

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



JERNEJA TANŠEK

# **DIPLOMSKA NALOGA**

Univerzitetni program farmacije

Ljubljana, 2009



UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



JERNEJA TANŠEK

**NOVI TREONINHIDRAZIDNI INHIBITORJI LIGAZ MUR**  
**NEW THREONINHYDRAZIDE INHIBITORS OF MUR-LIGASES**

DIPLOMSKA NALOGA

Ljubljana, 2009

Diplomsko delo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom doc. dr. Aleša Obreze, mag. farm. in somentorstvom Roka Frlana, mag. farm. NMR spektri so bili posneti v Centru za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo v Ljubljani. Masni spektri so bili posneti na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani. IR spektri so bili posneti na Fakulteti za farmacijo.

### **Zahvala**

Hvala mentorju doc. dr. Alešu Obrezi, mag. farm. in somentorju Roku Frlanu, mag. farm. za ves trud, potrpežljivost in pomoč pri delu. Najlepša hvala tudi vsem ostalim, ki so mi stali ob strani.

### **Izjava**

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

Jerneja Tanšek

Ljubljana, marec 2009

Predsednik komisije: prof. dr. Borut Štrukelj

Član komisije: doc. dr. Iztok Grabnar

# 1. VSEBINA

<b>1. VSEBINA</b>	<b>3</b>
<b>2. POVZETEK</b>	<b>5</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>6</b>
<b>3. SEZNAM OKRAJŠAV</b>	<b>7</b>
<b>4. UVOD</b>	<b>9</b>
4.1. ANTIBIOTIKI	9
4.2. REZISTENCA BAKTERIJ NA PROTIMIKROBNO DELOVANJE ANTIBIOTIKOV	10
4.3. BAKTERIJSKA CELIČNA STENA	11
4.3.1. CELIČNA STENA GRAMPOZITIVNIH IN GRAMNEGATIVNIH BAKTERIJ	11
4.4. PEPTIDOGLIKAN	12
4.4.1. STRUKTURA PEPTIDOGLIKANA	12
4.4.2. BIOSINTEZA PEPTIDOGLIKANA	15
4.5. MUR ENCIMI	18
4.5.1. LIGAZA MurC	19
4.5.2. LIGAZA MurD	24
<b>5. NAČRT DELA</b>	<b>27</b>
5.1. REAKCIJSKE SCHEME	28
<b>6. MATERIALI IN METODE</b>	<b>31</b>
6.1. MATERIALI	31
6.2. METODE	31
6.2.1. KROMATOGRFSKE METODE	31
6.2.2. SPEKTROSKOPSKE METODE	31
6.2.3. ELEMENTNA ANALIZA	32
6.2.4. DOLOČEVANJE TALIŠČA	32
6.2.5. OPTIČNA SUČNOST	32
6.2.6. BIOLOŠKA TESTIRANJA	32
6.3. APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA	33
6.4. NOMENKLATURA IN RISANJE SPOJIN	33
<b>7. EKSPERIMENTALNO DELO</b>	<b>34</b>
7.1. PRVA SINTEZNA POT	34
7.1.1. Sinteza N-(terc-butiloksikarbonil) L-treonina (1)	34
7.1.2. Sinteza naftalen-2-sulfonohidrazida (2)	35
7.1.3. Sinteza terc-butil 3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksobutan-2-ilkarbamata (3)	35
7.1.4. Sinteza N`-(2-amino-3-hidroksibutanoil)naftalen-2-sulfonohidrazida (4)	37
7.1.5. Sinteza N-(3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksobutan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamida (5)	38
7.1.6. Sinteza N-(3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksobutan-2-il)-4-nitrobenzensulfonamida (6)	40
7.1.7. Sinteza N-(4-(N-(3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-okso-butan-2-il)sulfamoil)fenil)acetamida (7)	41

7.1.8.	<i>Sinteza 2-hidroksi-5-(N-(3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonyl)hidrazinil)-1-oksobutan-2-il)sulfamoyl)benzojske kisline (8)</i>	43
7.1.9.	<i>Sinteza kinazolin-2-4(1H,3H)-diona (9)</i>	44
7.1.10.	<i>Sinteza 2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidrokinazolin-7-sulfonyl klorida (10)</i>	45
7.1.11.	<i>Sinteza N-(3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonyl)hidrazinil)-1-oksobutan-2-il)-2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidrokinazolin-6-sulfonamida (11)</i>	46
7.1.12.	<i>Sinteza 4-hidroksi-N-(3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonyl)hidrazinil)-1-oksobutan-2-il)-3-nitrobenzenamida (12)</i>	47
7.1.13.	<i>Sinteza N-(3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonyl)hidrazinil)-1-oksobutan-2-il)-2-fenoksiacetamida (13)</i>	49
<b>7.2.</b>	<b>DRUGA SINTEZNA POT</b>	<b>50</b>
7.2.1.	<i>Sinteza 3-hidroksi-2-(fenilsulfonamido)butanojske kisline (14)</i>	50
7.2.2.	<i>Sinteza 1H-indazol-3-karbohidrazida (15)</i>	51
7.2.3.	<i>Sinteza N-(1-(2-(3H-indazol-3-karbonil)hidrazinil)-3-hidroksi-1-oksobutan-2-il)benzensulfonamida (16)</i>	52
<b>8.</b>	<b>REZULTATI IN RAZPRAVA</b>	<b>54</b>
<b>8.1.</b>	<b>RAZPRAVA O SINTEZAH SPOJIN</b>	<b>54</b>
8.1.1.	<i>Zaščita amino skupine L-treonina (1)</i>	54
8.1.2.	<i>Sinteza naftalen-2-sulfonohidrazida (2)</i>	55
8.1.3.	<i>Tvorba amidne vezi z reagentoma EDC in HOBt (OJT 22)</i>	55
8.1.4.	<i>Odstranitev terc-butiloksikarbonilne (BOC) zaščite (3)</i>	57
8.1.5.	<i>Sinteza kinazolin-2,4(1H,3H)-diona (9)</i>	57
8.1.6.	<i>Priprava aromatskih sulfonylhidrazidov (5, 6, 7, 8, 11, 12, 13)</i>	58
8.1.7.	<i>Druga sintezna pot</i>	59
<b>8.2.</b>	<b>PREGLED SINTEZIRANIH KONČNIH SPOJIN</b>	<b>60</b>
<b>8.3.</b>	<b>REZULTATI BIOKEMIJSKEGA TESTIRANJA SINTEZIRANIH SPOJIN</b>	<b>62</b>
<b>9.</b>	<b>SKLEP</b>	<b>65</b>
<b>10.</b>	<b>LITERATURA</b>	<b>66</b>

## 2. POVZETEK

Pojav bakterijskih sevov, rezistentnih na večino antibiotikov, ki so trenutno na tržišču, predstavlja resen problem pri zdravljenju mikrobnih infekcij, zato je nujno iskanje in razvoj novih protimikrobnih učinkovin. Ena najpomembnejših razlik, ki loči bakterijsko celico od človeške, je njena toga in mehansko odporna celična stena, katere glavni gradnik je makromolekula peptidoglikana. Z zaviranjem biosinteze peptidoglikana lahko vplivamo na preživetje bakterije. Inhibitorji encimov Mur-ligaz, ki sodelujejo v zgodnejših stopnjah sinteze peptidoglikana, predstavljajo novejšo, v veliki meri še neizkoriščeno možnost načrtovanja in sinteze novih protimikrobnih učinkovin.

