin-Elmer 1241 polarimetru na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Dobljene vrednosti so povprečje 5 zaporednih meritev z integracijskim časom 5s.

- **mikrovalovni reaktor**

Uporabljali smo mikrovalovni reaktor CEM Discover. Reakcije smo izvedli v 10 mL steklenih vialah s septumom.

- **Parrov hidrogenator**

Za katalitsko hidrogeniranje pod visokim tlakom smo uporabili Parr Series 4560 Mini Bench Top Reactor.

- **poimenovanje in risanje struktur**

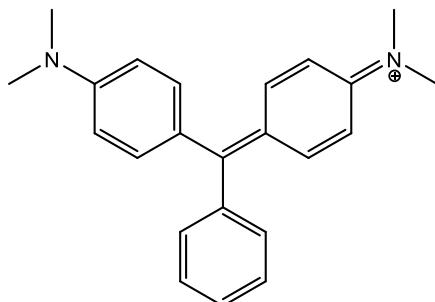
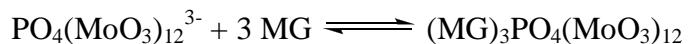
Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabljali računalniški program ChemBioDraw Ultra 11.0 proizvajalca CambridgeSoft.

- **biološko testiranje**

Encim MurD (MurE) katalizira reakcijo med UMA (UMAG) in D-Glu (*m*DAP ali L-Lys) ob prisotnosti ATP, pri čemer nastaneta ADP in fosfat. Nastanek fosfata določimo spektrofotometrično pri 650 nm posredno preko tvorbeobarvanega kompleksa z malahitno zelenim(18). Uporabili smo zmes s končnim volumenom 50 μL, ki je vsebovala 50 mM Hepes pufra, pH 8.0, 3.25 mM MgCl₂, 6.5 mM (NH₄)₂SO₄, 0.005% Triton X-114, 80 μM UMA substrata, 100 μM D-Glu, 400 M μATP, očiščen encim MurD iz *E. coli* (razredčen z 20 mM

Hepes pufra, pH 7.2, 5 mM ditiotreitol), ter 500 µM spojine, raztopljene v DMSO. Končna koncentracija DMSO-ja je bila 5% (v/v). Reakcijsko zmes smo 15 min inkubirali pri 37 °C, nato pa reakcijo zaustavili z dodatkom 100 µL Biomol® reagenta. Po 5 min smo izmerili absorbanco pri 650 nm. Katalitična aktivnost se ovrednoti na podlagi množine nastalega fosfata. Ob dodatku inhibitorja se katalitična aktivnost encima zniža, zato je množina nastalega fosfata manjša v primerjavi s kontrolo brez inhibitorja. Inhibitorno aktivnost inhibitorja izrazimo z rezidualno aktivnostjo (RA), ki predstavlja razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti inhibitorja in aktivnostjo encima brez navzočnosti inhibitorja. Rezidualno aktivnost pomerimo pri koncentraciji spojine 500 µM. V kolikor spojina izkaže dobro inhibitorno aktivnost, izmerimo še IC₅₀ vrednost, kjer pri sedmih različnih koncentracijah inhibitorja izmerimo aktivnost encima ter nato s pomočjo krivulje, ki prikazuje odnos med aktivnostjo encima v odvisnosti od koncentracije spojine, določimo vrednost IC₅₀.

Molibdofosfatni anion tvori v kislem agregate z malahitno zelenim (Slika 14) (MG).

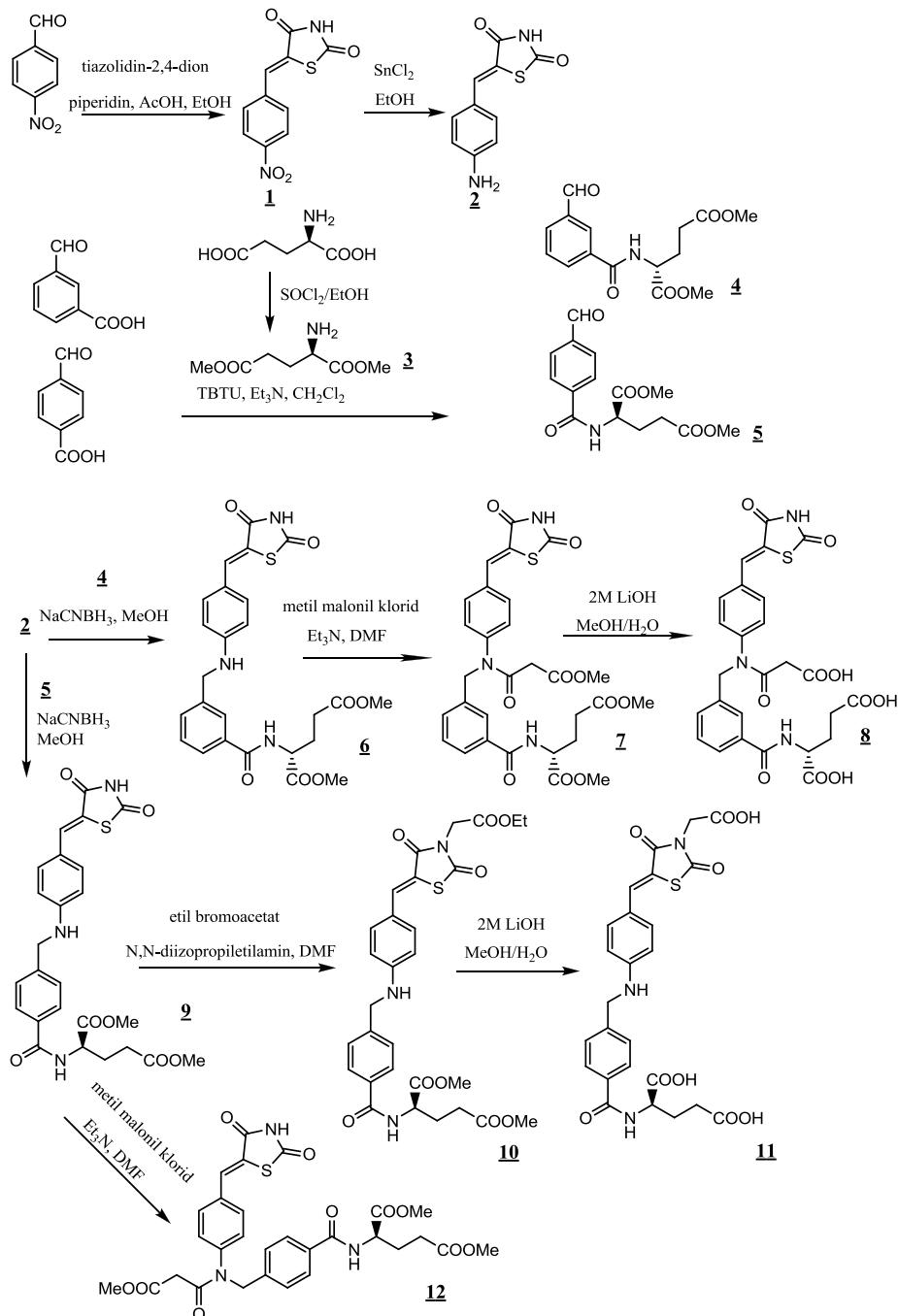


Slika 14: Malahitno zeleno.

4 EKSPERIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ

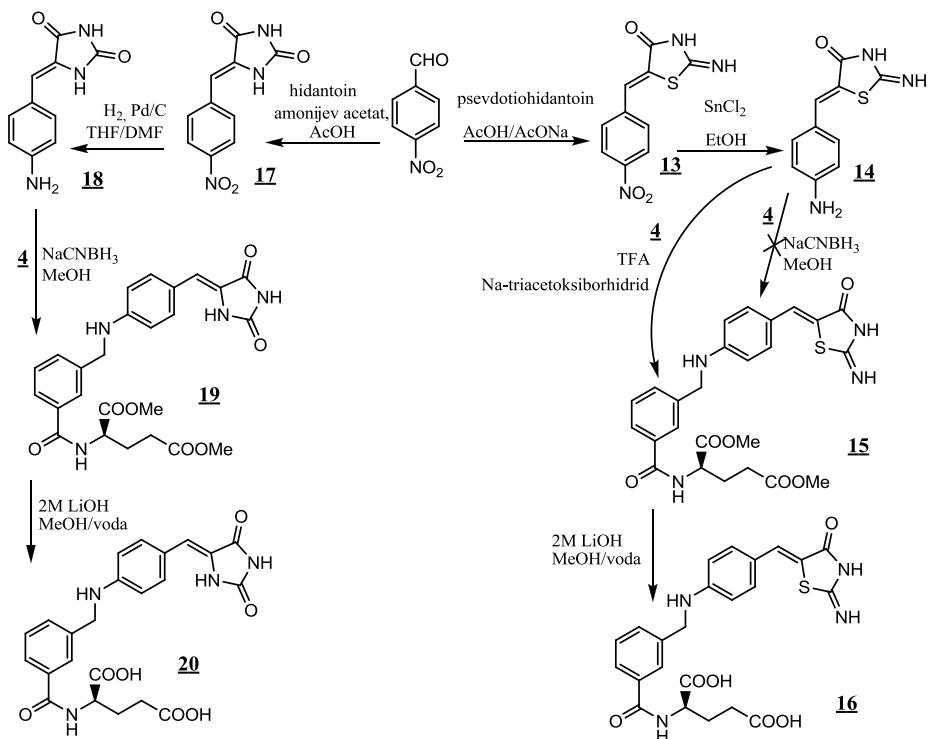
4.1 Reakcijske sheme

4.1.1 Reakcijska shema za aciliranje in poskus alkiliranja



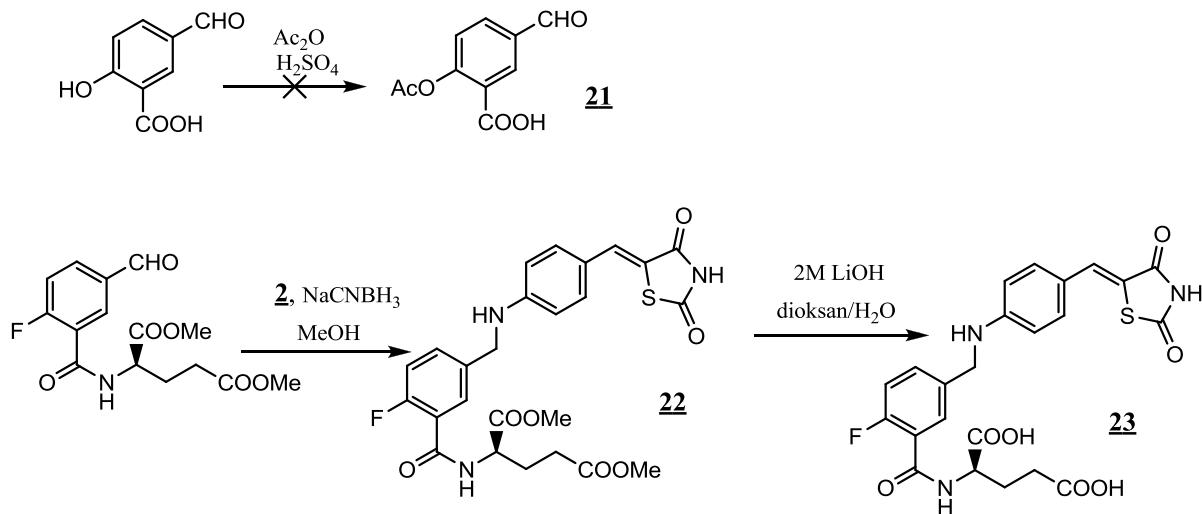
Shema 3: Sintezni postopek za aciliranje in poskus alkiliranja

4.1.2 Reakcijska shema derivatov z zamenjanim heterocikličnim obročem



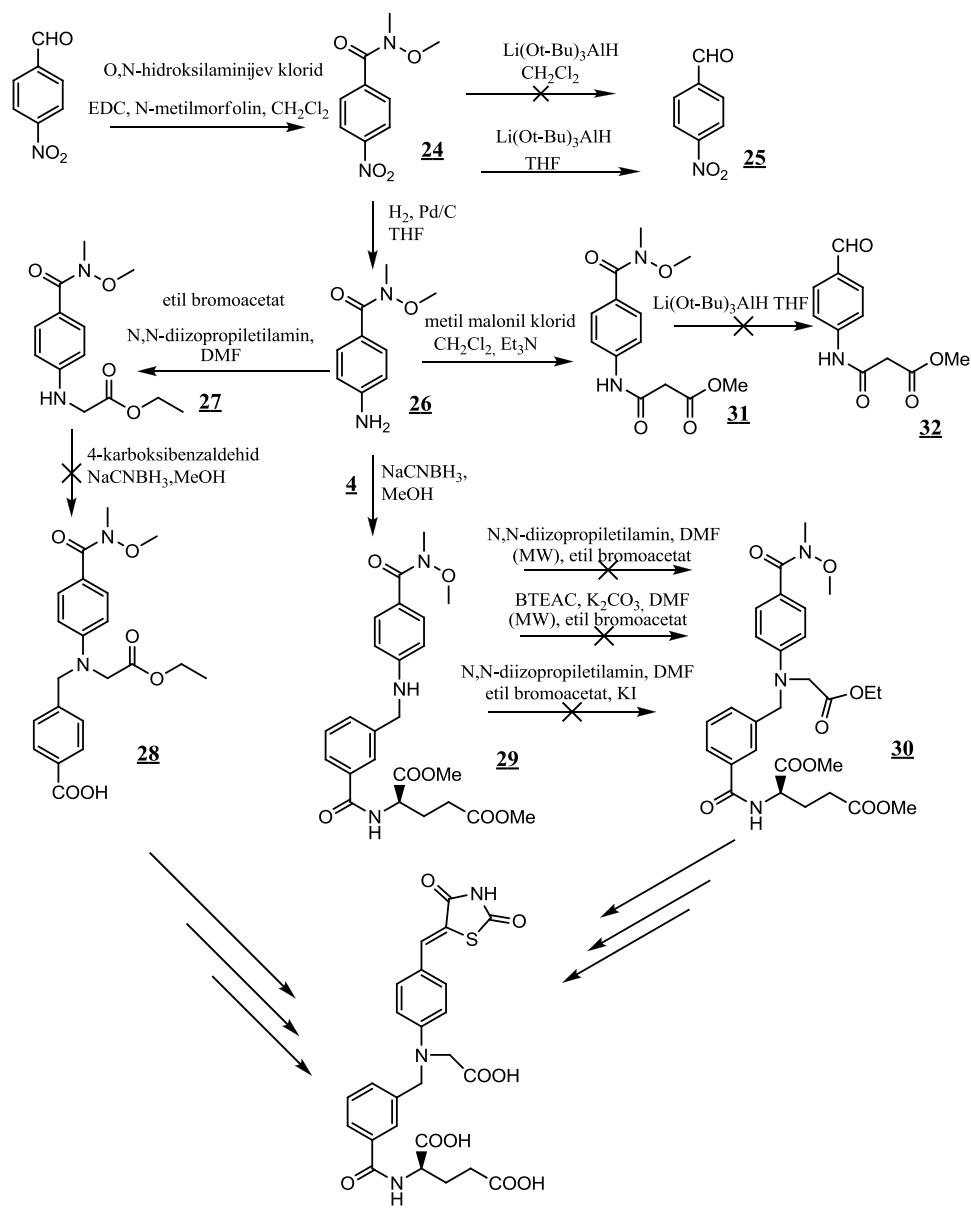
Shema 4: Sintezni postopek za derivate z zamenjanim heterocikličnim obročem.

4.1.3 Reakcijska shema derivatov s substiuiranim benzilnim obročem



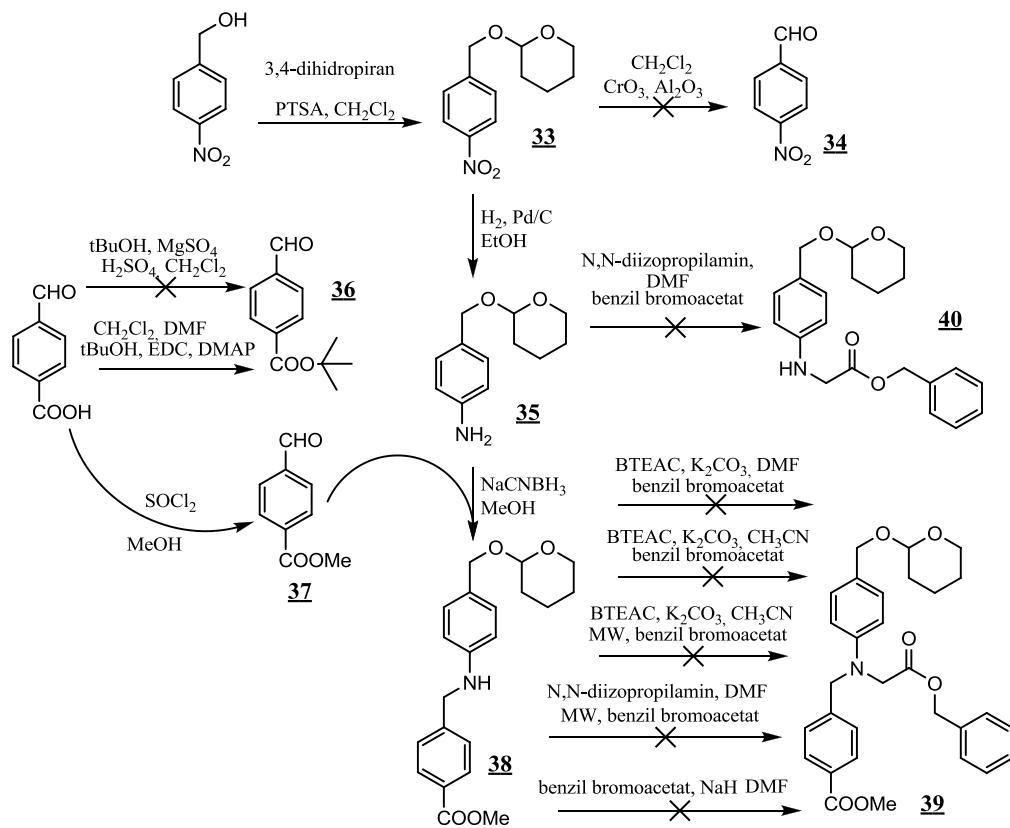
Shema 5: Sintezni postopek za derivate s substiuiranim benzilnim obročem.

4.1.4 Poskus sinteze alkiliranih derivatov prek Weinrebovega amida



Shema 6: Sintezni postopek za poskus priprave alkiliranih derivatov prek Weinrebovega amida.

4.1.5 Poskus sinteze alkiliranih derivatov iz 4-nitrobenzilnega alkohola



Shema 7: Sintezni postopek za poskus priprave alkiliranih derivatov iz 4-nitrobenzilnega alkohola.

4.2 Priprava in karakterizacija aciliranih derivatov in poskus alkiliranja

4.2.1 Sinteza (*Z*)-5-(4-nitrobenziliden)tiazolidin-2,4-diona (**1**)

Tiazolidin-2,4-dionu (3,015 g, 25,75 mmol) smo dodali 4-nitrobenzaldehid (4,28 g, 28,32 mmol), spojini suspendirali v absolutnem etanolu (100 mL) in dodali še katalitično količino ocetne kisline (255 µL, 2,575 mmol) in piperidina (147 µL, 2,575 mmol). Reakcijsko zmes smo segrevali ob refluku v argonovi atmosferi 24 ur. Nato smo zmes ohladili, pri čemer je izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali z odsesavanjem, sprali s hladnim etanolom in posušili. Dobili smo 2,745 g spojine **1**.