V okviru diplomske naloge smo sintetizirali osem novih spojin s treoninhidrazidnim skeletom. Za uporabo treoninskega fragmenta smo se odločili zato, da bi izboljšali vodotopnost končnim spojinam, saj ima treonin v primerjavi z levcinom dodatno -OH skupino. Kot spojino vodnico smo uporabili spojino *N*-(4-metil-1-(2-naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksopentan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamid, ki se je izkazala kot zmerno učinkovit inhibitor MurC z izraženim protimikrobnim delovanjem v mikromolarnem koncentracijskem območju. Končne spojine smo testirali *in vitro* na izoliranih encimih MurC in MurD, vendar se nobena od sintetiziranih spojin ni izkazala kot učinkovit inhibitor encimov MurC in MurD. Sklepamo, da zamenjava levcinskega dela s treoninskim ni ugodna za vezavo na aktivno mesto encima.

Rezultati naših raziskav širijo znanje na področju sintezne kemije, pripomorejo k našemu razumevanju odnosa med strukturo in delovanjem inhibitorjev Mur-ligaz ter usmerjajo nadaljnji razvoj na področju odkrivanja novih protimikrobnih učinkovin.

## ABSTRACT

The fast spread of pathogenic bacterial strains that are resistant to a variety of antibiotics currently available on the market, presents a serious problem in treating microbial infections and has generated an urgent need for the development of new antimicrobial agents. One of the most important differences that distinguishes bacterial cell from the human cell is its thick and mechanically very rigid cell-wall and the macromolecule of peptidoglycan as its key component. Therefore, any perturbation of the multi-step peptidoglycan biosynthesis may lead to cell lysis. The early steps of biosynthetic pathway of peptidoglycan precursor are catalyzed by a series of Mur enzymes representing novel still largely unexploited targets of the design of new chemotherapeutics.

In our research we designed and synthesized eight novel potential inhibitors of Mur enzymes with threoninhydrazide moiety. We decided to use threoninhydrazide moiety to improve water solubility of new potential inhibitors, because of the additional –OH group of threonin. *N*-(4-methyl-1-(2-(naphthalen-2-ylsulfonyl)hydrazinyl)-1-oxopentan-2-yl)-3-nitrobenzensulfonamide, which is an inhibitor of MurC, was chosen as a lead compound. However, *in vitro* biochemical testing for the inhibitory activity which was performed for eight of our synthesized compounds found all of them to be inactive to MurC and MurD enzymes. Therefore, the replacement of leucin for threonin is not favorable for the binding of a compound at the active site.

The results of our study broaden the knowledge in the field of synthetic chemistry, contribute to our understanding of SAR of Mur ligase inhibitors and direct the further development of new antimicrobial drugs.



### 3. SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozindifosfat
ATP	adenozintrifosfat
BOC	terc-butiloksikarbonil
d	dublet (NMR)
dd	dublet dubleta (NMR)
DMF	N,N-dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DMSO-d <sub>6</sub>	devteriran dimetilsulfoksid
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ESI	elektrosprej ionizacija (MS)
GlcNAc	N-acetilglukozamin
HOBt	1-hidroksibenzotriazol hidrat
IR	infrardeča spektroskopija
IC <sub>50</sub>	srednja inhibitorna koncentracija
J	sklopitvena konstanta (NMR)
M	molekulska masa (brez enot) ali molska masa (g/mol)
m	multiplet (NMR)
Mf	mobilna faza
MIC	minimalna inhibitorna koncentracija
MurA	UDP-N-acetilglukozamin enolpiruvat-transferaza
MurB	UDP-N-acetilenolpiruvilglukozamin-redukataza
MurC	UDP-N-acetilmuraminska kislina: L-alanin-ligaza
MurD	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin: D-glutamat-ligaza
MurE	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat: mezodiaminopimelinat-ligaza
MurF	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-mezodiaminopimelinat D-alanin-D-alanin-ligaza
MurG	N-acetilglukozamin-transferaza
MurNAc	N-acetilmuraminska kislina
MS	masna spektrometrija
NADPH	reducirana oblika nikotinamid adenin dinukleotid fosfata

NMM	N-metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
P <sub>i</sub>	anorganski fosfat
RA	rezidualna aktivnost
R <sub>f</sub>	retencijski faktor
s	singlet (NMR)
SAR	odnos med strukturo in delovanjem
THF	tetrahidrofur
TLC	tankoplastna kromatografija
UDP	uridindifosfat
UMP	uridinmonofosfat
UMA	UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin

## 4. UVOD

### 4.1. ANTIBIOTIKI

Antibiotike lahko definiramo kot metabolne produkte različnih vrst mikroorganizmov (bakterij, alg, gliv, lišajev), ki preprečujejo rast (bakteriostatično delovanje) ali povzročajo smrt (bakteriocidno delovanje) drugih bakterij.

V širšem pomenu med antibiotike prištevamo tudi plosintezne derivate (penicilini, cefalosporini), ki jih pridobivamo s farmacevtsko–kemijskimi modifikacijami metabolnih produktov, medtem ko spojine popolnoma sinteznega izvora (sulfonamidi, kinoloni) uvrščamo med kemoterapevtike (1).

Antibiotiki predstavljajo raznoliko skupino zdravilnih učinkovin in jih lahko delimo po različnih kriterijih:

- glede na mehanizem delovanja,
- glede na izvor,
- glede na spekter delovanja,
- glede na način aplikacije,
- glede na kemično strukturo.

PREGLEDNICA I: *Delitev antibiotikov glede na mehanizem delovanja (1,3,4).*

TARČNO MESTO V BAKTERIJI	VRSTA ANTIBIOTIKA
SINTEZA CELIČNE STENE	PENICILINI, CEFALOSPORINI, KARBAPENEMI, MONOBAKTAMI, VANKOMICIN, FOSFOMICIN, CIKLOSERIN
SINTEZA PROTEINOV	MAKROLIDI, TETRACIKLINI, AMINOGLIKOZIDI, KLORAMFENIKOL
SINTEZA IN METABOLIZEM NUKLEINSKIH KISLIN	KINOLONI, RIFAMPICILIN, ACIKLOVIR
METABOLIZEM FOLNE KISLINE	SULFONAMIDI, TRIMETOPRIM

#### 4.2. REZISTENCA BAKTERIJ NA PROTIMIKROBNO DELOVANJE ANTIBIOTIKOV

Uporaba antibiotikov je močno zmanjšala smrtnost zaradi infekcijskih bolezni, hkrati pa je prekomerna uporaba protimikrobnih učinkovin povzročila selektivni pritisk na obstoječe mikroorganizme. Zaradi selekcijskih procesov so se pri bakterijah razvili različni mehanizmi odpornosti:

- a. sprememba permeabilnosti celične stene,
- b. proizvodnja encimov, ki razgradijo ali kemično spremenijo protibakterijske učinkovine (npr.  $\beta$ -laktamaze, kloramfenikol acetiltransferaze),
- c. sprememba vezavnega mesta za protibakterijsko učinkovino na tarčnem proteinu (zmanjšanje afinitete ali povečanje števila receptorskih molekul za antibiotik),
- d. sprememba presnovne poti,
- e. zmanjšanje akumulacije protimikrobne učinkovine v celici (črpanje antibiotika iz celice s pomočjo membranskih črpalk ali zmanjšan privzem protibakterijskih učinkovin) (3,8).

Rezistenca na antibiotike je lahko naravna (intrinzična) in se razvije pred izpostavitvijo učinkovini ali pridobljena (ekstrinzična), ki nastane kot posledica izpostavitve učinkovini (1). Poznamo več patogenih mikroorganizmov, ki so rezistentni na antibiotike: na meticilin rezistentni *Staphylococcus aureus* (MRSA), na vankomicin rezistentni *Staphylococcus aureus* (VRSA), na vankomicin rezistentna *Enterococcus faecium* in *faecalis* (VRE), na karbapenam rezistentna *Actinobacter baumannii* in *Pseudomonas aeruginosa* ter na penicilin in makrolidne antibiotike rezistenten *Streptococcus pneumoniae* (6,7).

Za reševanje problema rezistence moramo upoštevati dva vidika, in sicer zmanjšanje uporabe antibiotikov na eni strani ter raziskovanje in sintezo novih učinkovin, ki delujejo na še neraziskane tarče, na drugi strani. Pri iskanju novih tarč se moramo osredotočiti na doseganje selektivne toksičnosti ter, v povezavi s tem, na bistvene razlike med človeško in bakterijsko celico. Ena izmed pomembnejših razlik je makromolekula peptidoglikana, ki sestavlja bakterijsko celično steno in je značilna le za prokariotske organizme. V zgodnejših stopnjah biosinteze peptidoglikana sodeluje skupina encimov Mur-ligaz (8,9).

### 4.3. BAKTERIJSKA CELIČNA STENA

Bakterijska celična stena je kompleksna makromolekularna struktura, ki celico omejuje, ji daje značilno obliko ter čvrstost. Je toga in mehansko izjemno odporna plast, ki ščiti celično vsebino pred zunanjimi vplivi in omogoča bakteriji vzdrževanje visokega osmotskega pritiska. Ker pa celična stena sodeluje tudi pri delitvi in rasti celic, je nujna polprepustnost le-te, saj omogoča izmenjavo snovi z okolico (10).

Najpomembnejšo strukturo celične stene predstavlja peptidoglikan, ki ga sestavlja mreža linearnih polisaharidnih verig. Glede na število plasti peptidoglikana ter ostalih sestavin celične stene, lahko z barvanjem po Gramu karakteriziramo bakterije (11).

PREGLEDNICA II: *Delitev bakterij glede na obarvanost po Gramu.*

	<i>OBARVANJE</i>
grampozitivne bakterije (G+)	modrovijolično
gramnegativne bakterije (G-)	rdeče

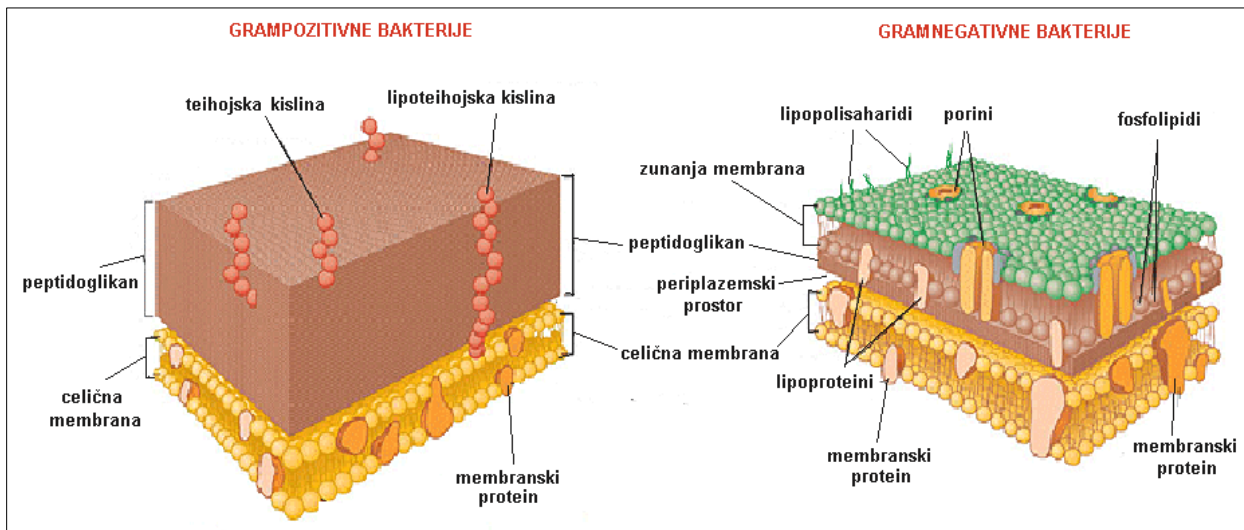
#### 4.3.1. CELIČNA STENA GRAMPOZITIVNIH IN GRAMNEGATIVNIH BAKTERIJ

Celično steno grampozitivnih bakterij sestavljajo številne peptidoglikanske plasti, ki jih je lahko tudi do 40. Peptidoglikan prebadajo anionski polimeri, kot sta teihojska in teihuronska kislina, ki sta na določenih mestih kovalentno pritrjeni na celično membrano. Teihojska in teihuronska kislina vsebujeta fosfatne, hidroksilne in aminske skupine ter zato delujeta kot ionsko-izmenjevalni sistem za uravnavanje koncentracije magnezijevih ionov, ki so pomembni za delovanje številnih bakterijskih encimov v biosintezi peptidoglikana (1, 10, 21).

Pri gramnegativnih bakterijah je zgradba celične stene bolj kompleksna. Med notranjo plazemsko membrano in tanko plastjo peptidoglikana je periplazemski prostor, v katerem so številni encimi in vezavni proteini. Plasti peptidoglikana sledi čvrsta zunanja membrana sestavljena iz fosfolipidnega dvosloja, proteinov, encimov, membranskih proteinskih kanalčkov (porinov) in lipopolisaharidov, le-ti predstavljajo glavno antigensko determinanto ter so odgovorni za aktivacijo imunskega odgovora pri gostitelju. Zaradi te zunanje membrane je prepustnost celične stene pri gramnegativnih bakterijah močno

zmanjšana, saj ne morejo prehajati hidrofилne nenabite molekule in lipofilne spojine (npr. maščobne kisline, detergenti, barvila, nekateri antibiotiki) (1,15).