 <chem>O=C1NC(=O)C(=S)C=C2[C@H](C=C2c3ccccc3[N+](=O)[O-])C(=O)N1C</chem>	Izgled: rdeči kristali Izkoristek reakcije: 43 % T _{tal} : 261-264 °C, lit. 280 °C (23) TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1) = 0,45 Spojina 1 je znana iz literature.
¹H NMR DMSO-d₆	δ [ppm] = 7,85 (d, <i>J</i> =9,0 Hz, 2H, Ar-H), 7,90 (s, 1H, Ar-CH=), 8,34 (d, <i>J</i> =9,0 Hz, 2H, Ar-H), 12,80 (s, 1H, CONHCO)
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3198, 3120, 3048, 2736, 1754, 1741, 1716, 1676, 1594, 1534, 1409, 1349, 1315, 1227, 1150, 1011, 848, 756, 691

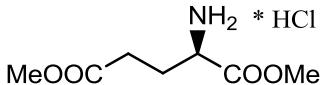
4.2.2 Sinteza (*Z*)-5-(4-aminobenziliden)tiazolidin-2,4-diona (**2**)

Spojino **1** (2,745g, 10,98 mmol) smo suspendirali v 150 ml etanola ter ob mešanju počasi dodajali SnCl₂ x 2H₂O (12,39 g, 54,9 mmol). Bučko smo opremili s povratnim hladilnikom in ob refluxu segrevali 3 ure. Nato smo topilo odparili pod znižanim tlakom in suhi zaostanek raztopili v nasičeni raztopini NaHCO₃ (150 mL). Raztopino smo v bučko vlivali zelo počasi, saj se zmes intenzivno peni. Suspenzijo smo ekstrahirali s 3 x 100 mL vročega EtOAc. Del zmesi smo pustili mešati še čez vikend z 200 mL EtOAc. Nato smo organske frakcije združili, sprali z nasičeno raztopino NaCl in topilo odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 1,858 g spojine **2**.

 <chem>O=C1NC(=O)C(=S)C=C2[C@H](C=C2c3ccccc3N)C(=O)N1C</chem>	Izgled: rdeči kristali Izkoristek reakcije: 77 % T _{tal} : 248-252 °C, lit. 231 °C (17) TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1) = 0,50 Spojina 2 je znana iz literature.
¹H NMR DMSO-d₆	δ [ppm] = 6,08 (s, 2H, Ar-NH ₂) 6,65 (d, <i>J</i> =8,7 Hz, 2H, Ar-H), 7,28 (d, <i>J</i> =8,7 Hz, 2H, Ar-H), 7,60 (s, 1H, Ar-CH=), 12,26 (s, 1H, CONHCO)
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3472, 3375, 3115, 3001, 2768, 1706, 1670, 1517, 1445, 1324, 1290, 1152, 823, 693, 610, 492

4.2.3 Sinteza (*R*)-1,5-dimetoksi-1,5-dioksopentan-2-aminijevega klorida (3)

100 mL metanola smo ohladili na ledeni kopeli in s kapalnikom počasi dokapavali tionil klorid (11,5 mL, 157,7 mmol). Kapalnik smo nato sprali z malo metanola in nato počasi po obrokih dodajali D-glutaminsko kislino (10,55 g, 71,67 mmol). Zmes smo nato odstavili iz ledene kopeli in pustili mešati 20 h pri sobni temperaturi. Nato smo pod znižanim tlakom odparili topilo in dobili oljnat zaostanek, ki smo ga večkrat prelili z etrom, ki smo ga nato ponovno odparili pod znižanim tlakom, pri čemer smo dobili voskast produkt. Produkt v bučki smo nato večkrat premešali s stekleno palčko ter jo dali na vakuumsko črpalko. Ker še vedno ni prišlo do kristalizacije spojine, smo za pospešitev kristalizacije uporabili kristalčke že sintetizirane spojine **3**, in spojina je v hipu kristalizirala. Dobili smo 14,98 g spojine **3**.

	Izgled: brezbarvni kristali Izkoristek reakcije: 99 % $T_{\text{tal}}: 138-141 \text{ }^{\circ}\text{C}$, lit. $141-143 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (22) Spojina 3 je znana iz literature.
---	--

4.2.4 Sinteza (*R*)-dimetil 2-(3-formilbenzamido)pentandionata (4)

3-formilbenzojsko kislino (1,0 g, 6,66 mmol) in TBTU (2,143 g, 6,66 mmol) smo raztopili v 60 ml CH_2Cl_2 in dodali še 2 ekvivalenta trietylamina (1,85 mL, 13,32 mmol). Po 15 min smo dodali spojino **3** (1,405 g, 6,66 mmol) in še 1 ekvivalent trietylamina (0,925 mL, 6,66 mmol) ter mešali pri sobni temperaturi 5h. Organsko fazo smo sprali z vodo (2 x 50 mL), 1M HCl (2 x 50 mL) ter s po 50 mL nasičene raztopine NaHCO_3 in NaCl. Nato smo organske frakcije sušili z natrijevim sulfatom in topilo odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 2 g olja, ki smo ga očistili s flash kolonsko kromatografijo z mobilno fazo $\text{EtOAc/petroleter}=3:2$. Po končani kolonski kromatografiji smo iz združenih čistih frakcij dobili 1,40 g spojine **4**.

	<p>Izgled: brezbarvni kristali Izkoristek reakcije: 68 % T_{tal}: 65-67 °C, lit. 66-69 °C (17) TLC: R_f (EtOAc/PE = 3/2) = 0,40 $[\alpha]_D$: +20,1 (c=2,2 mg/mL, MeOH) Spojina 4 je znana iz literature.</p>
¹H NMR DMSO-d₆	δ [ppm] = 2,05-2,50 (m, 2H, CH-CH ₂ -CH ₂), 2,48 (t, 2H, J =7,5 Hz CH ₂ -CH ₂ -COOMe), 3,59 (s, 3H, CH ₃), 3,66 (s, 3H, CH ₃), 4,50-4,53 (m, 1H, NH-CH(COOMe)-CH ₂), 7,73 (t, J_o =7,8 Hz, 1H, Ar-H ⁵), 8,10 (dt, J_o =7,8 Hz, J_m =1,2 Hz, 1H, Ar-H ⁴), 8,19 (dt, J_o =7,8 Hz, J_m =1,2 Hz, 1H, Ar-H ⁶), 8,42 (t, J_m =1,2 Hz, 1H, Ar-H ²), 9,01(d, J =7,5 Hz, 1H, CONH), 10,09 (s, 1H, CHO)
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3467, 3312, 2954, 2849, 2761, 1912, 1750, 1703, 1640, 1522, 1417, 1374, 1195, 1081, 980, 882, 829, 780, 750, 651, 568

4.2.5 Sinteza (R,Z)-dimetil 2-[3-({4-[(2,4-dioksotiazolidin-5-iliden)metil]fenilamino}metil)benzamido]pentandionata (**6**)

Spojini **4** (300 mg, 0,98 mmol) in **2** (215 mg, 0,98 mmol) smo suspendirali v 50 mL MeOH in segreli do refluksa, da se je amin raztopil in da je nastal imin. Bučko smo odstavili iz oljne kopeli ter počakali, da se je raztopina ohladila. Nato smo dodali natrijev cianborhidrid (75 mg, 1,2 mmol) in pustili mešati pri sobni temperaturi 20 h. Raztopino smo ohladili na ledeni kopeli, pri čemer je izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali s odsesavanjem in posušili. Dobili smo 150 mg spojine **6**. Matičnico smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF=EtOAc/PE=3:2) in na koncu spojino eluirali z CH₂Cl₂/MeOH=7:1, pri čemer smo dobili še 200 mg spojine **6**.

	Izgled: rumeni kristali Izkoristek reakcije: 71 % T _{tal} : 118-122 °C, lit. 148-153 °C (17) TLC: R _f (EtOAc/PE = 3:2) = 0,28 [α] _D : +16,1 (c=2,0 mg/mL, MeOH) Spojina 6 je znana iz literature
¹H NMR DMSO-d₆ δ [ppm] = 1,97-2,16 (m, 2H, CH-CH ₂ -CH ₂), 2,45(t, 2H, J=7,5 Hz CH ₂ -CH ₂ -COOMe), 3,58 (s, 3H, CH ₃), 3,64 (s, 3H, CH ₃), 4,41 (d, J=5,7 Hz, 2H, Ar-CH ₂ -NH) 4,45-4,50 (m, 1H, NH-CH(COOMe)-CH ₂), 6,71 (d, J=8,7 Hz, 2H, Ar-H'), 7,22 (t, 1H, J=7,5 Hz , Ar-NH-CH ₂), 7,32 (d, J=8,7 Hz, 2H, Ar-H'), 7,45 (d, J _o =7,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,56 (s, 1H, Ar-H), 7,53 (d, J _o =7,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,77 (t, J _o =7,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,88 (s, 1H, Ar-CH=), 8,74 (d, J=7,5 Hz, 1H, CONH), 12,28 (s, 1H, CONHCO)	
IR (KBr) v [cm ⁻¹] = 3393, 3100, 2999, 2768, 2327, 1732, 1682, 1574, 1520, 1434, 1328, 1290, 1204, 1149, 1025, 814, 690, 608	

4.2.6 Sinteza (*R,Z*)-dimetil 2-((N-(4-((2,4-dioksotiazolidin-5-iliden)metil)fenil)-3-metoksi-3-oksopropanamido)metil)benzamido)pentandionata (**7**)

Spojino **6** (298 mg, 0,49mmol) smo raztopili v 5 mL DMF in dodali metil malonil klorid (57,5 µL, 0,54 mmol) in trietilamin (150 µL, 1,08 mmol) in mešali 48h pri sobni temperaturi. Ker reakcija ni potekla do konca, smo nato dodali še dodaten ekvivalent kislinskega klorida in baze in pustili reakcijo teči še 24 h. Ker reakcija še vedno ni potekla do konca, smo spet dodali kislinski klorid in bazo ter segrevali pri 40°C še 24h. Nato smo topilo odparili pri znižanem tlaku, zmes raztopili v 25 mL EtOAc in spirali s po 25 mL 10% raztopine citronske kisline, vode in nasičene raztopine NaCl. Nato smo ponovno odparili topilo pod znižanim tlakom, ter spojino očistili s kolonsko kromatografijo (MF= EtOAc/PE=3/1). Kolono smo spirali s to

mobilno fazo, dokler se je eluirala izhodna spojina, nato pa smo produkt eluirali z $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 7/1$, pri čemer smo dobili 140 mg spojine **7**.

	Izgled: rumeni kristali Izkoristek reakcije: 44 % $T_{\text{rat}}: 76-79 \text{ }^{\circ}\text{C}$ TLC: R_f ($\text{EtOAc/PE} = 3/1$) = 0,06 TLC: R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{M} = 9/1$) = 0,27 $[\alpha]_D: +5,92$ ($c=2,4 \text{ mg/mL, DMF}$)
$^1\text{H NMR}$ DMSO-d₆	δ [ppm] = 2,03-2,15 (m, 2H, CH-CH ₂ -CH ₂), 2,44(t, $J=7,5 \text{ Hz}$, 2H, CH ₂ -CH ₂ -COOMe), 3,37 (s, 2H, CO-CH ₂ -CO) 3,56 (s, 3H, 1 x CH ₃), 3,57 (s, 3H, 1 x CH ₃), 3,64 (s, 3H, 1 x CH ₃), 4,41-4,48 (m, 1H, NH-CH(COOMe)-CH ₂), 5,00 (s, 2H, Ar-CH ₂ -N), 7,39 (d, $J=8,7 \text{ Hz}$, 2H, Ar-H'), 7,41 (s, 1H, Ar-H), 7,43 (s, 1H, Ar-NH-CH ₂), 7,60 (d, $J=8,7 \text{ Hz}$, 2H, Ar-H'), 7,70 (s, 1H, Ar-H), 7,72 (s, 1H, Ar-CH=), 7,73-7,76 (m, 1H, Ar-H), 8,71 (d, $J=7,5 \text{ Hz}$, 1H, CONH), 12,60 (s, 1H, CONHCO)
IR (KBr)	ν [cm^{-1}] = 3384, 3003, 2954, 2762, 1745, 1708, 1661, 1509, 1438, 1320, 1207, 1155, 1010, 819, 748, 657, 555
MS (ESI)	m/z (%) = 610,1 (100, [M-H] ⁻)
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₂₉ H ₂₈ N ₃ O ₁₀ S ([M-H] ⁻)
	Izmerjena vrednost
CHN	Izračunana vrednost
	Izmerjena vrednost

4.2.7 Sinteza *(R)*-2-[3-{(2-karboksi-N-[4-{(2,4-dioksotiazolidin-5-iliden)metil}fenil]acetamido)metil}benzamido]pentadiojske kisline (**8**)

Spojino **7** (106 mg, 0,149 mmol) smo raztopili v 15 mL zmesi metanol/voda 1/1, dodali šest ekvivalentov 2,2 M LiOH (0,406 mL, 0,89 mmol) in pustili mešati pri sobni temperaturi 20h. Nato smo odparili metanol pri znižanem tlaku in sobni temperaturi ter vodno fazo ekstrahirali

z 20 mL EtOAc. Nato smo vodno fazo nakisali do pH~1 z 1M HCl in ekstrahirali z EtOAc (3 x 25 mL). Organske frakcije smo združili, sušili z natrijevim sulfatom in nato odparili topilo pri znižanem tlaku. Dobili smo 60 mg spojine **8**.

	Izgled: rumeni kristali, po čiščenju je nastalo olje Izkoristek reakcije: 70 % TLC: R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 9/1/1$) = 0,22 $[\alpha]_D$: +4,73 ($c=2,2 \text{ mg/mL}$, MeOH)	
^1H NMR DMSO-d₆	δ [ppm] = 2,05-2,12 (m, 2H, CH-CH ₂ -CH ₂), 2,34 (t, 2H, $J=7,5$ Hz, CH ₂ -CH ₂ -COOMe), 3,25 (s, 2H, CO-CH ₂ -CO), 4,34-4,42 (m, 1H, NH-CH(COOMe)-CH ₂), 5,01 (s, 2H, Ar-CH ₂ -N), 7,39-7,42 (m, 4H, 2 x Ar-H', 2 x Ar-H), 7,61 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, Ar-H'), 7,71 (s, 1H, Ar-CH=), 7,76 (s, 2H, Ar-H), 8,55 (d, $J=7,5$ Hz, 1H, CONH), 12,44 (s, 1H, CONHCO), 12,63 (s, 3H, 3 x COOH)	
IR (KBr)	ν [cm^{-1}] = 3398, 3057, 2770, 1706, 1637, 1542, 1412, 1321, 1208, 1012, 840, 49, 688, 564	
MS (ESI)	m/z (%) = 568,1 (10,[M-H] ⁻), 524,1 (100)	
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₂₆ H ₂₂ N ₃ O ₁₀ S ([M-H] ⁻)	568,1026
	Izmerjena vrednost	568,1021
CHN	Izračunana vrednost	C, 54,83; H, 4,07; N, 7,38
	Izmerjena vrednost	C, 54,68; H, 4,47; N, 6,36
HPLC	t _r = 10.097 min	čistota: 95.4 %

4.2.8 Sinteza (R,Z)-dimetil 2-(4-[{4-([2,4-dioksotiazolidin-5-iliden]metil)fenilamino}metil]benzamido)pentandionata (**9**)

Spojini **5** (674 mg, 2,20 mmol) in **2** (484 mg, 2,2 mmol) smo suspendirali v 150 mL metanola in segreli do refluksa, da se je amin raztopil. Zmes smo nato ohladili na sobno temperaturo ter

dodali reducent NaCNBH_3 (166 mg, 2,64 mmol). Po nekaj časa je začela izpadati oranžno rumena oborina. Reakcijo smo pustili teči še 20h in nato odfiltrirali oborino (390 mg). Preostanek smo očistili s kolonsko kromatografijo ($\text{MF} = \text{EtOAc/PE } 2/3$), dokler je iz kolone prihajal izhodni amin, nato pa smo produkt eluirali s čistim EtOAc, pri čemer smo dobili še 120 mg produkta.

	Izgled: rumeni kristali Izkoristek reakcije: 45 % $T_{\text{tal}}: 162-165 \text{ } ^\circ\text{C}$, lit. $153-156 \text{ } ^\circ\text{C}$ (17) TLC: R_f ($\text{EtOAc/PE} = 3/2$) = 0,53 $[\alpha]_D: +15,4$ ($c=2,2 \text{ mg/mL, MeOH}$) Spojina 2 je znana iz literature
$^1\text{H NMR}$ DMSO-d₆	δ [ppm] = 1,96-2,15 (m, 2H, $\text{CH}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2$), 2,44 (t, 2H, $J=7,5 \text{ Hz}$, $\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-$ COOMe), 3,58 (s, 3H, CH ₃), 3,64 (s, 3H, CH ₃), 4,43 (d, 2H, $J=5,7 \text{ Hz}$, Ar-CH ₂ -NH), 4,48-4,50 (m, 1H, NH-CH(COOMe)-CH ₂), 6,69 (d, $J=8,7 \text{ Hz}$, 2H, Ar-H'), 7,29 (s, 1H, CH ₂ -NH-Ar), 7,32 (d, $J=8,7 \text{ Hz}$, 2H, Ar-H'), 7,44 (d, $J=8,7 \text{ Hz}$, 2H, Ar-H), 7,60 (s, 1H, Ar-CH=), 7,83 (d, $J=8,7 \text{ Hz}$, 2H, Ar-H), 8,68 (d, 1H, $J=7,5 \text{ Hz}$, CONH), 12,28 (s, 1H, CONHCO)
IR (KBr)	ν [cm^{-1}] = 3344, 3033, 2954, 2767, 1732, 1687, 1586, 1523, 1338, 1150, 1016, 817, 691, 607

4.2.9 Sinteza (R,Z) -dimetil 2-(4-[{3-[(2-etoksi-2-oksoetil)-2,4-dioksotiazolidin-5-iliden]metil}fenilamino]metil]benzamido)pentandionata (10)

Spojino **2** (120 mg, 0,232 mmol) smo raztopili v 5 mL DMF in dodali etil bromoacetat (28,5 μL , 0,256 mmol) in N,N-diizopropiletilamin (42,3 μL , 0,256 mmol). Reakcijsko zmes smo segrevali 20 h pri 70°C v argonovi atmosferi. Nato smo odparili DMF in zmes raztopili v 25

ml EtOAc. Nato smo organsko fazo sprali z 10% raztopino citronske kisline (25 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃(25 mL), vodo(25 mL) in nasičeno raztopino NaCl(25 mL). EtOAc smo uparili in dobili 114 mg spojine **10**.

	Izgled: rumeni kristali Izkoristek reakcije: 82 % T _{tal} : 132-135 °C TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1) = 0,36 [α] _D : +10,7 (c=2,3 mg/mL, DMF)
¹H NMR DMSO-d₆	δ [ppm] = 1,21 (t, 3H, J=7,2 Hz, CH ₂ -CH ₃) 1,96-2,15 (m, 2H, CH-CH ₂ -CH ₂), 2,45 (t, 2H, J=7,5 Hz, CH ₂ -CH ₂ -COOMe), 3,58 (s, 3H, CH ₃), 3,64 (s, 3H, CH ₃), 4,16 (q, 2H, J=7,2 Hz, CH ₂ -CH ₃), 4,41-4,47 (m, 5H, NH-CH(COOMe)-CH ₂ ; Ar-CH ₂ -N; N-CH ₂ -CO), 6,72 (d, J=8,7 Hz, 2H, Ar-H'), 7,38 (d, J=8,7 Hz, 2H, Ar-H'), 7,44 (d, J=8,1 Hz, 3H, 2 x Ar-H + CH ₂ -NH-Ar), 7,79 (s, 1H, Ar-CH=), 7,84 (d, J=8,1 Hz, 2H, Ar-H), 8,68 (d, 1H, J=7,5 Hz CONH)
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3381, 3338, 2955, 2362, 1733, 1672, 1506, 1403, 1351, 1216, 1101, 1002, 820, 750, 523
MS (ESI⁺)	m/z (%) = 598,2 (21,[M+H] ⁺), 620,2 (100,[M+Na] ⁺)
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₂₉ H ₃₀ N ₃ O ₉ S ([M-H] ⁻)
	Izmerjena vrednost
CHN	Izračunana vrednost
	Izmerjena vrednost

4.2.10 Poskus sinteze (*R,Z*)-2-(4-[{3-[(karboksimetil)-2,4-dioksotiazolidin-5-iliden]metil}fenilamino]metil)benzamido)pentandiojska kislina (11)

Spojino **10** (80 mg, 0,133 mmol) smo suspendirali v 7 mL zmesi MeOH/voda 1/1 in dodali 2M LiOH (0,4 mL, 0,8 mmol). Pustili smo mešati mešati 20h pri sobni temperaturi. Nato smo pri znižanem tlaku odparili organsko topilo, razredčili z malo vode ter nakisali z 1M HCl ter ekstrahirali z EtOAc (3 x 25 mL). nato smo sušili z natrijevim sulfatom in odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo 50 mg nečiste spojine **11**, ki smo jo poskušali očistiti na sistemu za kromatografsko ločbo srednjega pritiska Isolera, vendar pričakovanega produkta nismo uspeli izolirati.