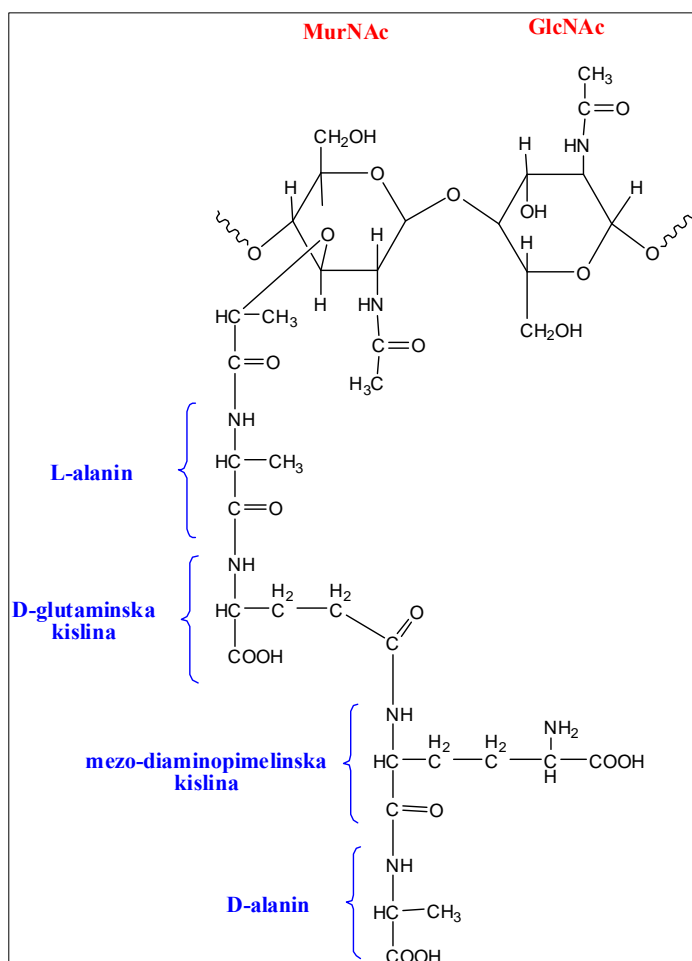
Slika 1: Zgradba celične stene pri grampozitivnih in gramnegativnih bakterijah.



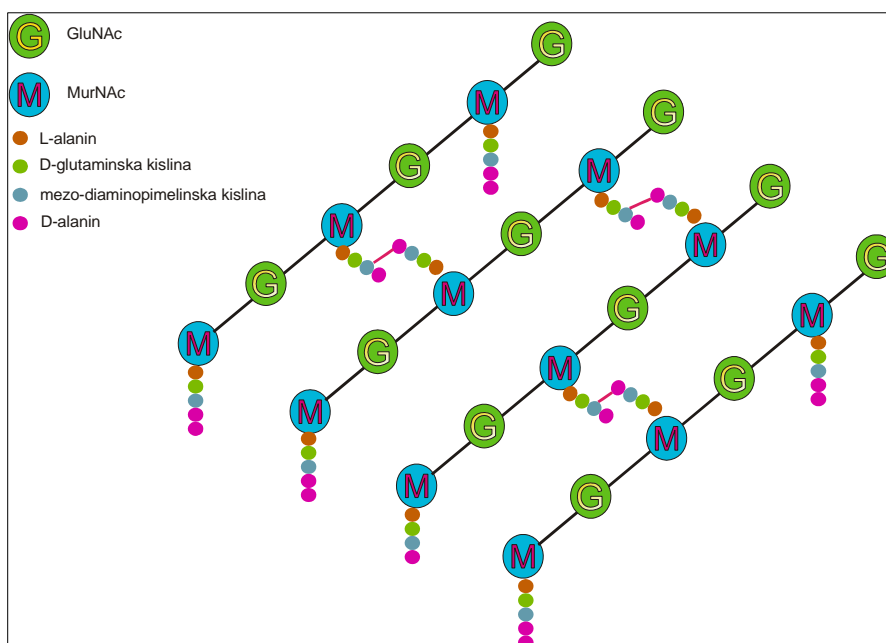
#### 4.4. PEPTIDOGLIKAN

##### 4.4.1. STRUKTURA PEPTIDOGLIKANA

Peptidoglikan ali murein je makromolekula, sestavljena iz linearnih glikanskih vlaken, ki so prečno povezana s kratkimi peptidnimi verigami. Glikanska vlakna sestavljajo izmenjujoče se sladkorne enote *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc), povezane z 1,4- $\beta$  glikozidno vezjo. *N*-acetilmuraminska kislina je derivat *N*-glukozamina, ki ima preko hidroksilne skupine na tretjem ogljikovem atomu glukozaminskega skeleta pripet D-laktilni ostanek z etrsko vezjo. Na prosto karboksilno skupino vsakega ostanka muraminske kisline je s peptidno vezjo pripeta veriga štirih aminokislin, katerih zaporedje je sledeče: L-alanin (L-Ala), D-glutaminska kislina (D-Glu), *mezo*-diaminopimelinska kislina (mDAP) ali L-lizin (L-Lys) in D-alanin (D-Ala) (Slika 2). Med prosto amino skupino tretje aminokislinske verige in karboksilno skupino D-alanina na četrtem mestu sosednje verige se tvori peptidna vez in nastane mrežasta struktura (Slika 3) (21, 16, 17, 18).



Slika 2: Zgradba osnovne enote peptidoglikana gramnegativnih bakterij.



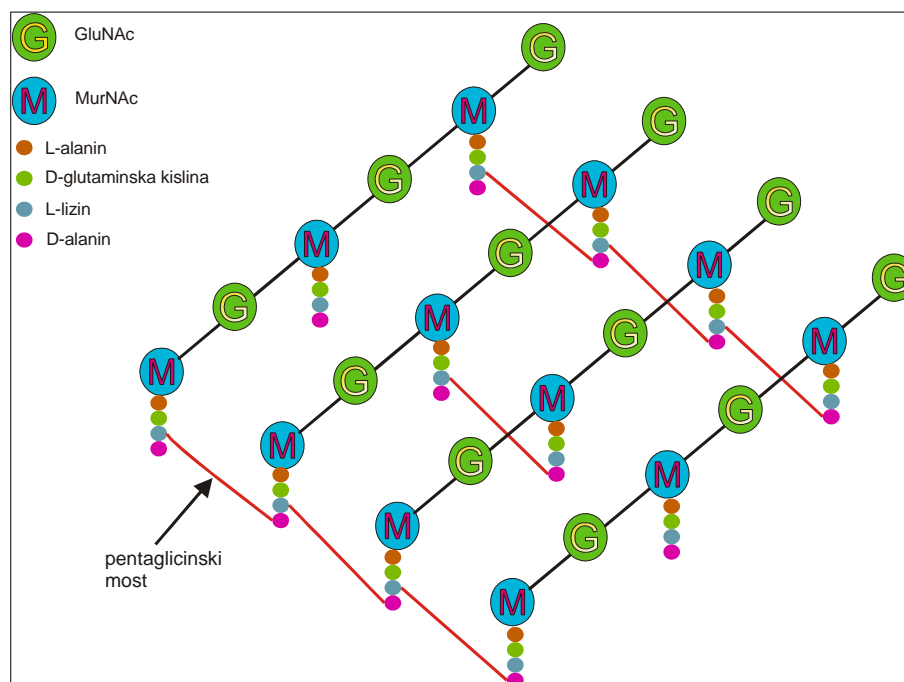
Slika 3: Prečne povezave polimernih verig peptidoglikana pri *E.coli*, G- bakteriji.

V zgradbi osnovnega gradnika bakterijske celične stene med gramnegativnimi in grampozitivnimi bakterijami večinoma ni velikih razlik. Večino razlik najdemo v aminokislinski sestavi peptidne verige, ki je pripeta na MurNAc:

- pri gramnegativnih bakterijah je najpogosteje na tretjem mestu *mezo*-diaminopimelinska kislina,
- pri grampozitivnih bakterijah je najpogosteje na tretjem mestu L-lizin.

Razlike najdemo tudi v prečnih povezavah glikanskih verig:

- pri večini gramnegativnih in nekaterih grampozitivnih bakterijah nastane prečna povezava neposredno med prosto amino skupino tretje aminokislinske ene glikanske verige in karboksilno skupino D-alanina na četrtem mestu sosednje verige,
- pri večini grampozitivnih bakterij pa nastajajo med glikanskimi verigami glicinski pentapeptidni mostovi med L-lizinom ene verige in D-alaninom druge verige (Slika 4) (16, 17).



Slika 4: *Struktura peptidoglikana pri grampozitivni bakteriji.*

Razlika med gramnegativnimi in grampozitivnimi bakterijami je prav tako v deležu vseh tetrapeptidnih verig, ki sodelujejo v prečnih povezavah peptidoglikanskih vlaken:

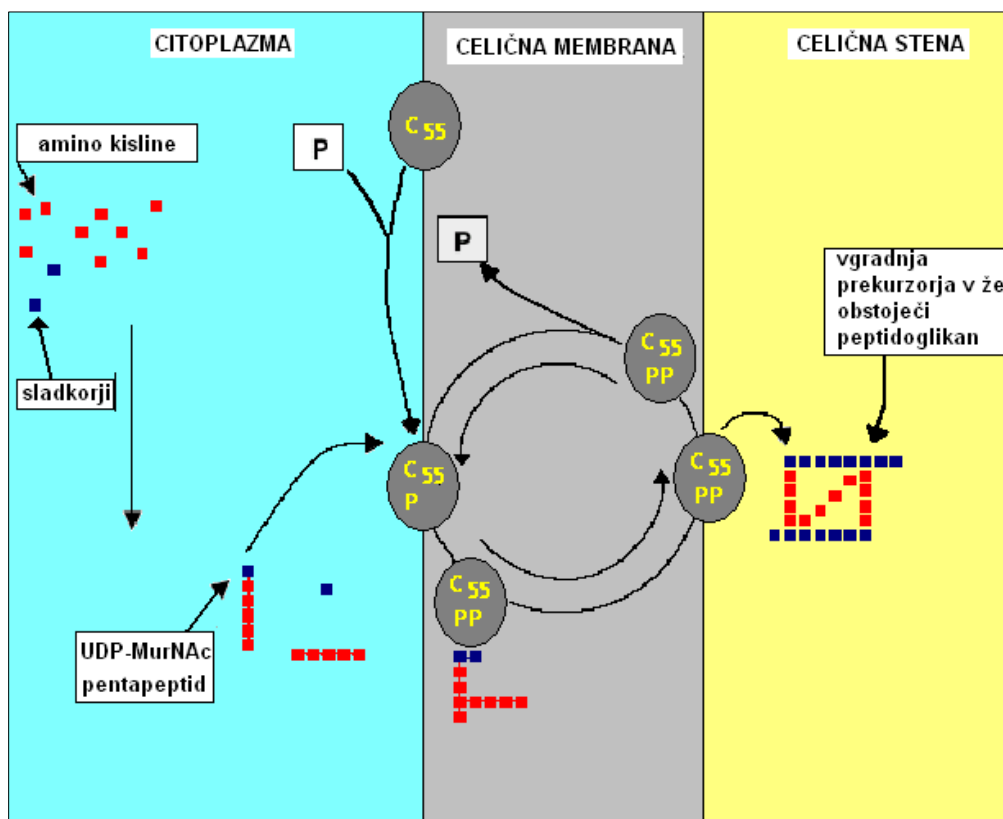
- okoli 20% pri gramnegativnih bakterijah,
- okoli 90% pri grampozitivnih bakterijah (16, 17).



#### 4.4.2. BIOSINTEZA PEPTIDOGLIKANA

Biosinteza peptidoglikana je večstopenjski proces, ki ga lahko v osnovi razdelimo na tri dele (Slika 5):

1. sinteza prekursorjev v citoplazmi,
2. prenos prekursorjev skozi citoplazemsko membrano s pomočjo lipidnega prenašalca ( $C_{55}$ -izoprenoid fosfat),
3. prehod prekursorjev v celično steno in vgradnja v že obstoječi peptidoglikan (19).

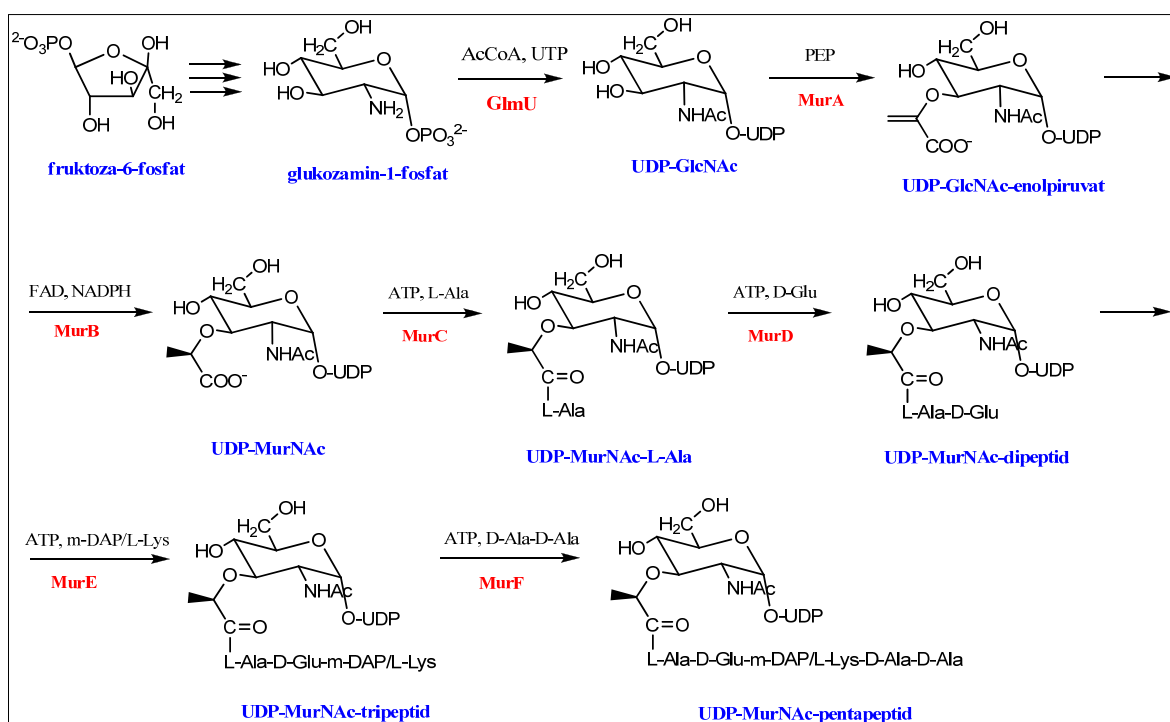


Slika 5: Biosinteza peptidoglikana.