	Izkoristek reakcije: 70 % TLC: R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 7/1/1$) = 0,18
Strukturna formula pričakovanega produkta	

4.2.11 Sinteza (*R,Z*-dimetil 2-(4-[{N-(4-[{2,4-dioksotiazolidin-5-iliden]metil}fenil)-3-metoksi-3-oksopropanamido}metil]benzamido)pentandionata (12)

Spojino **9** (350 mg, 0,68 mmol) smo raztopili v 5 mL DMF in dodali metil malonil klorid (109 μL , 1,02 mmol) in trietylamin (284 μL , 2,04 mmol). Ker reakcija ni potekla kvantitativno smo dodali najprej še 0,5 ekvivalenta kislinskega klorida (37 μL) in 1 ekvivalent baze (95 μL) ter nato še 1 ekvivalent (75 μL) kislinskega klorida in 3 ekvivalente (280 μL) baze. Ker so se pojavile nove lise, smo reakcijo ustavili in odparili DMF. Zmes smo nato raztopili v EtOAc in

sprali z 10% raztopino citronske kisline, vodo in nasičeno raztopino NaCl. Organske frakcije smo združili, posušili z natrijevim sulfatom in odparili topilo. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo MF=EtOAc/PE 1/1, dokler ni prišla ven vsa izhodna spojina in nato spirali še s čistim EtOAc. Dobili smo 110 mg spojine **12**, katere strukturo nismo mogli potrditi z NMR spektroskopijo.

	Izgled: bledo rumeni kristali Izkoristek reakcije: 26 % TLC: R_f (EtOAc/PE = 1/1) = 0,17
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3381, 2954, 2767, 1709, 1654, 1534, 1508, 1437, 1281, 1157, 1104, 1012, 845, 761, 555
MS (ESI⁺)	m/z (%) = 634,1 (100,[M+Na] ⁺)
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₂₉ H ₃₀ N ₃ O ₁₀ S ([M+H] ⁺)
	Izmerjena vrednost

4.3 Priprava in karakterizacija derivatov z zamenjanim heterocikličnim obročem

4.3.1 Sinteza (Z)-2-imino-5-(4-nitrobenziliden)tiazolidin-4-ona (13)

V ledoctu (70 mL) smo suspendirali 4-nitrobenzaldehid (2,145 g, 141,19 mmol) in psevdotiohidantoin (1,5 g, 12,9 mmol). Dodali smo še natrijev acetat (2,116 g, 25,8 mmol) in ob refluksu (135°C) segrevali 20h. Pri 70°C so se spojine že raztopile. Reakcijsko zmes smo zlili na zmes led/voda in odfiltrirali izpadlo rumeno oborino. Oborino smo nato sušili še 2 h pri 90 °C, da smo se znebili ocetne kisline. Dobili smo 2,9 g spojine 13.

	Izgled: rumeni kristali Izkoristek reakcije: 90 % T _{tal} : 300+ °C TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1) = 0,31 Spojina <u>13</u> je znana iz literature
¹H NMR DMSO-d₆ δ [ppm] = 7,70 (s, 1H, Ar-CH=), 7,82 (d, J=8,7 Hz, 2H, Ar-H), 8,34 (d, J=8,7 Hz, 2H, Ar-H), 9,34 (s, 1H, CONH), 9,62 (s, 1H, C=NH)	
IR (KBr) ν [cm ⁻¹] = 3448, 3214, 2945, 1676, 1527, 1412, 1352, 1276, 1141, 1002, 844, 761, 685, 490	

4.3.2 Sinteza (Z)-5-(4-aminobenziliden)-2-iminotiazolidin-4-ona (14)

Spojino 13 (2,84 g, 11,4 mmol) in kositrov(II) klorid dihidrat (10,3 g, 45,6 mmol) smo suspendirali v 100 mL etanola in 3 h segrevali ob refluksu. Po končani reakciji smo etanol odparili pod znižanim pritiskom in oborino suspendirali v 150 mL nasičene raztopine NaHCO₃. Zmes se je močno penila. Spojino smo poskušali vroče ekstrahirati z EtOAc, vendar je nastala emulzija, prav tako pa spojina ni bila prav dobro topna v EtOAc. Suspenzijo smo zato filtrirali in filtrat ponovno ločili ter vodno fazo še trikrat ekstrahirali z EtOAc. Organske frakcije smo sušili z nasičeno raztopino NaCl ter natrijevim sulfatom ter odparili pod znižanim pritiskom. Dobili smo 700 mg spojine, ki pa ni bila čista. Spojino smo očistili s kolonsko

kromatografijo ($\text{MF} = \text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9/1$) in dobili 150 mg čiste spojine **14** ter 150 mg zmesi. Oborino, ki je ostala na nuči pa smo raztopili v DMF ter pustili mešati nekaj časa. Nato smo DMF odparili in dobili še 700 mg spojine **14**.

	Izgled: oranžni kristali Izkoristek reakcije: 34 % $T_{\text{tal}}: 300+ \text{ }^{\circ}\text{C}$ TLC: $R_f (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9/1) = 0,40$
$^1\text{H NMR}$ DMSO-d₆	$\delta [\text{ppm}] = 5,84$ (s, 2H, Ar-NH ₂), 6,65 (d, $J=8,4$ Hz, 2H, Ar-H), 7,25 (d, $J=8,4$ Hz, 2H, Ar-H), 7,41 (s, 1H, Ar-CH=), 8,98 (s, 2H, -NHC(NH)-)
IR (KBr)	$\nu [\text{cm}^{-1}] = 3443, 3349, 3207, 2923, 1654, 1583, 1514, 1440, 1371, 1279, 1181, 1013, 823, 768, 528, 494$
MS (ESI⁺)	$m/z (\%) = 220,1$ (100,[M+H] ⁺)
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₁₀ H ₁₀ N ₃ OS ([M+H] ⁺) 220,0545 Izmerjena vrednost 220,0539

4.3.3 Sinteza (R,Z)-dimetil 2-(3-[{4-(2-imino-4-oksotiazolidin-5-iliden)metil}fenilamino]metil)benzamido pentandionata (**15**)

Spojini **14** (400 mg, 1,22 mmol (preračunano na vsebnost DMF)) in **4** (300 mg, 0,98 mmol) smo raztopili v 5 mL trifluorocetne kisline, ohladili na -15 °C in dodali natrijev triacetoksi borhidrid (388 mg, 1,83 mmol). Ker nam je izhodni amin ostajal, smo dodali še malo aldehyda (100 mg, 0,32 mmol), raztopljenega v CH₂Cl₂. Nato smo mešali še 20 h ter zmes nato zlili v ledenomrzlo nasičeno raztopino NaHCO₃ (50 mL). Vodno fazo smo ekstrahirali z CH₂Cl₂, ki smo ga odparili. Spojino smo nato še očistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo najprej uporabili MF = CH₂Cl₂/MeOH = 20/1, da so prišle ven nečistote, nato pa še z CH₂Cl₂/MeOH = 9/1. Dobili smo 200 mg spojine **15**.

	Izgled: rumeni kristali Izkoristek reakcije: 32 % T _{tač} : 171-175 °C TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1) = 0,22 [α] _D : +11,4 (c=2,3 mg/mL, MeOH)				
¹H NMR DMSO-d₆	δ [ppm] = 2,02-2,14 (m, 2H, CH-CH ₂ -CH ₂), 2,45 (t, 2H, J=7,5 Hz, CH ₂ -CH ₂ -COOMe), 3,58 (s, 3H, CH ₃), 3,64 (s, 3H, CH ₃), 4,39 (s, 2H, Ar-CH ₂ -N), 4,45-4,47 (m, 1H, NH-CH(COOMe)-CH ₂), 6,70 (d, J=8,4 Hz, 2H, Ar-H'), 7,05 (t, J=7,5 Hz, 1H, Ar-NH), 7,29 (d, J=8,4 Hz, 2H, Ar-H'), 7,42 (s, 1H, Ar-CH=), 7,45 (d, J=7,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,53 (d, J=7,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,76 (d, J=7,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,88 (s, 1H, Ar-H), 8,23 (d, 1H, J=7,8 Hz, CONHCH), 8,91 (s, 1H, C=NH), 9,13 (s, 1H, CONHC=NH)				
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3372, 2925, 2854, 1732, 1645, 1524, 1273, 1209, 1137, 818, 800, 722, 600, 525				
MS (ESI)	m/z (%) = 509,1 (71,[M-H]), 113,0 (100)				
MS (HRMS)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 65%;">Izračunana vrednost za C₂₅H₂₅N₄O₆S ([M-H])</td><td style="width: 35%;">509,1495</td></tr> <tr> <td>Izmerjena vrednost</td><td>509,1489</td></tr> </table>	Izračunana vrednost za C ₂₅ H ₂₅ N ₄ O ₆ S ([M-H])	509,1495	Izmerjena vrednost	509,1489
Izračunana vrednost za C ₂₅ H ₂₅ N ₄ O ₆ S ([M-H])	509,1495				
Izmerjena vrednost	509,1489				

4.3.4 Sinteza (R,Z)-2-(3-[{4-(2-imino-4-oksotiazolidin-5-iliden)metil}fenilamino]metil)benzamido pentandiojske kisline (**16**)

Spojino **15** (180 mg, 0,352 mmol) smo suspendirali v 40 mL zmesi metanol/voda (1/1). Ko smo dodali 2M LiOH (0,705 mL, 1,41 mmol), se je spojina raztopila. Reakcijo smo pustili teči pri sobni temperaturi 20 h. Drugi dan smo opazili nastanek oborine, ki smo jo odfiltrirali. V filtratu smo odparili metanol pod znižanim tlakom pri sobni temperaturi ter nakisali do pH~1 z 1M HCl in ekstrahirali z EtOAc (3 x 25 mL). Organske frakcije smo sušili in odparili pod znižanim tlakom. Dobili smo 116 mg spojine, ki smo jo očistili s kolonsko kromatografijo. Najprej smo sprali z MF = CH₂Cl₂/MeOH = 9/1, da smo se znebili nečistot. Nato smo spirali z MF = CH₂Cl₂/MeOH = 5/1, da smo dobili 30 mg spojine **16**. Kolono smo nato spirali še z MF = CH₂Cl₂/MeOH/AcOH = 9/1/1, da smo dobili še 50 mg spojine **16**.

	Izgled: oranžni kristali Izkoristek reakcije: 50 % T _{tač} : 185-189 °C TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /M/AcOH = 9/1/1) = 0,15 [α] _D : -61,7 (c=2,5 mg/mL, DMF)				
¹H NMR DMSO-d₆	δ [ppm] = 1,91-2,11 (m, 2H, CH-CH ₂ -CH ₂), 2,36 (t, 2H, J=7,5 Hz CH ₂ -CH ₂ -COOMe), 4,41 (s, 3H, Ar-CH ₂ -N; NH-CH(COOMe)-CH ₂), 6,71 (d, J=8,4 Hz, 2H, Ar-H'), 7,30 (d, J=8,4 Hz, 2H, Ar-H'), 7,43 (t, 2H, J=7,5 Hz Ar-CH=, , Ar-H), 7,52 (d, J=7,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,77 (d, J=7,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,89 (s, 1H, Ar-H), 8,58 (d, J=7,8 Hz 1H, CONHCH), 9,00 (s, 2H, -NH ₂); proton aminske skupine in protona karboksilnih skupin nista vidna v NMR spektru.				
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3408, 2923, 2852, 1639, 1522, 1265, 1179, 820, 800, 722, 523				
MS (ESI)	m/z (%) = 481,1 (100,[M-H] ⁻)				
MS (HRMS)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 60%;">Izračunana vrednost za C₂₃H₂₁N₄O₆S ([M-H]⁻)</td><td style="width: 40%; text-align: right;">481,1182</td></tr> <tr> <td>Izmerjena vrednost</td><td style="text-align: right;">481,1180</td></tr> </table>	Izračunana vrednost za C ₂₃ H ₂₁ N ₄ O ₆ S ([M-H] ⁻)	481,1182	Izmerjena vrednost	481,1180
Izračunana vrednost za C ₂₃ H ₂₁ N ₄ O ₆ S ([M-H] ⁻)	481,1182				
Izmerjena vrednost	481,1180				
HPLC	t_r = 9.941 min čistota = 95.8 %				

4.3.5 Sinteza (Z)-5-(4-nitrobenziliden)imidazolidin-2,4-diona (17)

4-nitrobenzaldehid (2,0 g, 13,2 mmol) in hidantoin (2,0 g, 19,8 mmol) smo suspendirali v 30 ml ledocta. Dodali smo še amonijev acetat (2,03 g, 26,4 mmol) in ob refluksu (135 °C) segrevali 20h. Izpadlo oranžno oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, spirali z vodo in etanolom ter sušili 2h pri T = 90°C, da smo se znebili ocetne kisline. Dobili smo 2,2 g spojine 17.

	Izgled: oranžni kristali Izkoristek reakcije: 72 % $T_{\text{tal}}: 300+ \text{ }^{\circ}\text{C}$ TLC: $R_f (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{M} = 9/1) = 0,69$ Spojina 17 je znana iz literature
¹H NMR DMSO-d₆	$\delta [\text{ppm}] = 6,50$ (s, 1H, Ar-CH=), 7,86 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, Ar-H), 8,21 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, Ar-H), 11,30 (s, 2H, 2 x NH)
IR (KBr)	$\nu [\text{cm}^{-1}] = 3335, 3193, 2438, 1748, 1664, 1505, 1339, 1249, 1201, 1090, 1009, 876, 762, 650, 470$

4.3.6 Sinteza (Z)-5-(4-aminobenziliden)imidazolidin-2,4-diona (**18**)

Spojino **17** (1,5g, 6,43 mmol) smo raztopili v 100 mL mešanice THF/DMF (1/3). Prepihali smo jo z argonom, dodali katalizator Pd/C (0,15 g), nato pa smo reakcijsko zmes izpostavili vodikovi atmosferi. Po 20h smo odfiltrirali katalizator ter odparili organska topila pod znižanim tlakom. Dobili smo 1,7 g spojine **18**.

	Izgled: oranžni kristali Izkoristek reakcije:>100 % (DMF) $T_{\text{tal}}: 236-240 \text{ }^{\circ}\text{C}$ TLC: $R_f (\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH} = 9/1) = 0,27$ Spojina 18 je znana iz literature				
¹H NMR DMSO-d₆	$\delta [\text{ppm}] = 5,60$ (s, 2H, Ar-NH ₂), 6,29 (s, 1H, Ar-CH=), 6,57 (d, $J=8,4$ Hz, 2H, Ar-H), 7,33 (d, $J=8,4$ Hz, 2H, Ar-H), 10,12 (s, 1H, NH), 10,98 (s, 1H, NH)				
IR (KBr)	$\nu [\text{cm}^{-1}] = 3440, 3362, 3236, 2361, 1700, 1648, 1603, 1520, 1386, 1179, 1018, 881, 765, 659, 548$				
MS (ESI⁺)	$m/z (\%) = 204,1 (38,[\text{M}+\text{H}]^+), 106,1(100)$				
MS (HRMS)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Izračunana vrednost za C₁₀H₁₀N₃O₂ ([M+H]⁺)</td> <td style="width: 50%; text-align: right;">204,0773</td> </tr> <tr> <td>Izmerjena vrednost</td> <td style="text-align: right;">204,0779</td> </tr> </table>	Izračunana vrednost za C ₁₀ H ₁₀ N ₃ O ₂ ([M+H] ⁺)	204,0773	Izmerjena vrednost	204,0779
Izračunana vrednost za C ₁₀ H ₁₀ N ₃ O ₂ ([M+H] ⁺)	204,0773				
Izmerjena vrednost	204,0779				

4.3.7 Sinteza (R,Z)-dimetil 2-(3-[{4-([2,5-dioksoimidazolidin-4-iliden]metil)fenilamino}metil]benzamido)pentandionata (19)

Spojini **18** (400 mg, 1,45 mmol; preračunano na vsebnost DMF) in **4** (445 mg, 1,45 mmol) smo suspendirali v 50 mL metanola in ob refluksu segrevali 3h. Nato smo zmes ohladili, dodali natrijev cianborhidrid (109 mg, 1,74 mmol) in mešali 20h pri sobni temperaturi. Nato smo pod znižanim tlakom odparili metanol in preostanek (750 mg) prekristalizirali iz EtOAc. Nastala je oborina, ki smo jo odfiltrirali in dobili 100 mg čiste spojine **19**. Matičnico smo ponovno prekristalizirali, da smo dobili še 85 mg čiste spojine **19**.

	Izgled: rumeni kristali Izkoristek reakcije: 26 % T _{ta} : 187-192 °C TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1) = 0,44 [α] _D : +14,8 (c=2,3 mg/mL, MeOH)	
¹H NMR DMSO-d₆	δ [ppm] = 1,99-2,16 (m, 2H, CH-CH ₂ -CH ₂), 2,46 (t, 2H, J=7,5 Hz, CH ₂ -CH ₂ -COOMe), 3,58 (s, 3H, CH ₃), 3,64 (s, 3H, CH ₃), 4,38 (d, J=4,2 Hz, 2H, Ar-CH ₂ -N), 4,43-4,50 (m, 1H, NH-CH(COOMe)-CH ₂), 6,29 (s, 1H, Ar-CH=), 6,60 (d, J=8,4 Hz, 2H, Ar-H'), 6,84 (t, 1H, J=5,4 Hz, Ar-NH), 7,36 (d, J=8,4 Hz, 2H, Ar-H'), 7,44 (t, J=7,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,53 (d, J=7,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,76 (d, J=7,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,88 (s, 1H, Ar-H), 8,73 (d, 1H, J=7,2 Hz, CONHCH(COOMe)), 10,31 (s, 1H, NH), 10,98 (s, 1H, NH)	
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3408, 3255, 3015, 2951, 2726, 1759, 1651, 1600, 1526, 1385, 1328, 1181, 1097, 1019, 885, 815, 704, 647	
MS (ESI)	m/z (%) = 493,2 (90,[M-H] ⁻), 201,1 (100)	
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₂₅ H ₂₅ N ₄ O ₇ ([M-H] ⁻)	493,1723
	Izmerjena vrednost	493,1699
CHN	Izračunana vrednost	C, 60,72; H, 5,30; N, 11,33
	Izmerjena vrednost	C, 60,80; H, 5,18; N, 11,42

4.3.8 Sinteza (*R,Z*)-2-(3-[{4-([2,5-dioksimidazolidin-4-iliden]metil)fenilamino}metil]benzamido)pentandiojske kisline (**20**)

Spojino **19** (89 mg, 0,18 mmol) smo suspendirali v 20 mL zmesi metanol/voda (1/1). Ko smo dodali 2M LiOH (0,36 mL, 0,72 mmol), se je spojina raztopila. Nato smo mešali pri sobni temperaturi preko noči (20h) in nato smo pod znižanim tlakom odparili metanol. Vodno fazo smo razredčili, z 1M HCl nakisali do pH~1, da je izpadla oborina, ki smo jo ekstrahirali v EtOAc (3 x 25 mL). Organske faze smo združili in spirali z nasičeno raztopino NaCl. Ker je šlo veliko spojine v vodno fazo, smo jo ponovno nakisali in ekstrahirali v EtOAc. Organske frakcije smo nato sušili z natrijevim sulfatom, filtrirali ter pri znižanem tlaku odparili etil acetat. Dobili smo 79 mg spojine **20**.