##### 4.4.2.1. Sinteza prekursorjev v citoplazmi

V citoplazmi najprej iz fruktoze-6-fosfata v štirih stopnjah nastane UDP-*N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc). Sledi sinteza UDP-*N*-acetilmuraminske kisline (UDP-MurNAc) v dveh stopnjah, ki ju katalizirata encima MurA in MurB. MurA je katalitični encim, ki veže enolpiruvat iz fosfoenolpiruvata na 3'-hidroksilno skupino UDP-GlcNAc, nato sledi redukcija enola do laktoilne skupine z NADPH, kar katalizira encim MurB.

Hkrati poteka biosinteza D-aminokislin (D-alanin, D-glutaminska kislina, *mezo*-diaminopimelinska kislina) po dveh poteh: z racemizacijo  $\alpha$ -C-atoma L-aminokislina z ustrežno aminokislinsko racemazo ali s stereoselektivnim transaminiranjem  $\beta$ -keto kisline. Končni citoplazemski prekurzor MurNAc-pentapeptid nastane tako, da se na prosto karboksilno skupino laktilnega etra MurNAc veže skupina petih aminokislin preko amidne vezi. Encimi MurC, MurD in MurE omogočajo vezavo aminokislin v sledečem zaporedju: L-alanin, D-glutaminska kislina in *mezo*-diaminopimelinska kislina. V zadnji reakciji, ki jo katalizira MurF, se dodata kot dipeptid še preostali dve aminokislini (D-Ala) (20, 21).

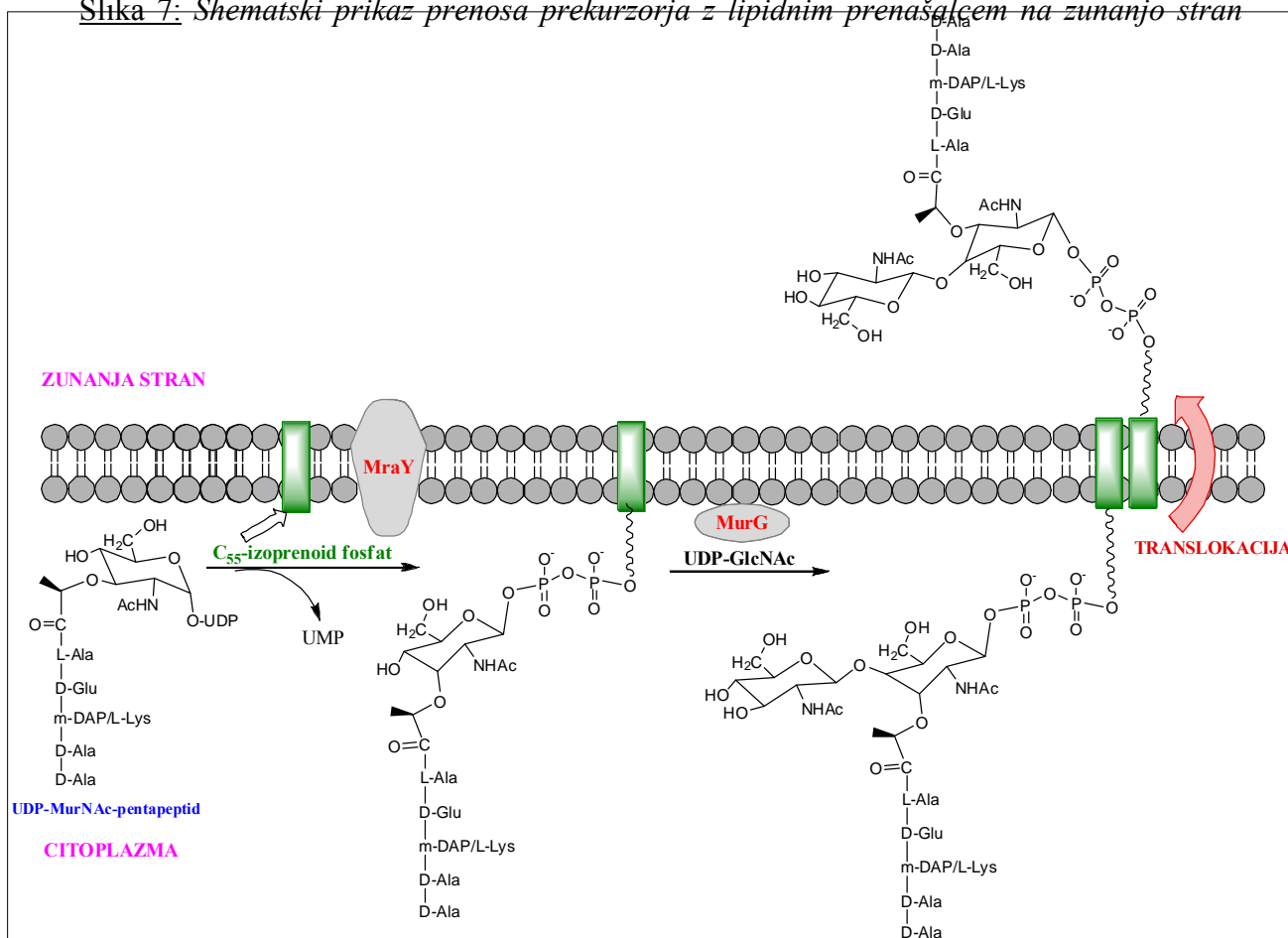


Slika 6: Shema sinteze prekurzorjev peptidoglikana v citoplazmi.

#### 4.4.2.2. Prenos prekurzorjev skozi citoplazemsko membrano s pomočjo lipidnega prenašalca

Nastali UDP-*N*-acetilmuramil pentapeptid se veže z *N*-acetilglukozaminom in tvori osnovno gradbeno enoto peptidoglikana, le-ta se nato prenese na zunanjo stran citoplazemske membrane s pomočjo lipidnega prenašalca C<sub>55</sub>-izoprenoid fosfata. Pripenjanje UDP-*N*-acetilmuramil pentapeptida na lipidni prenašalec katalizira *MraY* (membranski encim), pripenjanje *N*-acetilglukozamina na nastali kompleks UDP-*N*-acetilmuramil pentapeptida z lipidnim prenašalcem pa katalizira encim *MurG* (20).

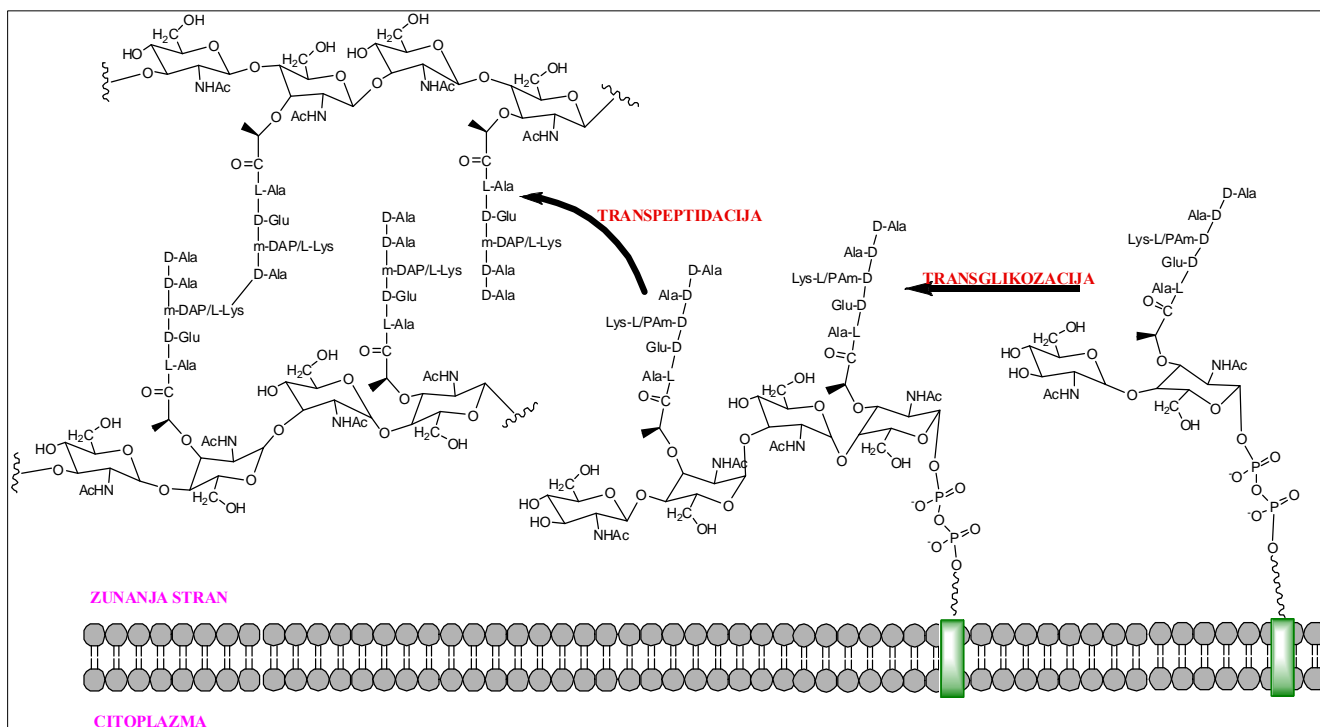
Slika 7: Shematski prikaz prenosa prekursorja z lipidnim prenašalcem na zunanjo stran



citoplazemske membrane.

#### 4.4.2.3. Prehod prekursorjev v celično steno in vgradnja v že obstoječi peptidoglikan

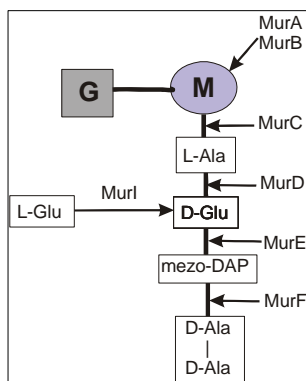
Na zunanji strani citoplazemske membrane se začne vgradnja osnovnega gradnika v že obstoječi peptidoglikan s povezovanjem sladkornih enot v procesu transglikozacije, ki je encimsko kataliziran proces, pri čemer nastanejo daljša glikanska vlakna. Biosinteza peptidoglikana se konča z vgradnjo linearnih gradnikov, pripetih na lipidni prenašalec, v že obstoječo strukturo peptidoglikana v procesu transpeptidacije. Pri tem procesu sodelujejo encimi transpeptidaze, ki se vežejo na D-Ala-D-Ala enoto pentapeptida in nato odcepijo terminalni D-alanin (20).



Slika 8: Vgradnja prekursorja v že obstoječi peptidoglikan.

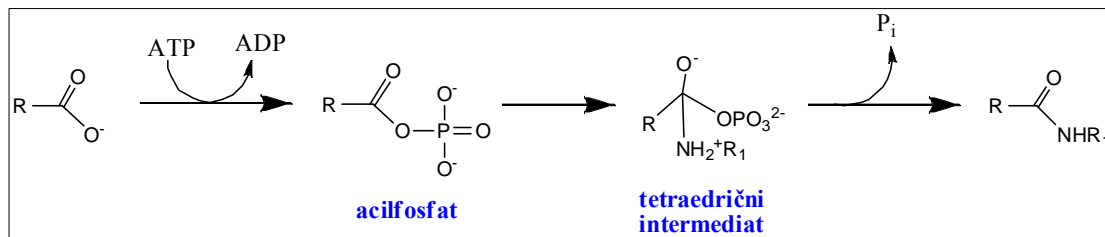
#### 4.5. MUR ENCIMI

Mur-ligaze so nujno potrebni encimi za sintezo peptidoglikana, zato lahko z zaviranjem njihovega delovanja vplivamo na biosintezo bakterijske celične stene, s tem pa na preživetje bakterije. Pri različnih bakterijskih vrstah imajo podobno zaporedje aminokislin in 3D strukturo, zato lahko pričakujemo, da bo imel dober inhibitor Mur-ligaz širok spekter delovanja. Sestavljene so iz treh domen: N-terminalne, centralne in C-terminalne domene. N-terminalna domena veže UDP-prekursor, centralna domena je odgovorna za vezavo ATP, naloga C-terminalne domene pa je vezava aminokislin ali dipeptida. Obstajajo v dveh konformacijah, v odprti ali zaprti (21, 22).



Slika 9: Shema delovanja encimov Mur.

MurC, MurD, MurE in MurF katalizirajo nastanek peptidne vezi ob hkratni cepitvi ATP v ADP in anorganski fosfat ( $P_i$ ), ki je vir energije za potek reakcije. V prvi stopnji aktivirajo karboksilno skupino UDP prekursorja z  $\gamma$ -fosfatno skupino ATP, pri čemer se tvori acilfosfatni intermediat. Sledi nukleofilni napad  $-NH_2$  skupine aminokislina ali dipeptida, nastane nestabilen tetraedrični intermediat, z odcepom anorganskega fosfata pa nastane nova peptidna vez (21, 22).



Slika 10: Mehanizem nastanka peptidne vezi.

#### 4.5.1. LIGAZA MurC

Encim UDP-*N*-acetilmuramat L-alanin-ligaza (MurC) sodi v naddružino Mur-sintetaz in je 50 kDaltonov velik protein, ki katalizira pripenjanje prve aminokislina, le-ta je največkrat L-alanin, redkeje L-serin ali glicin, na peptidno verigo (Slika 12).