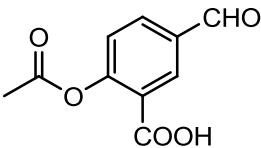
	Izgled: rumeni kristali Izkoristek reakcije: 94 % T _{ta} : 116-120 °C TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH/AcOH = 9/1/1) = 0,22 [α] _D : +14,1 (c=2,4 mg/mL, MeOH)
¹H NMR DMSO-d₆	δ [ppm] = 1,91-2,13 (m, 2H, CH-CH ₂ -CH ₂), 2,36 (t, 2H, J=7,5 Hz, CH ₂ -CH ₂ -COOMe), 4,37-4,44 (m, 3H, NH-CH(COOMe)-CH ₂ , Ar-CH ₂ -N), 6,29 (s, 1H, Ar-CH=), 6,60 (d, J=8,4 Hz, 2H, Ar-H'), 6,87 (t, 1H, J=5,4 Hz, Ar-NH), 7,36 (d, J=8,4 Hz, 2H, Ar-H'), 7,43 (t, J=7,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,52 (d, J=7,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,77 (d, J=7,5 Hz, 1H, Ar-H), 7,89 (s, 1H, Ar-H), 8,60 (d, 1H, J=7,5 Hz, CONHCH(COOMe)), 10,15 (s, 1H, NH), 10,99 (s, 1H, NH)
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3376, 3052, 1716, 1651, 1599, 1527, 1384, 1319, 1179, 1096, 880, 820, 764, 651, 553
MS (ESI)	m/z (%) = 465,1 (100,[M-H] ⁻)
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₂₃ H ₂₁ N ₄ O ₇ ([M-H] ⁻)
	Izmerjena vrednost
CHN	Izračunana vrednost
	Preračunano na 0,57 AcOH

	Izmerjena vrednost	C, 58,32; H, 4,96; N, 10,72
HPLC	$t_r = 9.912 \text{ min}$	čistota = 97,5 %

4.4 Priprava in karakterizacija spojin s substituiranim benzilnim obročem

4.4.1 Poskus sinteze 2-acetoksi-5-formilbenzojske kislino (21)

5-formilsalicilno kislino (0,75 g, 4,51 mmol) smo suspendirali v prebitnem acetanhidridu (1,07 mL, 11,29 mmol) ter dodali še nekaj kapljic koncentrirane žveplove(VI) kislino. Segreli smo na 50°C, da je nastala oljnata zmes. Po 1h smo reakcijsko zmes ohladili, da je izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali. Spojine nismo mogli očistiti ter je z analiznimi tehnikami nismo mogli popolnoma potrditi.

	Izgled: rožnati kristali TLC: R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 9/1/0,5$) = 0,64 Spojina <u>21</u> je znana iz literature
--	--

4.4.2 Sintesa (R,Z)-dimetil 2-(-5((-4-((2,4-dioksotiazolidin-5-iliden)metil)fenilamino)metil-2-fluorobenzamido)pentandionata (22)

(R)-dimetil 2-(2-fluoro-5-formilbenzamido)pentandionat (300 mg, 0,92 mmol) in spojino 2 (203 mg, 0,92 mmol) smo suspendirali v 50 mL metanola ter segreli do refluxa (90 °C), da se je amin raztopil. Zmes smo nato ohladili na sobno temperaturo in dodali natrijev cianborhidrid (69 mg, 1,104 mmol) ter mešali pri sobni temperaturi 20h. Nato smo dodali še 75 mg aldehyda, saj smo se želeli znebiti izhodnega amina. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom ter zmes poskusili očistiti s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/heksan 1/1), vendar je bila ločba slaba. Dobili smo 450 mg spojine 22.

	Izgled: oranžni kristali Izkoristek reakcije: 92 % TLC: R_f (EtOAc/PE = 3/2) = 0,44 $[\alpha]_D$: +14,5 (c=2,5 mg/mL, MeOH)				
^1H NMR DMSO-d₆	δ [ppm] = 1,85-2,15 (m, 2H, CH-CH ₂ -CH ₂), 2,45 (t, 2H, J =7,5 Hz, CH ₂ -CH ₂ -COOMe), 3,60 (s, 3H, CH ₃), 3,66 (s, 3H, CH ₃), 4,37-4,50 (m, 3H, NH-CH(COOMe)-CH ₂ , Ar-CH ₂ -N), 6,70 (d, J =9,0 Hz, 2H, Ar-H'), 7,21-7,33 (m, 4H, 2 x Ar-H, 2 x Ar-H'), 7,43-7,53 (m, 3H, Ar-NH, Ar-CH=, Ar-H), 8,66 (d, 1H, J =7,5 Hz, CONHCH), 12,37 (br s, CONHCO)				
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3398, 3013, 2955, 2781, 2344, 2174, 1719, 1686, 1560, 1534, 1492, 1438, 1329, 1292, 1230, 1185, 1150, 816, 693, 610, 518				
MS (ESI⁺)	m/z (%) = 552,1 (10,[M+Na] ⁺), 350,1 (100)				
MS (HRMS)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 50%;">Izračunana vrednost za C₂₅H₂₄N₃O₇FNaS([M+Na]⁺)</td><td style="width: 50%;">552,1217</td></tr> <tr> <td>Izmerjena vrednost</td><td>552,1202</td></tr> </table>	Izračunana vrednost za C ₂₅ H ₂₄ N ₃ O ₇ FNaS([M+Na] ⁺)	552,1217	Izmerjena vrednost	552,1202
Izračunana vrednost za C ₂₅ H ₂₄ N ₃ O ₇ FNaS([M+Na] ⁺)	552,1217				
Izmerjena vrednost	552,1202				

4.4.3 Sinteza *(R,Z)-2-((4-((2,4-dioksotiazolidin-5-iliden)metil)fenilamino)metil-2-fluorobenzamido)pentandiojske kisline (23)*

Spojino **22** (350 mg, 0,66 mmol) smo raztopili v 20 mL zmesi dioksan/voda (1/1) in nato dodali 2,2M LiOH (1,2 mL, 2,65 mmol) ter mešali pri sobni temperaturi 20h. Nato smo pri sobni temperaturi pod znižanim tlakom odparili dioksan in vodno fazo ekstrahirali z EtOAc. Nato smo vodno fazo nakisali z 1M HCl do pH~1 in ekstrahirali z EtOAc (3 x 25 mL). Organske faze smo združili, sušili ter jih odparili, da smo dobili 193 mg nečiste spojine, ki smo jo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = CH₂Cl₂/MeOH/AcOH = 9/1/0,3), da smo dobili 66 mg čiste spojine **23**.

	Izgled: rumeni kristali Izkoristek reakcije: 58 % T_{tal} : 177-183 °C TLC: R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{M}/\text{AcOH}$) = 9/1/0,3 = 0,56 $[\alpha]_D$: +3,65 (c=2,3 mg/mL, MeOH)
^1H NMR DMSO-d₆	δ [ppm] = 1,87-2,13 (m, 2H, CH-CH ₂ -CH ₂), 2,35 (t, 2H, J =7,5 Hz, CH ₂ -CH ₂ -COOMe), 4,38-4,43 (m, 3H, NH-CH(COOMe)-CH ₂ , Ar-CH ₂ -N), 6,71 (d, J =8,7 Hz, 2H, Ar-H'), 7,23-7,29 (m, 2H, Ar-H), 7,33 (d, J =8,7 Hz, 2H, Ar-H'), 7,47-7,52 (m, 1H, Ar-NH), 7,59-7,63 (m, 2H, Ar-CH=, Ar-H), 8,48 (dd, 1H, J_1 =7,5 Hz, J_2 =2,1 Hz, CONHCH), 12,37 (br s, 3H, 2 x COOH, 1 x CONHCO)
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3414, 2362, 2344, 1691, 1591, 1523, 1328, 1187, 1151, 812, 688, 608, 524
MS (ESI⁺)	m/z (%) = 524,1 (75,[M+Na] ⁺), 77,0 (100)
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₂₃ H ₂₀ N ₃ O ₇ FNaS ([M+Na] ⁺) 524,0904 Izmerjena vrednost 524,0898
CHN	Izračunana vrednost C, 55,09; H, 4,02; N, 8,38 Preračunano na 0,4 H ₂ O C, 54,31; H, 4,12; N, 8,26 Izmerjena vrednost C, 54,26; H, 3,80; N, 8,38
HPLC	t _r = 12.612 min čistota = 94.9 %

4.5 Poskus priprave alkiliranih derivatov prek Weinrebovega amida

4.5.1 Sinteza N-metoksi-N-metil-4-nitrobenzamida (24)

4-nitrobenzojsko kislino (7,00 g, 41,89 mmol) smo raztopili v 200 mL diklorometana in ohladili na -15°C. Nato smo dodali O,N-dimetilhidroksilamonijev klorid (4,209 g, 43,15 mmol), N-metilmorfolin (4,75 mL, 43,15 mmol), EDC (8,275 g, 43,15 mmol) pa smo dodajali

po obrokih v času 45 min. Reakcijsko zmes smo mešali še 20h. Nato smo v reakcijsko zmes nalili 30 mL ledeno mrzle 1M HCl. Fazi smo ločili ter vodno fazo ekstrahirali s 100 mL diklorometana. Organske frakcije smo združili, sprali z nasičeno vodno raztopino NaHCO₃, ter sušili z natrijevim sulfatom. Suspenzijo smo filtrirali in topilo pod znižanim tlakom uparili, da smo dobili olje, ki smo ga nato prelili z etrom, da so izpadli kristali. Kristale smo odfiltrirali z odsesavanjem in dobili 4,63 g spojine **24**. Iz matičnice smo še enkrat prekristalizirali spojino, da smo dobili še dodatnih 2,40 g.

	Izgled: bledo rumeni kristali Izkoristek reakcije: 80 % T _{tal} : 74-76 °C TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 40/1) = 0,53 Spojina 24 je znana iz literature
¹H NMR CDCl₃	δ [ppm] = 3,40 (s, 3H, N-CH ₃), 3,54 (s, 3H, O-CH ₃), 7,84 (d, J=9,0 Hz, 2H, Ar-H), 8,27 (d, J=9,0 Hz, 2H, Ar-H)
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3436, 3224, 3115, 2987, 2941, 2826, 2365, 1941, 1818, 1637, 1602, 1527, 1355, 1314, 1212, 1103, 1066, 1010, 976, 864, 852, 709, 550

4.5.2 Sinteza 4-nitrobenzojske kisline (**25**)

Spojino **24** (47 mg, 0,22 mmol) smo raztopili v 2 mL THF, dodali litijev tritercbutoksialuminijev hidrid in mešali ob refluksu (75°C) 20h. S pomočjo TLC-ja in oroševanja z 2,4-dinitrofenilhidrazinom smo naslednji dan ugotovili, da je reakcija potekla, vendar spojine nismo izolirali.

4.5.3 Sinteza 4-amino-N-metoksi-N-metilbenzamida (**26**)

Spojino **24** (4,487 g, 21,34 mmol) smo raztopili v 100 mL THF in zmes prepihali z argonom. Dodali smo katalizator Pd/C (224 mg) in ponovno prepihali z argonom. Nato smo z vodikom še 10 min prepihovali, bučko opremili z balonom vodika ter mešali pri sobni temperaturi 20h. Nato smo odfiltrirali katalizator, pod znižanim tlakom uparili topilo ter spojino očistili s kolonsko kromatografijo (MF = CH₂Cl₂/MeOH = 30/1), da smo dobili 2,821 g spojine **26**.

	Izgled: rumeni kristali Izkoristek reakcije: 73 % T _{tal} : 90-93 °C TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 20/1) = 0,23 Spojina 26 je znana iz literature
¹H NMR DMSO-d₆	δ [ppm] = 3,19 (s, 3H, N-CH ₃), 3,55 (s, 3H, O-CH ₃), 5,64 (s, 2H, Ar-NH ₂), 6,53 (d, J=8,7 Hz, 2H, Ar-H), 7,42 (d, J=8,7 Hz, 2H, Ar-H)
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3436, 3339, 3229, 3008, 2895, 2140, 1910, 1602, 1312, 1219, 1168, 974, 815, 753, 683, 593, 495

4.5.4 Sinteza etil 2-(4-(metoksi(metil)karbamoil)fenilamino)acetata (**27**)

Spojino **26** (180 mg, 1 mmol) smo raztopili v 5 mL DMF ter raztopino prepihali z argonom. Nato smo dodali še etil bromoacetat (122 μL, 0,198 mmol) in N,N-diizopropyletilamin (182 μL, 0,198 mmol), bučko opremili s povratnim hladilnikom ter segrevali pri 70°C 20h. Hladilnik smo opremili z balonom argona, da smo ustvarili inertno atmosfero. Nato smo odparili organsko topilo ter spojino očistili s kolonsko kromatografijo (MF = CH₂Cl₂/MeOH = 20/1). Dobili smo 120 mg spojine **27**.

	Izgled: olje Izkoristek reakcije: 45 % TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1) = 0,44
¹H NMR DMSO-d₆	δ [ppm] = 1,20 (t, 3H, J=7,2 Hz, CH ₂ -CH ₃), 3,20 (s, 3H, N-CH ₃), 3,55 (s, 3H, O-CH ₃), 3,95 (d, 2H, J=6,3 Hz, NH-CH ₂ -CO), 4,12 (q, 2H, J=7,2 Hz, CH ₂ -CH ₃), 6,54-6,57 (m, 3H, 2 x Ar-H, Ar-NH), 7,48 (d, J=8,7 Hz, 2H, Ar-H)

4.5.5 Poskus sinteze 4-(((2-etoksi-2-oksoetil)(4-(metoksi(metil)karbamoil)fenil)amino)metilbenzojske kisline (28)

Spojino 27 (110 mg, 0,413 mmol) smo raztopili v 10 mL MeOH, dodali 4-karboksibenzaldehid (62 mg, 0,413 mmol) in natrijev cianborhidrid (31 mg, 0,50 mmol) ter mešali pri sobni temperaturi. Ker po enem dnevu reakcija ni potekla, smo z ledoctom uravnali pH na 6. Po dveh dneh se je pojavila šibka lisa, zato smo zmes segreli na 50 °C in pustili teči še 3 dni. Po 3 dneh je bila lisa še vedno šibka, zato smo zmes segreli do refluksa na 75 °C in pustili teči reakcijo še 1 dan. Ker so nastajali že stranski produkti, kinetika reakcije pa je bila zelo počasna, spojine 28 nismo izolirali.

 Strukturna formula pričakovanega produkta	TLC: R_f ($\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}/\text{AcOH} = 20/1/0,1$) = 0,08
---	---

4.5.6 Sinteza (R)-dimetil 2-(3-((4-(metoksi(metil)karbamoil)fenilamino)metil)benzamido)pentandionata (29)

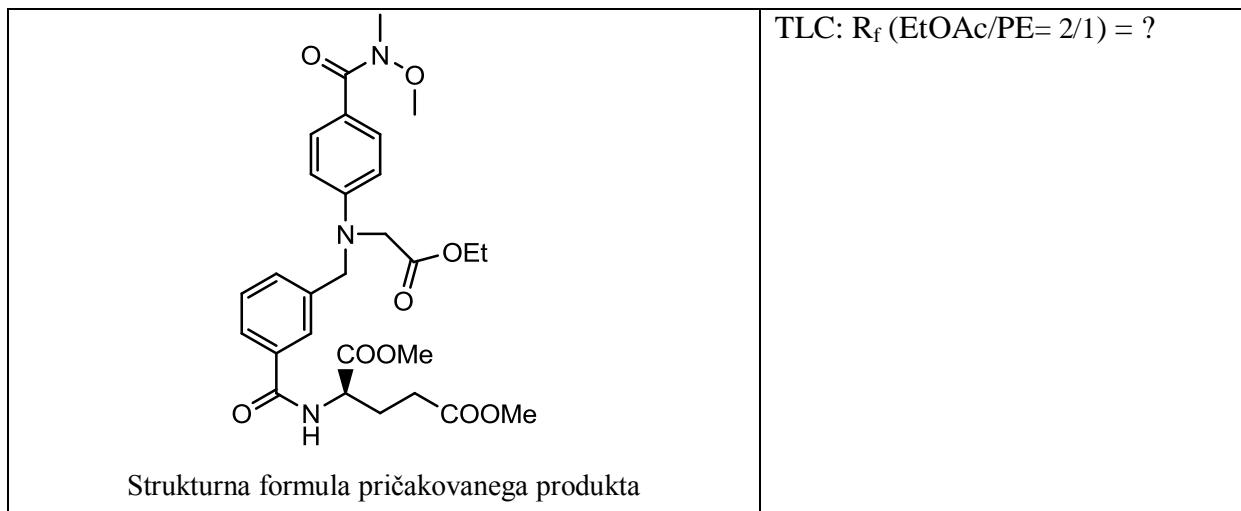
Spojini 26 (524 mg, 2,90 mmol) in 4 (920 mg, 2,99 mmol) smo raztopili v 40 mL metanola. Pustili smo mešati 30 min in nato dodali natrijev cianborhidrid (225 mg, 3,59 mmol) ter mešali še nadaljnih 20h pri sobni temperaturi. Nato smo pod znižanim tlakom odparili topilo ter spojino očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/PE = 2/1). Ko je prišel ven izhodni amin 26, smo začeli kolono spirati s čistim etil acetatom. Dobili smo 1,10 g spojine 29.

	Izgled: olje Izkoristek reakcije: 80 % $T_{\text{tal}}:$ / TLC: R_f (EtOAc/PE = 2/1) = 0,13 $[\alpha]_D:$ +18,5 ($c=2,3 \text{ mg/mL, MeOH}$)				
$^1\text{H NMR}$ DMSO-d₆	δ [ppm] = 1,99-2,14 (m, 2H, CH-CH ₂ -CH ₂), 2,46 (t, 2H, $J=7,5$ Hz, CH ₂ -CH ₂ -COOMe), 3,18 (s, 3H, N-CH ₃), 3,54 (s, 3H, O-CH ₃), 3,58 (s, 3H, CH ₃), 3,64 (s, 3H, CH ₃), 4,37 (d, 2H, $J=6,0$ Hz, Ar-CH ₂ -NH), 4,45-4,48 (m, 1H, NH-CH(COOMe)-CH ₂), 6,58 (d, $J=8,7$ Hz, 2H, Ar-H'), 6,87 (q, 1H, Ar-NH-CH ₂), 7,41-7,48 (m, 3H, 2 x Ar-H', 1 x Ar-H), 7,53 (d, $J=7,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,76 (d, $J=7,5$ Hz, 1H, Ar-H), 7,89 (s, 1H, Ar-H), 8,72-8,74 (d, 1H, CONH)				
IR (NaCl)	ν [cm^{-1}] = 3344, 2943, 2832, 1742, 1649, 1609, 1547, 1448, 1216, 1111, 1031, 473, 453				
MS (ESI⁺)	m/z (%) = 494,2 (5,[M+Na] ⁺), 268,1 (100)				
MS (HRMS)	<table style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 45%;">Izračunana vrednost za C₂₄H₂₉N₃O₇Na([M+Na]⁺)</td> <td style="width: 5%;">494,1903</td> </tr> <tr> <td>Izmerjena vrednost</td> <td>494,1906</td> </tr> </table>	Izračunana vrednost za C ₂₄ H ₂₉ N ₃ O ₇ Na([M+Na] ⁺)	494,1903	Izmerjena vrednost	494,1906
Izračunana vrednost za C ₂₄ H ₂₉ N ₃ O ₇ Na([M+Na] ⁺)	494,1903				
Izmerjena vrednost	494,1906				

4.5.7 Poskus sinteze (R)-dimetil 2-((3-(((2-etoksi-2-oksoetil)(4-metoksi(metil)karbamoil)fenil)amino)metil)benzamido)pentandionata (30)

- a) Spojino **29** (800 mg, 1,7 mmol) smo raztopili v 5 mL DMF, dodali etilbromoacetat (210 μL , 1,87 mmol) in N,N-diizopropiletilamin (310 μL , 1,87 mmol) ter segrevali pri 70 °C 24h. Ker produkt ni nastajal, smo segrevali še en dan na 110 °C, kar nam tudi ni dalo želenega produkta. Zmes smo zato dali v mikrovalovni reaktor ($T=100$ °C, $t=15$ min), vendar smo dobili mnogo lis na TPK kromatogramu, tako da produkta nismo izolirali.

- b) Spojino **29** (800 mg, 1,7 mmol) smo raztopili v 5 mL DMF, dodali K_2CO_3 (705 mg, 5,1 mmol), benziltrietylamonijev klorid (387 mg, 1,7 mmol) in etil bromoacetat (315 μ L, 2,80 mmol) ter segrevali pri 110 °C. Ker reakcija ni potekla, smo zmes dali v mikrovalovni reaktor ($T=150$ °C, $p=17$ bar, $t=30$ min). Na TPK kromatogramu smo opazili, da se je bila ena izmed bolj intenzivna, zato smo izvedli čiščenje zmesi. DMF smo uparili pod znižanim tlakom, zmes raztopili v 25 mL EtOAc ter spirali z 10 % raztopino citronske kisline (2 x 25 mL), nasičeno vodno raztopino $NaHCO_3$ (25 mL) in nasičeno vodno raztopino $NaCl$ (25 mL). sušili smo z natrijevim sulfatom, filtrirali in pod znižanim tlakom uparili etil acetat, da smo dobili 300 mg spojine, ki smo jo očistili s kolonsko kromatografijo. Posneli smo NMR spekter 2 izmed frakcij, vendar nismo mogli potrditi strukture želene spojine **30**.
- c) Izvedli smo tudi reakcijo, opisano pod a), le da smo dodali še kalijev jodid v reakcijsko zmes, ki smo jo pri 120 °C segrevali 24h. Ker se je na TPK kromatogramu spet pojavilo veliko lis, spojine nismo izolirali.



4.5.8 Sinteza metil 3-(4-(metoksi(metil)karbamoil)fenilamino)-3-oksopropanoata (**31**)

Spojino **26** (180 mg, 1 mmol) smo raztopili v 5 mL diklorometana ter ohladili na 0 °C na ledeni kopeli. Dodali smo trietylamin (278 μ L, 2 mmol) in metil malonil klorid (118 μ L, 1,1 mmol) ter mešali pri sobni temperaturi 48 ur. Nato smo dodali še 20 μ L metil malonil klorida in 50 μ L baze, ker nam je ostalo še nekaj izhodne spojine. Pustili smo, da je reakcija tekla še

1h ter nato odparili topilo pod znižanim tlakom ter zmes raztopili v EtOAc (25 mL). Spirali smo z raztopino 10 % citronske kisline (25 mL), vodo (25 mL) in nasičeno raztopino NaCl (25 mL). Po uparevanju organskih frakcij smo dobili 250 mg spojine **31**.

	Izgled: olje Izkoristek reakcije: 89 % TLC: R_f (EtOAc) = 0,28
¹H NMR CDCl₃	δ [ppm] = 3,37 (s, 3H, N-CH ₃), 3,52 (s, 2H, COCH ₂ CO), 3,57 (s, 3H, O-CH ₃), 3,83 (s, 3H, COOCH ₃), 7,62 (d, <i>J</i> =8,7 Hz, 2H, Ar-H), 7,74 (d, <i>J</i> =8,7 Hz, 2H, Ar-H), 9,37 (s, 1H, Ar-NH)

4.5.9 Poskus sinteze metil 3-(4-formilfenilamino)-3-oksopropanoata (**32**)

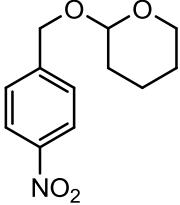
Spojino **31** (250 mg, 0,89 mmol) smo raztopili v 5 mL THF ter dodali litijev tritercbutoksaluminijev hidrid (454 mg, 1,78 mmol). Bučko smo opremili s povratnim hladilnikom in segrevali pri 50 °C. Na TPK kromatogramu smo opazili, da v glavnem nastaja produkt, kjer se reducira ester, zato smo zmes segreli na 75 °C (pri tej temperaturi je potekala redukcija Weinrebovega amida pri spojini **25**) ter pustili mešati 20h. Ker na TPK kromatogramu nismo opazili želenega produkta (nobena lisa se ni barvala z 2,4-dinitrofenilhidrazinom), spojine **32** nismo izolirali.

	TLC: R_f = ?
Strukturna formula pričakovanega produkta	

4.6 Poskus priprave alkiliranih derivatov prek THP zaščite

4.6.1 Sinteza 2-(4-nitrobenziloksi)tetrahidro-2H-pirana (33)

4-nitrobenzilni alkohol (10,0 g, 65,3 mmol) smo raztopili v 300 mL diklorometana ter v zmes dodali 3,4-dihidropiran (7,15 mL, 78,36 mmol) ter *para*-toluensulfonsko kislino (124 mg, 0,65 mmol). Raztopina se je takoj obarvala v modro, reakcija pa je bila zelo hitra, saj je potekla že v 10 min mešanja na sobni temperaturi. Organsko fazo smo nato spirali z 200 mL mešanice voda/nasičena raztopina NaHCO₃/nasičena raztopina NaCl 2/1/1 in pod znižanim tlakom odparili topilo. Dobili smo 15,94 g spojine 33.

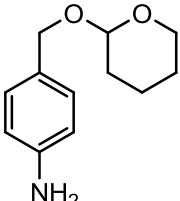
	Izgled: rumeno olje Izkoristek reakcije: 103 % TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /M= 40/1) = 0,65	
¹H NMR CDCl₃	δ [ppm] = 1,56-1,93 (m, 6H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂), 3,55-3,61 (m, 1H, AB sistem, H _A od CH ₂ -O), 3,86-3,94 (m, 1H, AB sistem, H _B od CH ₂ -O), 4,62 (d, 1H, J=13,5 Hz, AB sistem, H _A od Ar-CH ₂), 4,75 (t, 1H, J=3,3 Hz, O-CH), 4,90 (d, 1H, J=13,5 Hz, AB sistem, H _B od Ar-CH ₂), 7,54 (d, J=8,7 Hz, 2H, Ar-H), 8,22 (d, J=8,7 Hz, 2H, Ar-H)	
IR (NaCl)	ν [cm ⁻¹] = 3338, 2946, 2832, 2522, 2045, 1608, 1526, 1450, 1121, 1033, 801, 740, 702, 490	
MS (ESI⁺)	m/z (%) = 209,1 (100), 238,1 (5,[M+H] ⁺)	
CHN	Izračunana vrednost	C, 60,75; H, 6,37; N, 5,90
	Izmerjena vrednost	C, 60,34; H, 6,47; N, 5,78

4.6.2 Poskus sinteze 4-nitrobenzaldehida (34)

Spojini 33 (237 mg, 1 mmol) smo žeeli s kromovim(VI) oksidom, adsorbiranem na vlažnem aluminijevem oksidu (19) (60 mg) oksidativno odstraniti tetrahidropiranilno zaščito in hkrati pretvoriti benzilni alkohol v benzaldehid. Reakcija je potekala izredno slabo, zato spojine nismo izolirali.

4.6.3 Sinteza 4-((tetrahidro-2H-piran-2-iloksi)metil)anilina (35)

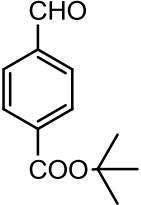
Spojino 33 (15,6 g, 65,8 mmol) smo raztopili v 200 mL absolutnega etanola, prepihali z argonom, dodali katalizator Pd/C (750 mg) in mešali pri sobni temperaturi 24h v vodikovi atmosferi. Ker je reakcija potekala dokaj počasi, smo zmes prestavili v Parrov hidrogenator (p=10 bar), kjer je reakcija popolnoma potekla v 24 h. Organsko topilo smo nato odparili pod znižanim tlakom ter zmes očistili s kolonsko kromatografijo (MF = CH₂Cl₂/MeOH = 40/1). Dobili smo 6,5 g spojine 35.

	Izgled: rumeno olje Izkoristek reakcije: 47 % TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /M = 40/1) = 0,20 Spojina <u>35</u> je znana iz literature
¹H NMR DMSO-d₆	δ [ppm] = 1,46-1,73 (m, 6H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂), 3,42-3,49 (m, 1H, AB sistem, H _A od CH ₂ -O), 3,76-3,83 (m, 1H, AB sistem, H _B od CH ₂ -O), 4,23 (d, 1H, J=11,1 Hz, AB sistem, H _A od Ar-CH ₂), 4,48 (d, 1H, J=11,1 Hz, AB sistem, H _B od Ar-CH ₂), 4,61 (br s, 1H, O-CH), 5,01 (s, 2H, Ar-NH ₂), 6,53 (d, J=8,1 Hz, 2H, Ar-H), 6,98 (d, J=8,1 Hz, 2H, Ar-H)
IR (NaCl)	ν [cm ⁻¹] = 3351, 2945, 2832, 2044, 1616, 1521, 1451, 1262, 1178, 1118, 1075, 1031, 905, 831, 815, 478, 455

4.6.4 Sinteza *tert*-butil 4-formilbenzoata (36)

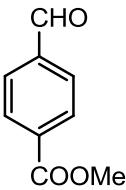
- Magnezijev sulfat (6,41 g, 53,28 mmol) smo suspendirali v 50 mL diklorometana, dodali koncentrirano H₂SO₄ (0,73 mL, 13,32 mmol) ter pustili mešati 15 min, nato pa smo dodali še 4-karboksibenzaldehid (2,0 g, 13,32 mmol) in *tert*-butanol (6,41 mL, 66,6 mmol). Reakcijo smo pustili mešati 24h pri sobni temperaturi. Nato smo v zmes dodali 100 mL nasičene raztopine NaHCO₃, da bi se magnezijev sulfat raztopil, vendar se to ni zgodilo, saj smo dobili mlečnato emulzijo, pri kateri smo težko ločili fazi. Spojine tako nismo izolirali.
- 4-karboksibenzaldehid (2,0 g, 13,32 mmol) smo suspendirali v 50 mL diklorometana ter dodali še 5 mL DMF, da se je spojina raztopila. Ohladili smo na 0 °C in dodali DMAP (813 mg, 6,66 mmol) in *tert*-butanol (1,41 mL, 14,65 mmol), na koncu pa še

EDC (2,81 g, 14,65 mmol). Pri 0 °C smo mešali še 2 uri, nato pa smo zmes odstavili z ledene kopeli in na sobni temperaturi mešali še 20h. Organsko fazo smo spirali z vodo (50 mL), 10% raztopino citronske kisline (50 mL), ter nasičenima raztopinama NaHCO₃ (50 mL) in NaCl (50 mL). Nato smo organske faze sušili z natrijevim sulfatom ter topilo odparili pod znižanim tlakom, da smo dobili 200 mg spojine **36**.

	Izgled: rumeno olje Izkoristek reakcije: 7 % TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 40/1) = 0,75 Spojina 36 je znana iz literature
---	--

4.6.5 Sinteza metil 4-formilbenzoata (**37**)

4-karboksibenzaldehid (5,00 g, 33,3 mmol) smo suspendirali v 300 mL brezvodnega metanola, ki smo ga predhodno pripravili. Zmes smo ohladili na ledeni kopeli in po kapljicah dodajali tionil klorid (2,7 mL, 36,6 mmol). Bučko smo opremili z balonom argona in pustili mešati pri sobni temperaturi 20h. Nato smo pod znižanim tlakom odparili metanol ter zmes raztopili v 100 mL etil acetata, ki smo ga spirali z 0,1 M NaOH (2 x 50 mL), vodo (50 mL) in nasičeno raztopino NaCl (50 mL). Organsko fazo smo sušili z natrijevim sulfatom in odparili pod znižanim tlakom. Oljnat zaostanek smo večkrat prelimi s heksanom in ponovno odparili ter nato ohladili na ledu, da so izpadli kristali. Dobili smo 4,32 g spojine **37**.

	Izgled: brezbarvni kristali Izkoristek reakcije: 80 % T _{tal} : 40-45 °C TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 40/1) = 0,67 Spojina 37 je znana iz literature
¹H NMR CDCl ₃	δ [ppm] = 3,98 (s, 3H, CH ₃), 7,97 (d, J=8,4 Hz, 2H, Ar-H), 8,22 (d, J=8,4 Hz, 2H, Ar-H), 10,12 (s, 1H, CHO)
IR (KBr)	ν [cm ⁻¹] = 3427, 2955, 2833, 1951, 1723, 1505, 1436, 1285, 1202, 1104, 987, 913, 847, 761, 716

4.6.6 Sinteza metil 4-((4-((tetrahidro-2H-piran-2-iloksi)metil)fenilamino)metil)benzoata (38)

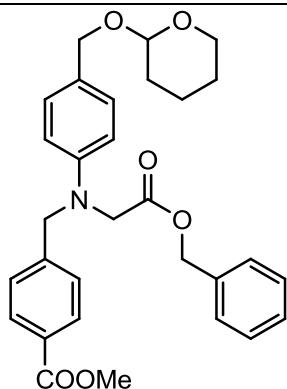
- a) Spojini **37** (3,0 g, 18,27 mmol) in **35** (4,78 g, 18,27 mmol) smo raztopili v 100 mL metanola. Nato smo dodali natrijev cianborhidrid (1,377 g, 21,9 mmol) in mešali pri sobni temperaturi 72h. Nato smo odparili metanol ter zmes raztopili v 100 mL etil acetata, ki smo ga spirali z 50 mL vode in 50 mL nasičene raztopine NaCl. Etil acetat smo nato odparili ter zmes očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/heksan 1/4). Dobili smo 1,7 g spojine **38**.
- b) Poskusili smo tudi sintezo z uporabo natrijevega triacetoksiborhidrida v ocetni kislini in 1,2-dikloroetanu, vendar nam reakcija ni uspela.

	Izgled: rjavo olje Izkoristek reakcije: 25 % T _{tač} : / TLC: R _f (CH ₂ Cl ₂ /M= 40/1) = 0,38 R _f (EtOAc/heksan = 1/4) = 0,05	
¹H NMR DMSO-d₆	δ [ppm] = 1,43-1,70 (m, 6H, CH ₂ -CH ₂ -CH ₂), 3,42-3,47 (m, 1H, AB sistem, H _A od CH ₂ -O), 3,74-3,81 (m, 1H, AB sistem, H _B od CH ₂ -O), 3,83 (s, 3H, CH ₃), 4,22 (d, 1H, J=11,4 Hz, AB sistem, H _A od Ar-CH ₂), 4,35 (d, 2H, J=6,0 Hz, CH ₂ -NH), 4,47(d, 1H, J=11,4 Hz, AB sistem, H _B od Ar-CH ₂), 4,59 (br s, 1H, O-CH), 6,73 (t, 1H, J=7,5 Hz, Ar-NH), 6,52 (d, J=8,4 Hz, 2H, Ar-H'), 7,01 (d, J=8,4 Hz, 2H, Ar-H'), 7,48 (d, J=8,1 Hz, 2H, Ar-H), 7,91 (d, J=8,1 Hz, 2H, Ar-H)	
IR (NaCl)	v [cm ⁻¹] = 3350, 2944, 2832, 2523, 2044, 1723, 1612, 1449, 1282, 1115, 1032, 881, 814, 753, 468	
MS (ESI⁺)	m/z (%) = 356,2 (28,[M+H] ⁺), 254,1 (100)	
MS (HRMS)	Izračunana vrednost za C ₂₁ H ₂₆ NO ₄ ([M+H] ⁺)	356,1862
	Izmerjena vrednost	356,1867

CHN	Izračunana vrednost	C, 70,96; H, 7,09; N, 3,94
	Preračunano na 0,1 heksana	C, 71,26; H, 7,31; N, 3,85
	Izmerjena vrednost	C, 70,85; H, 7,66; N, 4,00

4.6.7 Poskus sinteze metil 4-((2-(benziloksi)-2-oksoetil)(4-((tetrahidro-2H-piran-2-ilksi)metil)fenil)amino)metilbenzoata (39)

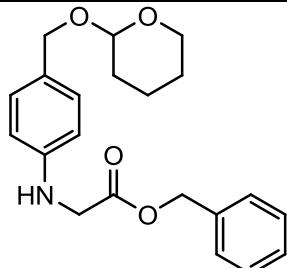
- a) Spojino **38** (100 mg, 0,28 mmol) smo raztopili v 5 mL DMF, dodali benzil bromoacetat (44 µL, 0,29 mmol), kalijev karbonat (116 mg, 0,84 mmol) in BTEAC (64 mg, 0,28 mmol). Bučko smo opremili s povratnim hladilnikom z balonom argona ter mešali pri 70 °C 24h. Na TPK kromatogramu nismo opazili nič obetavnega, spojine pa prav tako nismo mogli izolirati.
- b) Poskusili smo z zamenjavo topila in DMF zamenjali z acetonitrilom, poleg tega pa smo dodali 2 ekvivalenta ustreznega alkil bromida. Na kromatogramu se je pojavila lisa, ki je imela v različnih mobilnih fazah skoraj enak R_f kot izhodna spojina, zato je nismo mogli izolirati.
- c) Reakcijsko zmes iz b) smo nato postavili v mikrovalovni reaktor (100 °C, 60 min) in dobili več lis na TPK kromatogramu. Topilo smo odparili in zmes poskušali ločiti s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/PE = 1/4). Ena izmed lis smo izolirali, vendar z analiznimi metodami nismo mogli potrditi strukture želene spojine **39**.
- d) Poskusili smo še s postopkom, da smo spojino **38** (100 mg, 0,28 mmol) raztopili v 5 mL DMF, dodali benzil bromoacetat (65 µL, 0,42 mmol) in N,N-diizopropiletilamin (68 µL, 0,42 mmol), ter zmes postavili v mikrovalovni reaktor (70 °C, 40 min). Reakcija ni potekla, saj sta bili vidni le lisi bromida in izhodne spojine.
- e) Spojino **38** (100 mg, 0,28 mmol) smo raztopili v 3 mL DMF, prepahali z argonom in ohladili na 0 °C. Nato smo dodali natrijev hidrid (7,4 mg, 0,31 mmol) in benzil bromoacetat (44 µL, 0,29 mmol). Ker po 20 min še ni zreagirala vsa izhodna spojina, smo dodali še 1 ekvivalent NaH in pustili mešati še 20h pri sobni temperaturi. Na TPK kromatogramu nismo opazili nobene lise produkta, zato spojine nismo izolirali.



Struktura formula pričakovanega produkta

4.6.8 Poskus sinteze benzil 2-(4-((tetrahidro-2H-piran-2-iloksi)metil)fenilamino)acetata (40)

Spojino **35** (100 mg, 0,48 mmol) smo raztopili v 5 mL DMF, dodali benzil bromoacetat (84 µL, 0,53 mmol) in N,N-diizopropiletilamin (88 µL, 0,53 mmol), opremili s povratnim hladilnikom in balonom argona ter mešali 20 h pri 70 °C. Naslednji dan smo odparili DMF, zmes raztopili v 25 mL etil acetata in spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (25 mL), vodo (25 mL) in nasičeno raztopino NaCl (25 mL). Sušili smo z natrijevim sulfatom in topilo odparili pod znižanim tlakom. Zmes smo poskušali očistiti s kolonsko kromatografijo (MF = CH₂Cl₂/MeOH = 40/1), vendar smo dobili nečiste frakcije, poleg tega pa je bil tudi izkoristek reakcije zelo slab.



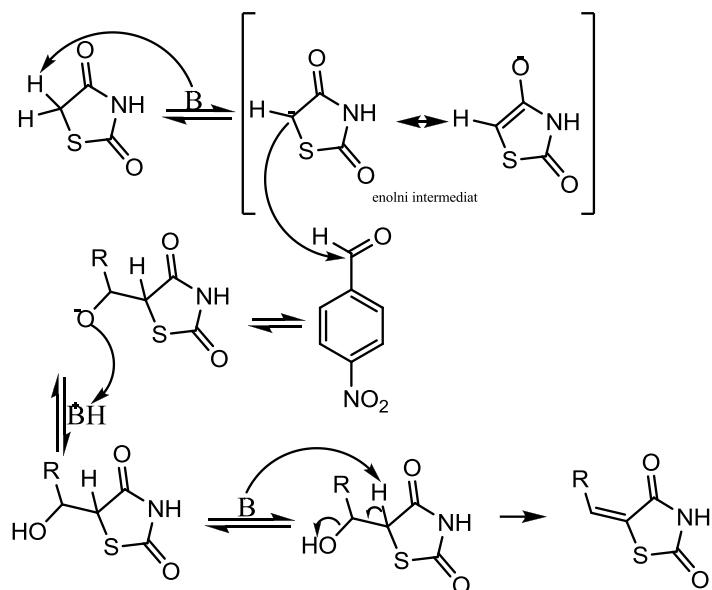
Struktura formula pričakovanega produkta

5 RAZPRAVA

5.1 Razprava o sintezah

5.1.1 Knoevenaglova kondenzacija

Pri sintezi spojine **1** smo za postopek uporabili Knoevenagelovo kondenzacijo (Slika 15). Ta poteka v šibko bazičnem (v prisotnosti piperidina) ali v nevtralnem mediju (katalizirana s pomočjo piperidinijevega acetata). Bazičnost piperidina oz. acetatnih ionov je dovolj velika, da odvzame proton aktivirani metilenski skupini z dvema elektron privlačnima skupinama (v našem primeru je to žveplov atom (oz. dušikov atom pri hidantoinu) in karbonilna skupina). Metilenska skupina nato kot nukleofil napade karbonilno skupino aromatskega aldehida, čemur sledi eliminacija vode in nastanek dvojne vezi med dvema ogljikovima atomoma. Pri sintezah spojin **13** in **17** smo uporabili postopek z uporabo amonijevega ali natrijevega acetata v ledoctu, vendar sta reakciji prav tako potekali dobro. Pri tem postopku je težava le v tem, da se ne moremo popolnoma znebiti ocetne kisline, ki je nekaj kljub sušenju pri povišani temperaturi še vedno ostane v produktu. Reakcije tega tipa potekajo dokaj hitro in z dobrimi izkoristki, ugodno pa je tudi, ker se produkt večinoma obori, kristali pa so dokaj čisti, zato navadno ni potrebno nadaljnje čiščenje spojine. Knoevenagelove kondenzacije prav tako odlično potekajo v mikrovalovnem reaktorju, v katerem bi potekle še v krajšem času.



Slika 15: Mehanizem Knoevenagelove kondenzacije.

5.1.2 Redukcija nitro skupine

V sklopu diplomske naloge smo v začetku sinteze uporabili različne spojine z nitro skupino na benzenovem obroču. Nitro skupina se lahko enostavno pretvori v amino skupino z redukcijo, poleg tega pa bi nam začetne spojine s prisotno aminsko skupino povzročale težave (polimerizacija v primeru aminobenzaldehida oziroma dodaten nukleofil v primeru aminobenzilnega alkohola).

V primeru, da spojina ni imela žveplovih atomov (sinteza spojin **18**, **26** in **35**) smo izvedli katalitsko hidrogeniranje s paladijem, adsorbiranim na ogljiku. Take reakcije potekajo hitreje, večja kot je površina, na kateri je vezan katalizator. S potekom reakcij ni bilo težav, le pri sintezi spojine **35** je reakcija potekala zelo počasi v primeru, ko smo imeli bučko opremljeno z balonom vodika. Verjetno je bil razlog v tem, da nismo mogli ustvariti dovolj velikega nadtlaka, da bi redukcija potekla. Zato smo zmes prenesli v Parrov hidrogenator ter redukcijo izvedli pri 10 bar nadtlaka vodika. Že po 20 min se je glede na velik padec nadtlaka lahko sklepalo, da reakcija poteka (padec nadtlaka je posledica porabe vodika), vseeno pa smo pustili reakcijo teči še čez noč in naslednji dan dobili želeno spojino v dokaj visokem izkoristku.

Spojine, ki so vsebovale žveplo (**2**, **14**), smo morali reducirati s kositrovim(II) kloridom, saj ob uporabi katalitskega hidrogeniranja žveplo zastrupi katalizator in reakcija poteče zelo slabo. Spojino **2** smo sicer poskusili sintetizirati z uporabo katalitskega hidrogeniranja, vendar je bil izkoristek reakcije izredno slab, poleg tega pa je nastajalo še nekaj dodatnih nečistot, zato smo redukcijo raje izvedli s kositrovim(II) kloridom v etanolu. Sama reakcija je enostavna in poteka sicer hitreje kot klasično katalitsko hidrogeniranje, težave pa se pojavijo pri izolaciji spojine. Potem ko odparimo etanol, suhi zaostanek suspendiramo v nasičeni raztopini NaHCO_3 , kar povzroči, da se zmes močno peni. Po dodatku etil acetata zaradi penjenja in močnega obarvanja suspenzije tudi težko natančno vidimo, kje je meja med fazama, zato je ekstrakcija dokaj zahtevna. Zaradi slabe topnosti spojine v organski fazi pa moramo zmes med ekstrakcijo tudi segrevati z žarilno pištolo, da dobimo čim večji izkoristek.

5.1.3 Reduktivno aminiranje

Povezano med dvema aromatskima obročema v končni spojni smo tvorili s pomočjo reduktivnega aminiranja (Slika 16). Največkrat smo reakcijo izvedli na klasičen način z

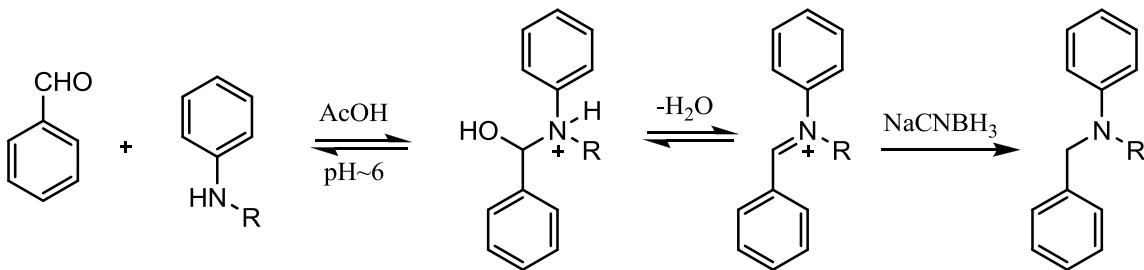
NaCNBH₃ v metanolu (sinteza spojin **6**, **9**, **19**, **22**, **28**, **29**, **38**). Reduktivno aminiranje je najbolj enostavna reakcija za tvorbo sekundarnih aminov iz aldehyda in amina. Reakcijo je sicer možno izvesti v dveh korakih, če je vmesni iminski intermediat stabilen, vendar je bolj enostavno če reakcijo izvedemo v le enem koraku. Natrijev cianborhidrid (ki je šibkejši reducent kot NaBH₄ zaradi elektron privlačne ciano skupine) namreč selektivno reducira iminijev ion, izhodne karbonilne skupine pa ne. Reakcije imajo najboljši izkoristek pri pH~6 (kar dosežemo z dodatkom ledocta), saj je pri tem pH-ju imin v ravnotežju z iminijevim ionom, ki se hitro reducira do amina s cianborhidridom.

Velikokrat se je zgodilo, da izhodni amin ni bil dovolj dobro topen v metanolu. Takrat smo zmes najprej refluktirali, da se je večina amina raztopila in zreagirala do imina, nato zmes ohladili in dodali reducent. Kadar smo sintetizirali sekundarni amin, je reakcija navadno potekala z dokaj dobrimi izkoristki pri spojinah **6**, **9**, **22** in **29**. Slabši izkoristek (okoli 25 %) pa je bil pri spojini **19** (verjetno posledica neučinkovitega čiščenja spojine) in pri spojini **38**, saj smo po čiščenju s kolonsko kromatografijo izolirali še 50 % izhodnega amina, kar je verjetno posledica njegove slabše reaktivnosti. Spojino **38** smo zato želeli sintetizirati po drugem postopku z uporabo natrijevega triacetoksiborhidrida v ledocu in 1,2-dikloroetanu, vendar je reakcija potekala še slabše kot v metanolu z natrijevim cianborhidridom.

Tudi spojino **15** smo želeli sintetizirati z uporabo klasičnega reduktivnega aminiranja, vendar je reakcija potekala izredno počasi Izmed vseh aminov je bila spojina **14** tudi najslabše topna, saj se tudi ob refluku in dodatku nekaj kapljic DMF-a ni popolnoma raztopila. Morda je bil to razlog za slabši potek reakcije. Ker reakcija ni potekala, smo poskusili s postopkom v trifluoroocetni kislini (TFA) z natrijevim triacetoksiborhidridom kot reducentom. Tu je reakcija potekla dokaj hitro, ob nadaljnji optimizaciji pa bi verjetno lahko dosegli tudi boljše izkoristke.

Z reduktivnim aminiranjem smo poskusili tudi pri sintezi spojine **28**. Reakcija ni potekla, kljub temu da smo na koncu reakcijsko zmes celo več dni refluktirali. Dejstvo je, da so anilinski derivati, s katerimi smo izvajali reduktivno aminiranje, dokaj slabo reaktivni, pri sintezi spojine **28** pa smo imeli opravka še s sekundarnim aminom. Tu je lahko prišlo do dodatnih steričnih ovir, zaradi elektron privlačne karbonilne skupine na *para* mestu, pa se je tudi dodatno znižala gostota elektronov na dušiku in s tem nukleofilnost le tega, kar skupaj privede do slabe reaktivnosti. Za sintezo spojine **28** bi se splačalo uporabiti postopek s TFA.

V primeru, da bi tu reakcija potekla, bi tako dobili fragment končne spojine, ki bi ga lahko pretvorili do spojin, ki bi bile alkilirane na dušikovem atomu, kar smo si v sinteznem načrtu tudi zastavili kot cilj. Lahko pa bi poskusili reduktivno aminiranje s sekundarnim aminom, ki bi ga naredili iz spojine **35**, ki na *para* mestu nima elektron privlačne skupine in bi bil verjetno bolj reaktivni kot spojina **27**.



Slika 16: Splošna shema reduktivnega aminiranja, katalizirana z ocetno kislino.

5.1.4 Aciliranje

Aciliranje smo izvajali pri sintezi spojin **7**, **12**, **21** in **31**. Pri prvih dveh spojinah smo želeli s kislinskim kloridom uvesti stransko verigo na dušikov atom. Aciliranje je eden izmed enostavnnejših postopkov za tvorbo amida med kislinskim kloridom in aminom. Reakcije smo izvajali v N,N-dimetilformamidu z dodatkom prebitka trietylamina, ki je vezal HCl, ki se je sproščal ob poteku reakcije. V splošnem aciliranja potekajo zelo hitro in z visokimi izkoristki, v našem primeru pa smo reakcije izvajali tudi po več dni in celo zmes segrevali, da bi dobili čim več želenega produkta. Sekundarni amin v naših spojinah je dokaj sterično oviran z dvema velikima skupinama na vsaki strani, verjetno pa je tudi njegova nukleofilnost slaba, zato je kinetika reakcije zelo počasna. Kljub temu smo z aciliranjem prišli do načrtovanih spojin.

Pri sintezi spojine **21** smo želeli z acetanhidridom uvesti zaščitno skupino na fenolno OH skupino. Zdela se je sicer, da je reakcija potekla, saj je TPK kromatogram kazal na kvantitativen potek reakcije, ko pa smo razvili kromatogram še po izolaciji spojine, se je pojavila močna lisa izhodne spojine, ki jo prej ni bilo. Spojine zato nismo izolirali, prav tako pa zaradi pomanjkanja izhodne spojine nismo poskušali zamenjati zaščitno skupino za katero drugo. Esterska zaščita na fenolni OH skupini ima to dobro lastnost, da bi jo z alkalno

hidrolizo v zadnjem koraku odstranili skupaj z metilnima estroma na glutaminski kislini in bi tako dobili končno spojino v enem koraku.

5.1.5 Alkiliranje

Pri načrtovanju dela v sklopu diplomske naloge smo hoteli priti do več derivatov že znanih inhibitorjev ligaz MurD, ki bi imeli na anilinskem dušiku pripeto alkilno verigo, ki bi lahko z encimom tvorila dodatne ionske ali vodikove vezi. Na dušik smo želeli pripeti 2-karboksimetilni, 2-hidroksietilni oz. 2-fosfonoetilni fragment. Pri eksperimentalnem delu smo sintetizirali spojini **10** in **27** ter poskušali sintetizirati spojine **30**, **39** in **40**.

Na začetku se je zdela ideja alkiliranja enostavna, saj bi že znan inhibitor sintetizirali po objavljenem postopku, v predzadnji stopnji pred alkalno hidrolizo pa bi na dušik enostavno vezali alkilno verigo. To smo poskusili pri sintezi spojine **10**, vendar se je izkazalo, da je alkiliranje poteklo na imidni dušik namesto aminskega, kot smo predvidevali. Razlog je v tem, da je imidni dušik manj sterično oviran, poleg tega pa tudi bolj kisel, da mu z bazo (N,N-diizopropiletamin) odcepimo proton ter tako dobimo še boljši nukleofil. Zato smo tak sintezni potek opustili, saj nam ni dal pričakovanih rezultatov.

Zaradi tega smo se odločili, da bomo heterociklični obroč pripeli v zadnji stopnji reakcije, prej pa bomo na dušik pripeli stransko verigo. To smo poskušali pri sintezi spojine **30**. Tu smo poskušali z različnimi postopki ter tudi uporabo mikrovalovnega reaktorja, vendar uspeha ni bilo. Poleg tega, da je bil dušik sterično oviran, je imela izhodna spojina na *para* mestu tudi elektron privlačno skupino, ki znižuje nukleofilnost amino skupine, kar je verjetno razlog, da reakcija ni potekla. Pri sintezi spojine **27** smo tudi alkilirali dušik v prisotnosti elektron privlačne skupine na *para* mestu. Tu je monoalkiliranje potekalo dobro, medtem ko dialkiliran produkt ni nastajal v opazni meri, kljub temu, da je bil ustrezen alkilhalogenid v prebitku. Če bi reakcijo izvajali s kakšnim bolj reaktivnim aminom, bi lahko pričakovali večji delež dialkiliranega produkta.

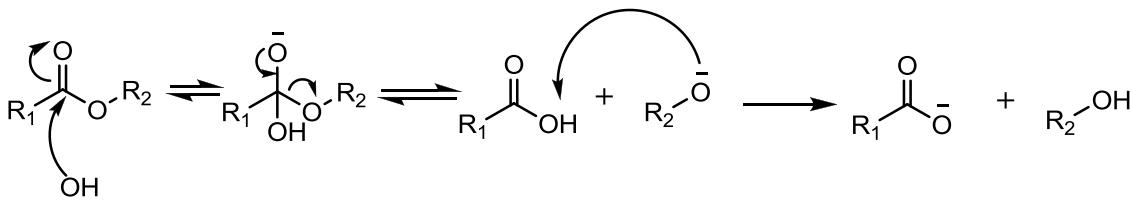
Zato smo nato poskušali zamenjati zaščito aldehidne skupine. Odločili smo se za uvedbo tetrahidropirilanljive zaščite, ki bi jo lahko v enem koraku pretvorili do aldehyda. Tako smo dobili ugodno zaščitno skupino, ki je bila po elektronskih lastnostih veliko bolj ugodna za alkiliranje na dušiku. Tudi na drugi strani smo pripeli le fenilni obroč brez glutaminske kisline, tako da so bile sterične ovire čim manjše. Ker smo želeli imeti zaščitne skupine iz različnih

ortogonalnih setov zaradi poteka nadalnjih reakcij, smo pri poskusu sinteze spojine **39** uporabili benzil bromoacetat kot reagent. Poskusili smo z različnimi postopki v različnih topilih ter tudi z uporabo mikrovalovnega reaktorja, vendar brez uspeha. Iz naših poskusov je očitno, da so sekundarni aromatski amini izredno slabo reaktivni ter da na tak način ni možno priti do želenih produktov.

Poskušali smo sintetizirati tudi spojino **40**. Sinteza nam je uspela, vendar spojine nismo mogli izolirati, saj je ostalo nekaj izhodne spojine in nastalo nekaj nečistot, ki so imele podobne R_f kot produkt, tako da nismo uspeli očistiti produkta. V primeru, da bi dobili čisto spojino **40**, bi lahko poskusili z reduktivnim aminiranjem te spojine, kar bi nam mogoče dalo terciarni amin, na spojino pa bi potem postopoma pripeli še manjkajoče fragmente.

5.1.6 Alkalna hidroliza

Zadnja stopnja pri sintezi končnih spojin **8**, **11**, **16**, **21** in **23** je bila alkalna hidroliza. Z uporabo litijevega hidroksida v mešanici organskega topila in vode smo hidrolizirali esterske skupine na spojinah (Slika 17). Za bazo smo uporabili LiOH zato, ker je NaOH premočna baza in bi lahko odvzela proton na α mestu glutaminske kisline in tako povzročila racemizacijo spojine. Alkalne hidrolize so potekale z dobrimi izkoristki. Težava je bila le pri čiščenju spojine, saj smo večino spojin morali očistiti s kolonsko kromatografijo z mobilno fazo, ki je vsebovala ocetno kislino, saj drugače spojin zaradi visoke polarnosti nismo mogli eluirati iz kolone. Ocetne kisline smo se potem pri sušenju spojine težko znebili, zato je motila tudi rezultate analiz, predvsem elementno analizo (CHN).



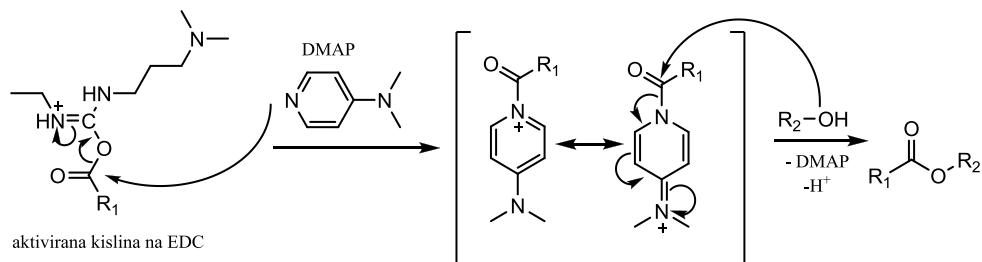
Slika 17: Splošna shema alkalne hidrolize.

5.1.7 Tvorba estra

Estre smo sintetizirali z namenom, da zaščitimo karboksilne skupine v spojini, ki bi drugače lahko motile sam potek reakcij. Metilne estre v spojinah **3** in **37** smo sintetizirali s pomočjo tionil klorida v metanolu. Tionil klorid v prvi stopnji najprej pretvori karboksilno kislino v

kislinski klorid in ji tako poveča elektrofilnost. V drugi stopnji pa se z metanolom tvori ester. Tionil klorid povzroča težave pri izolaciji spojine, saj se ga je težko znebiti, v reakcijsko zmes pa ga dodamo v prebitku. Predvsem pri izolaciji spojine **3** smo imeli veliko težav, saj je nastala voskasta zmes, ki nikakor ni hotela kristalizirati, kljub večkratnem spiranju z etrom, drgnjenju s stekleno palčko in uporabo vakuumsko črpalko. Kristalizacija je potekla šele potem, ko smo v zmes dodali nekaj kristalov že prej sintetizirane spojine. Pri sintezi spojine **37** pa nam je težave povzročal nastanek dimetil acetala na aldehidu. Dimetil acetali se sicer sintetizirajo z uporabo *p*-toluensulfonske kisline v metanolu, očitno pa je tionil klorid ozioroma HCl, ki nastaja pri reakciji, tudi dovolj dober katalizator za sintezo acetala. Če smo reakcijo izvajali 24h, je nastalo približno 15 % acetala. Zaradi tega je tudi spojina **37** komaj kristalizirala, nižje pa je bilo tudi tališče.

Še prej smo želeli namesto metilnega estra tvoriti *t*-butilni ester na 4-karboksibenzaldehydu (**36**), saj bi tako lahko alkilirali z etil bromoacetatom namesto benzilbromoacetata, ker bi imeli zaščitne skupine iz različnih ortogonalnih setov. Najprej smo poskusili s klasičnim kislinsko kataliziranim estrenjem z žveplovo(VI) kislino. V zmes smo dodali tudi prebitno količino MgSO₄, ki je vezal vodo, ki nastaja pri tvorbi estra. Tako je bilo ravnotežje pomaknjeno v nastanek produktov. Po predpisu smo potem dodali nasičeno raztopino NaHCO₃, da bi se raztopil MgSO₄, vendar se to ni zgodilo. Dobili smo mlečnato raztopino, kjer smo težko opazili 2 fazi. Vseeno smo poskušali ločiti fazi in nato sušili organsko fazo z natrijevim sulfatom. Dobili smo le nekaj nečistega produkta z ogromno natrijevega sulfata. Izolacijo bi morali izvesti na drugačen način, kot jo je narekoval predpis, saj bi bilo bolje, da bi takoj odfiltrirali MgSO₄ ter šele potem šli v ekstrakcijo. V drugem primeru pa smo poskusili ester tvoriti s pomočjo EDC in DMAP. EDC se uporablja za aktivacijo karboksilne skupine, DMAP pa služi kot prenasalec aktiviranih acilnih derivatov (Slika 18). Tudi tu je reakcija potekala izredno slabo (manj kot 10% izkoristek, zato smo raje sintetizirali metilni ester).

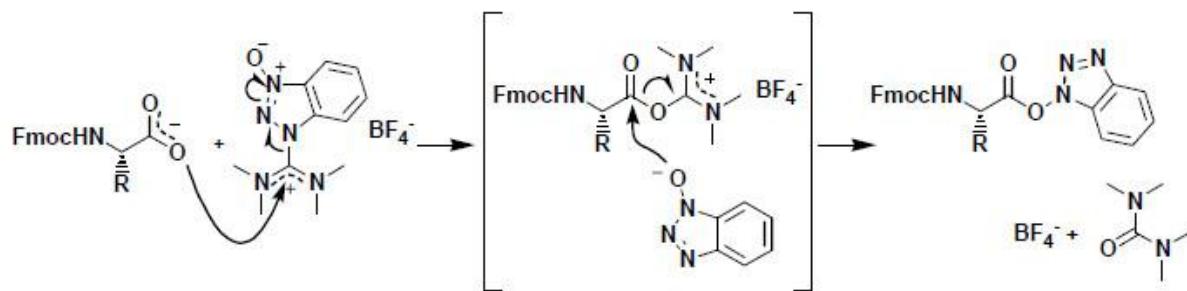


Slika 18: Metoda estrenja z uporabo EDC in DMAP kot katalizatorja.

5.1.8 Tvorba amidne vezi

Spojino **5** smo sintetizirali s pomočjo TBTU iz ustrezne karboksilne kisline in amina (»coupling«), kar je pomemben način tvorbe amidnih vezi, največ pa se uporablja v sintezi peptidov (Slika 19). Poleg metode s TBTU poznamo tudi metodo s karbodiimidom in HOBr. Prosta karboksilna kislina tvori s karbodiimidom ustrezeno O-acil sečnino. Tako povečamo elektrofilnost karbonilnega ogljika. Problem karbodiimidov je v tem, da so preveč reaktivni, zato lahko pride do racemizacije aminokisline ali pa do nastanka stranskih produktov. Reakcijski zmesi zato dodamo HOBr, ki takoj reagira z O-acil sečnino, pri čemer nastanejo manj aktivirani estri, ki so sicer še zmeraj dovolj reaktivni, da zreagirajo z aminom do želenega amida, vendar iz njih ne nastanejo stranski produkti.

TBTU spada v novejšo skupino reagentov uronijskega tipa, ki za aktivacijo karboksilne kisline ne potrebuje karbodiimida. Proses aktivacije poteka preko resonančno stabiliziranega intermediata, na koncu pa dobimo aktiviran ester z enako strukturo kot pri metodi s HOBr prek nukleofilnega napada 1-hidroksibenzotriazola na karbonilni atom, obenem pa se sprosti še stabilna izstopajoča spojina (tetrametilsečnina). V naslednji stopnji aktivirano karboksilno skupino napade nukleofil (amin), tako da dobimo amidno vez.



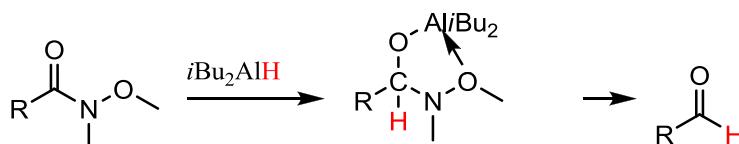
Slika 19: Metoda tvorbe amidne vezi z TBTU.

5.1.9 Sinteza Weinrebovega amida in njegova odščita

Weinrebovi amidi so amidi, ki jih sintetiziramo iz ustrezne kisline ter O,N-dimetilhidroksilamina. Da so izkoristki boljši, se največkrat uporabljajo aktivirani derivati karboksilnih kislin (kislinski kloridi) oz. v primeru sinteze spojine **24** EDC. Metoda aktivacije s karbodiimidom je opisana že v opisu tvorbe amidne vezi. Zraven dodamo še bazo (N-metilmorfolin), ki nevtralizira sproščeni HCl. Reakcija je potekla z dobrim izkoristkom.

Več težav smo imeli z redukcijo Weinrebovega amida. Te se naj bi enostavno z uporabo reducenta diizobutilaluminijevega hidrida (DIBAL) pretvorili v ustrezen aldehid prek vmesnega tetraedričnega intermediata, stabiliziranega s keliranjem (Slika 20). Težava pa je, ker je DIBAL premočan reducent in bi poleg Weinrebovega amida reduciral tudi estre. Zato smo poskusili z uporabo šibkejšega reducenta litijevega tritercbutoksialuminijevega hidrida. Medtem ko nam reakcija v diklorometanu pri sobni temperaturi ni uspela, je reakcija v THF-u in segrevanju pri 75 °C uspela, da smo dobili enostaven aldehid **25**. Nato smo na aminsko skupino pripeli metil malonilni fragment ter poskusili izvesti reakcijo v THF in pri 75 °C. Želenega produkta **32** nismo dobili, je pa nastalo več lis stranskih produktov.

Glede na vse ugotovitve (slaba nukleofilnost aminske skupine zaradi elektronskega efekta Weinrebovega amida na *para* mestu ter težave z redukcijo) lahko trdimo, da Weinrebov amid ni bil najbolj primerna izbira kot predstopnja za aldehidno skupino, ki bi jo dobili po redukciji Weinrebovega amida.



Slika 20: Redukcija Weinrebovega amida do aldehyda z DIBAL.

5.1.10 Tvorba in poskus odščite tetrahidropiranilne skupine

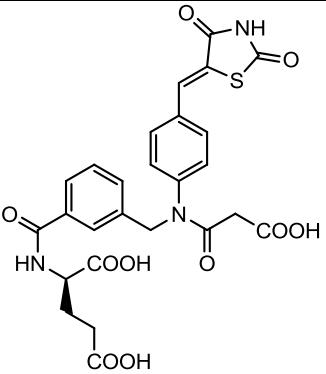
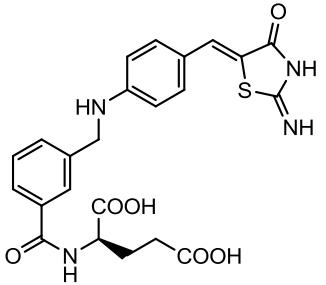
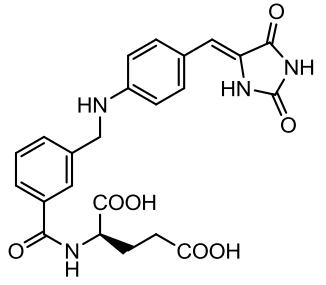
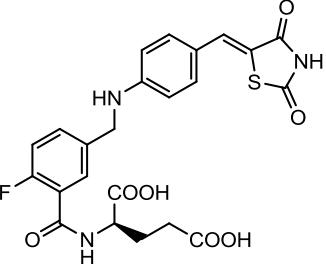
Glede na prej omenjen neuspeh pri poskusu sinteze prek Weinrebovega amida smo zato poskusili z drugačnim pristopom z uporabo 4-nitrobenzilnega alkohola kot izhodne spojine, ki smo ga z dihidropiranom (DHP) pretvorili v derivat s tetrahidropiranilno zaščitno skupino **33**. Sama reakcija je bila izjemno hitra, saj je potekla že v 10 min z uporabo *p*-toluensulfonske kislinske kot katalizatorja. Reakcijo smo sicer izvedli dvakrat, ker je v predpisu pisalo, da naj reakcijo izvajamo s petkratnim prebitkom DHP. Po končani reakciji pa se prebitnega DHP nismo mogli znebiti (ne z ekstrakcijo, zelo slabo tudi z odparevanjem, poskusili smo tudi, da bi prebitni DHP reagiral z glikolno kislino, produkt pa bi nato enostavno ekstrahirali, vendar tu reakcija ni potekala). Zato smo poskus ponovili, tokrat z 1,2 ekvivalenta DHP in reakcija je bila prav tako hitra ter je potekla z zelo dobrim izkoristkom.

Tetrahidropiranilna zaščita je bila zanimiva predvsem iz razloga, da jo lahko z oksidativno odščito pretvorimo v enem koraku do aldehyda. V literaturi smo zasledili več postopkov za

potek reakcije ter poskusili z izvedbo s kromovim(VI) oksidom na vlažnem aluminijevem oksidu (**34**). V predpisu (19) smo zasledili, da so reakcijo izvajali na identični spojini, kot smo jo imeli sami ter da je reakcija potekala izredno hitro (nekaj minut). Kljub temu nam reakcija ni potekla in glede na to, da smo potem imeli težave pri alkiliranju oz. reduktivnem aminiranju sekundarnih aminov pa z drugimi postopki (21) niti nismo poskušali.

5.2 Rezultati biološkega testiranja z razpravo

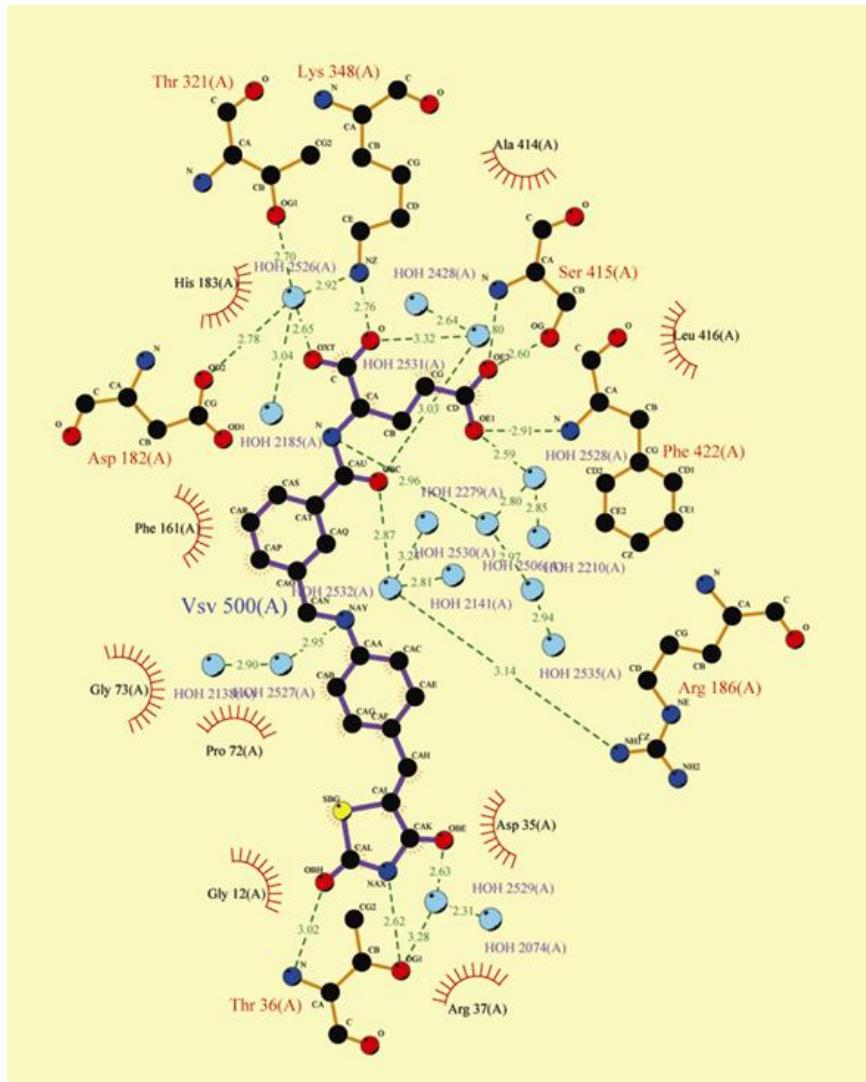
Tabela 1: Rezultati biološkega testiranja inhibitorjev na ligazo MurD (Biološka testiranja je izvedla dr. Andreja Kovač, mag. farm.).

Struktura spojine	oznaka	Koncentracija inhibitorja (μM)	RA % MurD (IC_{50})
	8	500	10 ($\text{IC}_{50}=15 \mu\text{M}$)
	16	500	85
	20	500	99
	23	500	71

V tabeli 1 so prikazani rezultati biološkega testiranja končnih spojin **8**, **16**, **20** in **23** na encim MurD. Sinteza končne spojine **11** nam ni uspela, saj po alkalni hidrolizi v zadnji stopnji nismo uspeli izolirati želenega produkta, zato tudi nimamo rezultata biološkega testiranja za to spojino. Rezultate biološkega testiranja podamo v obliki rezidualne aktivnosti (RA), ki pomeni razmerje med katalitično aktivnostjo encima v prisotnosti inhibitorja in katalitično aktivnostjo encima brez prisotnosti inhibitorja. Manjša kot je rezidualna aktivnost pri dani koncentraciji, v večji meri spojina (inhibitor) upočasni encimsko reakcijo. Spojini **8**, ki je izkazala odlično inhibitorno aktivnost na ligazi MurD, smo določili še vrednost IC₅₀. Z IC₅₀ merimo jakost spojine pri inhibiranju določenega biološkega oziroma biokemijskega procesa. Ta vrednost nam kvantitativno pove, kolikšna mora biti koncentracija določenega inhibitorja, da se hitrost encimskega procesa zmanjša za polovico.

Uspelo nam je torej sintetizirati 2 spojini, pri katerih smo bioizosterno zamenjali heterociklični rodaninski obroč (spojni **16** in **20**), spojino s fluoro substituiranim benzilnim obročem (**23**) in spojino, acilirano na vmesnem dušikovem atomu (**8**). Spojine z alkiliranim vmesnim dušikovim atomom na žalost nismo mogli pripraviti kljub uporabi različnih postopkov, saj smo predvidevali, da bi ta spojina imela podobno aktivnost kot aciliran derivat **8**. Za spojino, ki se nam je alkilirala na obročnem dušiku rodaninskega obroča (**11**) nismo pričakovali posebne biološke aktivnosti, saj smo pri načrtovanju s sidranjem opazili, da substitucija obročnega rodaninskega dušika ni ugodna, saj v aktivnem mestu ni prostora za dodatno alkilno verigo na tem mestu, poleg tega pa dušikov atom sodeluje pri interakciji z encimom z vodikovo vezjo.

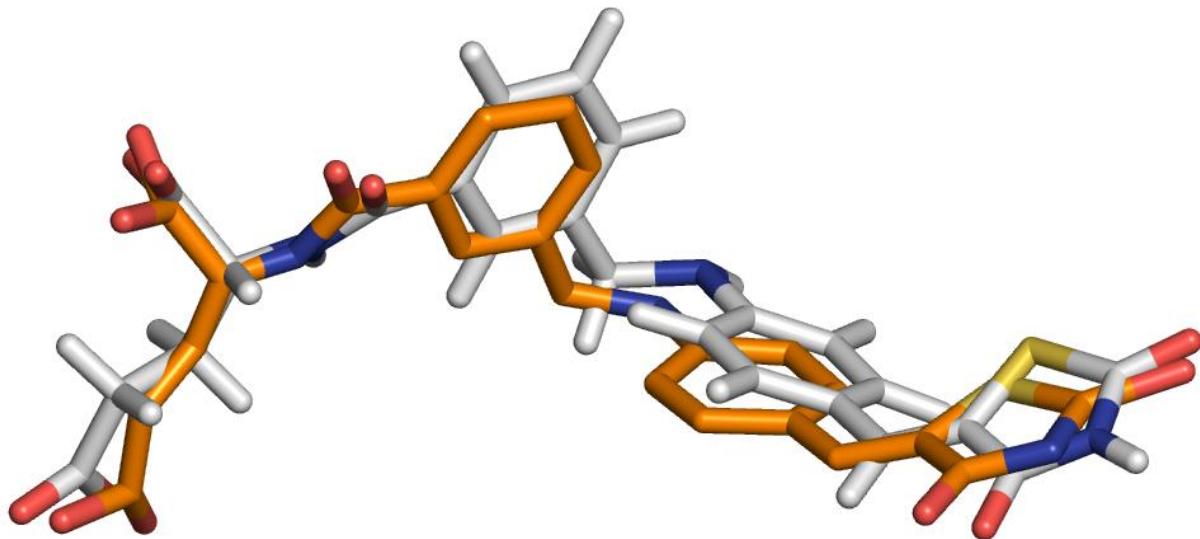
Poleg biološkega testiranja smo opravili tudi sidranje inhibitorjev v aktivno mesto MurD v *E. coli*. Za sidranje smo uporabili kristalno strukturo kompleksa MurD s spojino **II** (PDB: 2X5O), ki so jo sintetizirali Zidar in sodelavci (Slika 21) (17).



Slika 21: LIPGLOT shema inhibitorja II v kompleksu z aktivnim mestom MurD iz *E. coli* (17).

Spojine za sidranje smo narisali v programu Sybyl8.0 in minimizirali njihovo energijo z molekulske mehaniko. Sidranje spojin smo naredili s programom Gold, ki uporablja genetski algoritem za umeščanje spojin v aktivno mesto encima. V Gold-u pripravimo tudi protein pred sidranjem: iz aktivnega mesta zbrišemo vse ligande (v tem primeru inhibitor II in molekule vode), AK ostankom dodamo vodikove atome in aktivno mesto določimo v obsegu 10 Å okoli liganda (inhibitorja v našem primeru). Vsako spojino sidramo 100 krat in rešitve sidranja rangiramo na osnovi celične funkcije GoldScore. Iz izračunane konformacije in lege liganda v aktivnem mestu je razvidno, da je program primeren za sidranje takih spojin, saj je izračunana

konformacija inhibitorja **II** zelo podobna tisti iz kristalne strukture kompleksa MurD-**II**. (Slika 22)

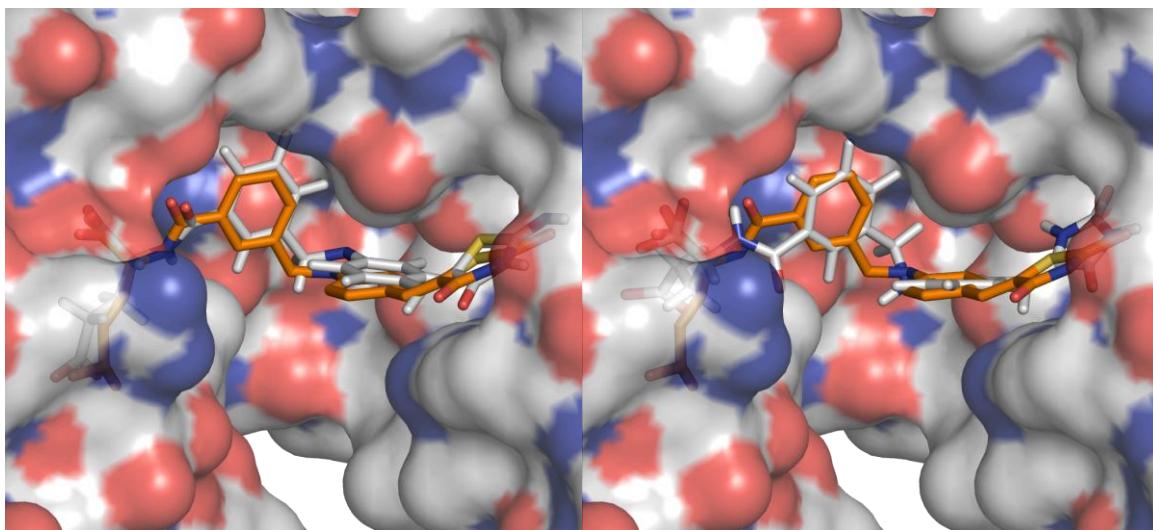


Slika 22: Primerjava konformacije inhibitorja **II** iz kristalne strukture (oranžen) in izračunane konformacije s programom Gold (bel).

Vrednost cenzilne funkcije za inhibitor **II** je 90,55. Spojine, ki so bile praktično neaktivne **16**, **20** in **23** imajo sicer primerljivo, a nižjo vrednost cenzilne funkcije (83-89), najbolj aktivna spojina **8** pa ima vrednost 95,77. Ti rezultati kažejo na dobro napovedno vrednost cenzilne funkcije GoldScore, tako da lahko *in silico* načrtujemo nove optimizirane inhibitorje.

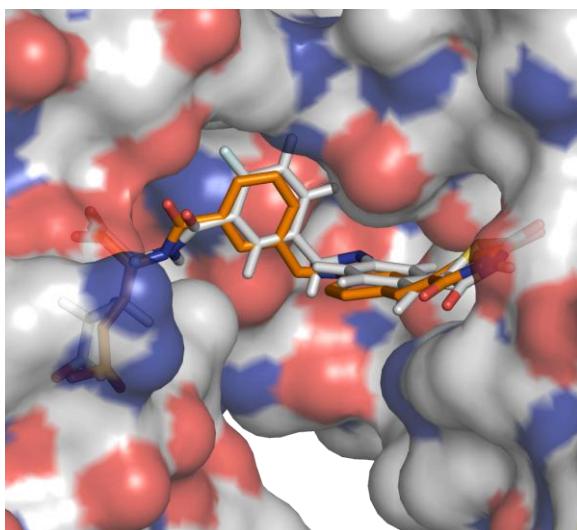
Spojine **16**, **20** in **23** so neaktivne, saj so njihove rezidualne aktivnosti v območju 71-99%. Heterociklični obroč je bioizosterna zamenjava uracilnega dela UAG. Rezultati testiranja že znanih inhibitorjev so pokazali, da daje bioizosterna zamenjava rodaninskega obroča z tiazolidin-2,4-dionskim primerljive rezidualne aktivnosti. S spojinama **16** in **20** smo želeli preveriti, če je aktivnost ob zamenjavi heterocikličnega obroča s psevdotiohidantoinom ali hidantoinom še vedno v primerljivem območju. Želeli smo namreč priti do spojin, ki bi jih bilo lažje sintetizirati (lažja redukcija do amino skupine, ker spojina ne bi vsebovala žvepla, boljša topnost), vendar bi še vedno ohranile primerljivo biološko aktivnost. Glede na to, da je bila edina razlika z modelnim inhibitorjem, ki smo ga želeli optimizirati, v zamenjavi heterocikličnega obroča, lahko trdimo, da ta zamenjava daje neaktivne spojine. Razlog za manjšo aktivnost spojine **16** bi lahko bila tudi posledica odboja med C=NH skupino na

heterocikličnem obroču in NH skupino peptidne vezi med Asp35 in Thr36. Pri spojini **20**, ki je sploh najmanj aktivna od vseh analogov, ki smo jih sintetizirali, je neaktivnost lahko posledica dejstva, da je lega 5-benzilidenhidantoinskega dela zarotirana za kot 180° glede na 5-benzilidentiazolidin-2,4-dionski fragment spojine **II**. (Slika 23).



Slika 23: Poze spojin **16** (levo) in **20** (desno) (sivo) v superpoziciji z inhibitorjem **II** (oranžen) iz kristalne strukture.

Za spojino **23** smo pričakovali najmanj primerljivo aktivnost z inhibitorjem **II**, saj smo želeli uvesti dodatno interakcijo z vodikovo vezjo v področje, kamor se veže benzilni obroč. Zanimivo je, da je aktivnost slabša, ne glede na to, da pri sidranju ni videti nobenih neugodnih interakcij, ki bi bile posledica uvedbe fluoro skupine na benzilni obroč (Slika 24). Možno pa je, da je dejanska konformacija spojine **23** v aktivnem mestu MurD zelo različna od izračunane, kar posledično privede do slabše inhibitorno aktivnosti. Zaradi potencialne dodatne vodikove vezi smo namreč pričakovali večjo afiniteto do vezavnega mesta in s tem višjo inhibitorno aktivnost. Na obroč smo želeli uvesti tudi hidroksilno skupino, vendar nam sinteza spojine ni uspela. Morda bi spojina, ki bi bila hidroksi substituirana na benzilnem obroču izkazovala višjo inhibitorno aktivnost. Zaradi ene same sintetizirane spojine pa tudi težko posplošimo, da uvedba dodatne skupine na benzilni obroč ni ugodna za delovanje inhibitorja.

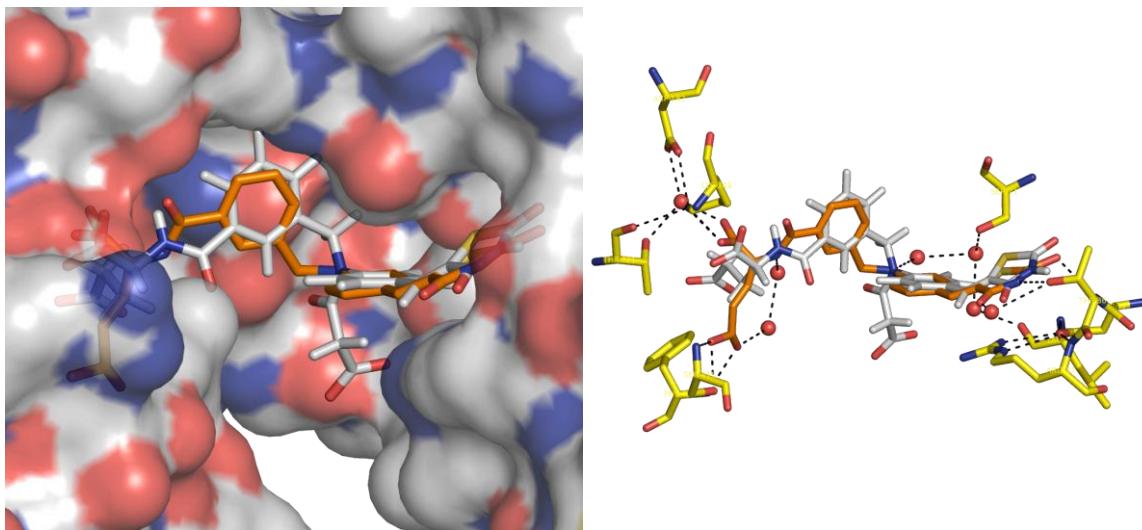


Slika 24: Superpozicija spojine **23** (sivo) v primerjavi z inhibitorjem **II** iz kristalne strukture.

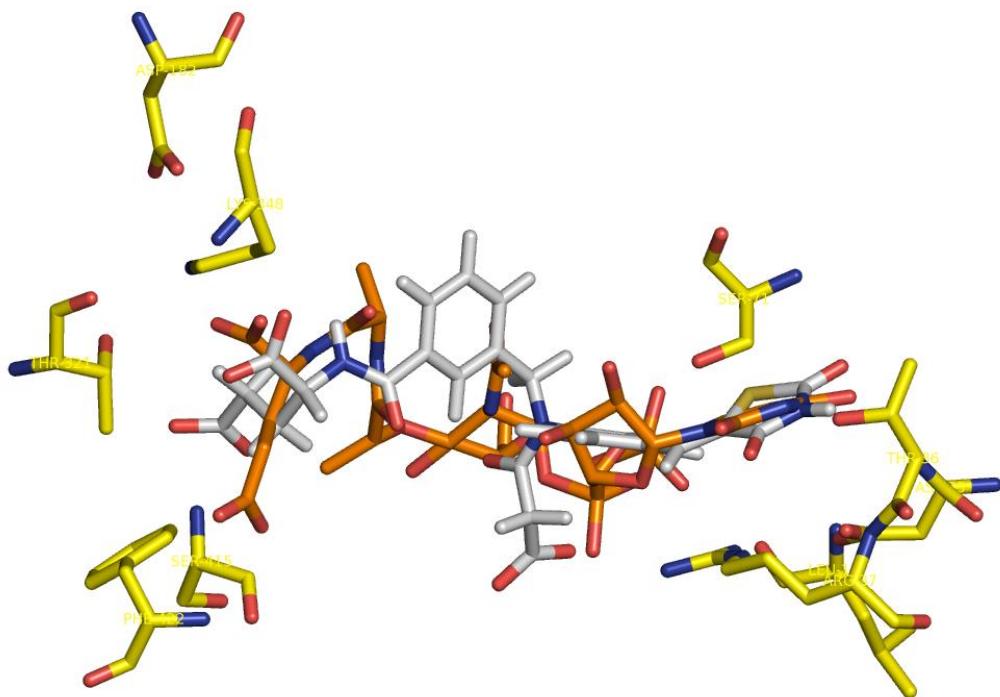
Edina spojina, ki je izkazovala dobro inhibitorno aktivnost v biološkem testiranju, je bila spojina **8**. Tu smo na dušikov atom med benzilnima skupinama uvedli acilno skupino (malonska kislina). Želeli smo sintetizirati še vrsto drugih alkiliranih inhibitorjev, vendar nam reakcije kljub več poskusom niso uspele. Z uvedbo acilnega oziroma alkilnega fragmenta smo želeli izkoristiti nove interakcije (tvorba dodatnih vodikovih vezi) z aktivnim mestom encima z Arg37 ali Arg186. Ko smo naredili sidranje spojine, pa smo opazili, da malonatni del ne tvori nobene dodatne interakcije z encimom, se pa lahko te tvorijo preko mreže molekul vode. Arg186 del pa je glede na sidrano pozno tudi predaleč, da bi lahko tvoril dodatne interakcije. V primerjavi z inhibitorjem **II** je težko razložiti povečano aktivnost, saj je razlika v pozah praktično le pri legi γ -karboksilata. (Slika 25) Možno je tudi, da je dejanska lega spojine **8** v aktivnem mestu encima drugačna, kot smo predvideli s sidranjem. Za natančnejšo razlago bi morali imeti kristalno strukturo kompleksa MurD-**8**.

S sidranjem smo primerjali tudi legi UMAG (produkt ligaze MurD) in naše spojine **8**. (Slika 26) Lahko opazimo, da je lega naše spojine v skladu s pričakovanji. Tiazolidin-2,4-dionski del se veže na področje uridina, glutaminski ostanek se veže v približno isto področje, vmesni del pa služi kot distančnik med obema skupinama, tvori pa tudi dodatne vodikove vezi. V primerjavi z inhibitorjem **II** in UMAG lahko opazimo, da je acilni fragment spojine **8** usmerjen v novo področje v aktivnem mestu encima. S sintezo novih spojin, ki bi bile substituirane na dušiku, bi lahko bolje preučili te interakcije in ugotovili, kakšen substituent je

najbolj primeren za to področje. V sklopu diplomske naloge smo želeli pripraviti tudi alkilirane substituente, vendar nam to zaradi težav pri sintezah ni uspelo, z njimi pa bi lahko bolje definirali vpliv substituenta na dušiku na inhibitorno aktivnost spojine.



Slika 25: Superpozicija spojine **8** (sivo) v primerjavi z inhibitorjem **II** iz kristalne strukture (levo). Superpozicija spojine **8** v primerjavi s spojino **II** (oranžna) s prikazanimi interakcijami z AK ostanki in molekulami vode (desno).



Slika 26: Superpozicija spojine **8** in UMAG v aktivnem mestu encima.

Kljub temu da smo sintetizirali spojino z najvišjo inhibitorno aktivnostjo iz serije spojin, ki so temeljile na glutaminski kislini, moramo ohraniti kritičen odnos do potencialne uporabnosti spojine, saj imajo zdravilne učinkovine vrednosti IC_{50} ponavadi v nanomolarnem območju. Poleg tega je zaradi strukture spojine težko pričakovati visoko biološko uporabnost. Zaradi same velikosti spojine in prisotnosti številnih polarnih fragmentov bi bila absorpcija spojine in njena porazdelitev do tarčnega mesta močno otežena, spojina pa je na številnih mestih podvržena metabolizmu, ki bi biološko uporabnost še dodatno zmanjšal.

Inhibitorno aktivnost izmerimo z *in vitro* biološkim testom na izoliranem encimu, kar je zaradi visoke koncentracije spojine, potrebne za izvedbo testa tudi smiselno. S takim testom sicer ne zajamemo, kako spremembe v strukturi vplivajo na farmakokinetične lastnosti spojine, ki vplivajo na njenou biološko uporabnost.

Omenjenim dejstvom navkljub smo z rezultati diplomske naloge doprinesli k izboljšanju aktivnosti izhodne spojine za faktor 5, kar daje dobro osnovo za nadaljni razvoj in optimizacijo teh spojin.

6 SKLEP

V okviru diplomskega dela smo načrtovali in sintetizirali nove spojine z inhibitornim delovanjem na ligazo MurD. Izhajali smo iz 5-benzilidentiazolidin-2,4-onskega inhibitorja **II**, ki so ga sintetizirali Tomašić in sodelavci. Uvedli smo različne modifikacije, s katerimi smo želeli izboljšati inhibitorno aktivnost že znanega inhibitorja oziroma preučiti odnos med strukturo in delovanjem. Sintetizirali smo spojine z bioizosterno zamenjanim heterocikličnim obročem (hidantoinom **20**) in psevdotiohidantoinom (**16**), s fluoro substituiranim benzilnim obročem (**23**) ter spojino (**8**), ki je imela aciliran dušik med fenilnima obročema. Poleg tega smo načrtovali še nekaj spojin, ki bi bile alkilirane na dušikovem atomu med fenilnima obročema ter spojino s hidroksisubstituiranim benzilnim obročem, vendar jih nismo uspeli sintetizirati.

Uspeli smo sintetizirati 4 spojine, katerim smo določili rezidualno aktivnost na ligazi MurD, najbolj aktivni spojni pa smo določili še IC₅₀. Spojine **16**, **20** in **23** praktično ne izkazujejo protibakterijske učinkovitosti, saj so njihove rezidualne aktivnosti v območju od 71 do 99%. Zato pa je toliko bolj aktivna spojina **8**, ki ima IC₅₀ vrednost 15 µM. Spojina **8** je tudi najmočnejši inhibitor ligaze MurD iz serije 5-benzilidentiazolidin-2,4-dionskih inhibitorjev, ki so jih sintetizirali na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo.

Iz opravljenega dela lahko zaključimo, da zamenjava heterocikličnega obroča ni smiselna, prav tako uvedba fluoro skupine na benzilni obroč. Zaradi odličnega rezultata, ki smo ga dobili z uvedbo acilne verige na vmesni dušikov atom, pa bi bilo vredno sintetizirati še nekaj dodatnih analogov te spojine, da bi lahko bolje proučili odnos med strukturo in delovanjem. Potrebno bi bilo najti primeren in učinkovit postopek za alkiliranje vmesnega dušikovega atoma, s katerim bi lahko uvedli različne alkilne verige, vredno pa bi bilo poskusiti tudi z daljšim acilnim fragmentom (sukcinilnim), ki bi zaradi daljše verige lahko prišel v bližino Arg37 ali Arg186 in tvoril z njim dodatno ionsko vez.

Za nadaljnje načrtovanje novih inhibitorjev je smiselna uporaba *in silico* načrtovanja s pomočjo GoldScore funkcije v programu Gold, saj so bili rezultati cenilne funkcije primerljivi z rezultati biološkega testiranja.

7 LITERATURA

1. Fernandes P: Antibacterial discovery and development – a failure of success? *Nat biotechnol*, 2006, 24:1497-1503.
2. Green DW: The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin. Ther. Targets*, 2002, 6(1):1-19.
3. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev.*, 2007, 32:168-207.
4. van Heijenoort J: Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat. Prod. Rep.*, 2001, 18:503-519.
5. Katz AH, Caufield CE: Structure-based design approaches to cell wall biosynthesis inhibitors. *Curr Pharm Des.*, 2003, 9(11): 857-866.
6. Vollmer W, Blanot D, de Pedro M A: Peptidoglycan structure and arhitecture. *FEMS Microbiol Rev*, 2008, 32:149-167.
7. El Zeeby A, Sanschargin F, Levesque R C: Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Mol Microbiol.*, 2003, 47(1): 1-12.
8. Tanner E M, Vaganay S, van Heijenoort J, Blanot D: Phosphinate inhibitor of the D-Glutamic acid-adding enzyme of peptidoglycan biosynthesis. *J.Org. Chem.*, 1996, 61:1756-1760.
9. Gegnas D L, Waddel S T, Chabin R M, Reddy S, Wong K K: Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurD. *Bioorganic&Medicinal Chemistry Letters* 8, 1998: 1643-1648.
10. Stancar K, Blanot D, Gobec S: Design, synthesis and structure-activity relationships of new phosphinate inhibitors of MurD. *Bioorg Med Chem Lett*, 2006, 16: 343-348.
11. Bertrand JA, Fanchon E, Martin L, Chantalat L, Auger G, Blanot D, van Heijenoort J, Dideberg O: Open structures of MurD: Domain movements and structural similarities with folpolyglutamate synthetase. *J Mol Biol*, 2000, 301:1257-1266.
12. Bertrand JA, Auger G, Martin L, Fanchon E, Blanot D, Le Beller D, van Heijenoort J, Dideberg O: Determination of the MurD mechanism through crysthalographic analysis of enzyme complexes. *J Mol Biol*, 1999, 289:579-590.

13. Horton JR, Bostock JM, Chopra I, Hesse L, Phillips SE, Adams DJ, Johnson AP, Fishwick CW: Macrocyclic inhibitors of the Bacterial cell wall biosynthesis enzyme Mur D. *Bioorg Med Chem Lett* 2003, 13:1557-1560.
14. Tomasić T, Zidar N, Kovac A, Turk S, Simcic M, Blanot D, Müller-Premru M, Filipic M, Grdadolnik SG, Zega A, Anderluh M, Gobec S, Kikelj D, Peterlin Masic L: 5-Benzylidenethiazolidin-4-ones as multitarget inhibitors of bacterial Mur ligases. *ChemMedChem*, 2009, 4:1-11.
15. Tomasić T, Masic LP: Rhodanine as a privileged scaffold in drug discovery. *Curr Med Chem*, 2009, 16:1569-1629
16. Tomasić T, Zidar N, Rupnik V, Kovac A, Blanot D, Gobec S, Kikelj D, Masic LP: Synthesis and biological evaluation of new glutamic acid-based inhibitors of MurD ligase. *Bioorg Med Chem Lett*, 2009, 19:153-157.
17. Zidar N, Tomašić T, Šink R, Rupnik V, Kovač A, Turk S, Patin D, Blanot D, Martel CC, Dessen A, Zega A, Gobec S, Mašič LP, Kikelj D: Discovery of novel 5-benzylidenrhodanine and 5-benzylidenethiazolidine-2,4-dione inhibitors of MurD ligase. *J Med Chem*. Sprejeto v tisk.
18. Lanzetta PA, Alvarez LJ, Reinach PS, Candia O: An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Anal. Biochem.* 1979, 100, 95-97.
19. Heravi MM, Ajami D, Tabar-Heydar K: Wet alumina supported chromium(VI) oxide: A mild, efficient, and inexpensive reagent for oxidative deprotection of trimethylsilyl and tetrahydropyranyl ethers. *Monatshefte für Chemie* 1999, 130; 337-339.
20. Heine HN: Doktorska dizertacija: Peptidomimetika an Zellulosemembranen – SPOT-Synthese und Screening kombinatorischer Peptoid-Bibliotheken. Berlin, 2000.
21. Wutts GMP, Greene WT: Greene's protective groups in organic synthesis, 4th edition, Wiley-Interscience, 2006.
22. TCI: Organic Chemicals 2006-2007, 2006, 990.
23. Maccari R, Ottana R, Curinga C, Vigorita MG, Rakowitz D, Steindl T, Langer T: Structure-activity relationships and molecular modelling of 5-arylidene-2,4-thiazolidinediones active as aldose reductase inhibitors. *Bioorg Med Chem Lett*, 2005; 13: 2809-2823.
24. Robnik K: Diplomsko delo: Sinteza in vrednotenje reduciranih analogov 5-

Borut Bratuž: Diplomska naloga

benzilidentiazolidin-4-onov kot potencialnih inhibitorjev ligaze MurD. Fakulteta za Farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2009.