Kristalna struktura MurC je znana in so jo določili pri treh vrstah bakterij: *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae* in *Thermotoga maritima*. Encim je sestavljen iz treh domen (Slika 11):

##### 1. N-terminalna domena:

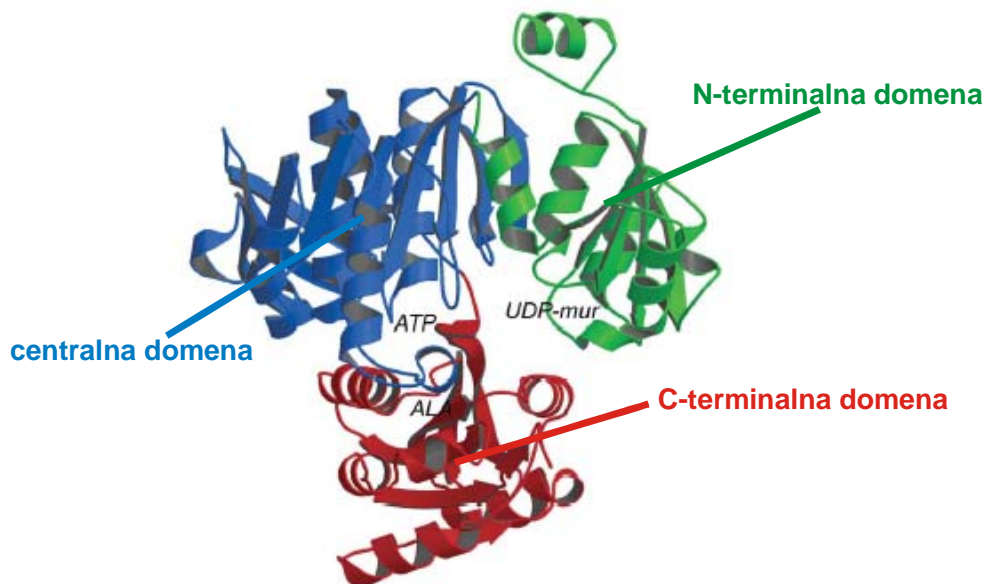
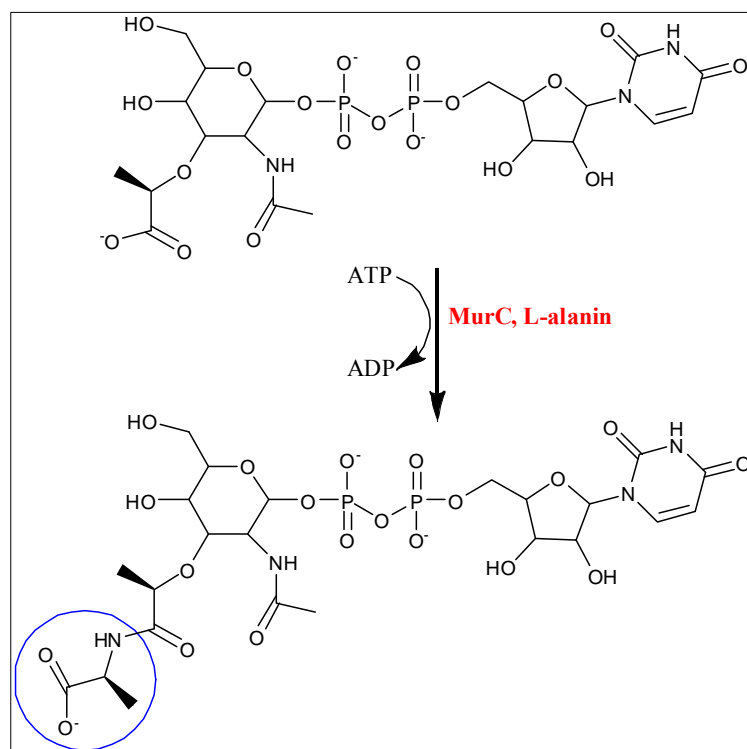
- sestavlja jo 5 centralnih paralelnih  $\beta$ -struktur, ki jih obdajajo štiri  $\alpha$ -vijačnice in vsebuje dinukleotidni vezavni zavoje (Rossmannovo zvitje);
- veže nukleotidni del substrata UDP-MurNAc z zanko, ki vsebuje veliko glicinov in tvori povezave s fosfatnima skupinama UDP.

##### 2. centralna domena:

- največja, na sredini jo sestavlja 7 paralelnih  $\beta$ -struktur, obdaja pa jih pet  $\alpha$ -vijačnic;
- tvori interakcije s purinskim obročem adenina in fosfatnimi skupinami ATP.

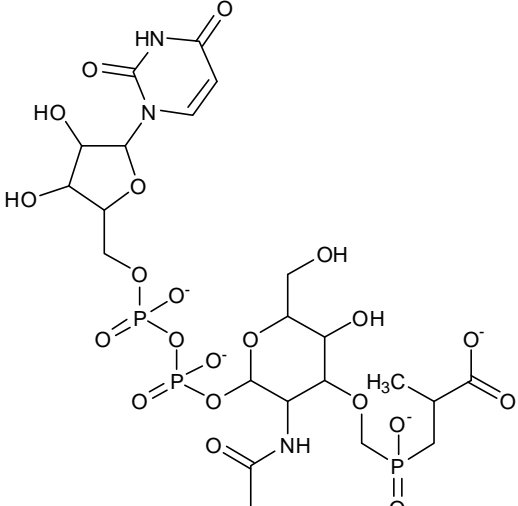
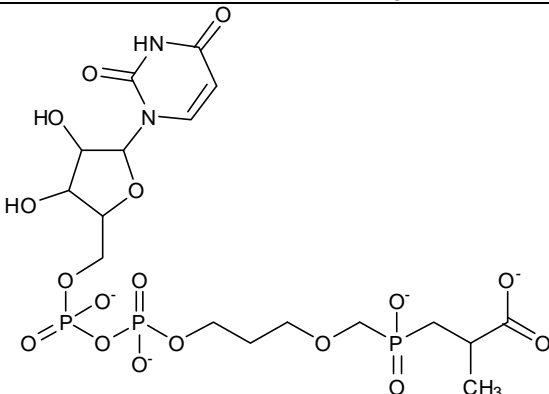
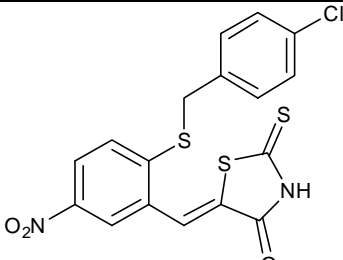
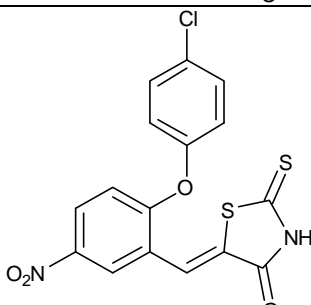
3. C-terminalna domena:

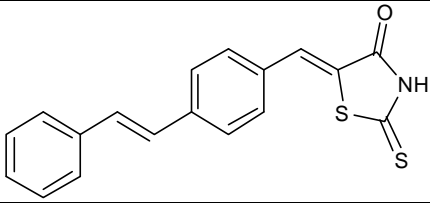
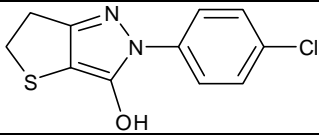
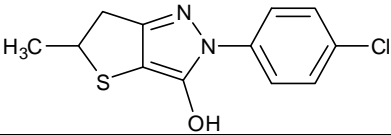
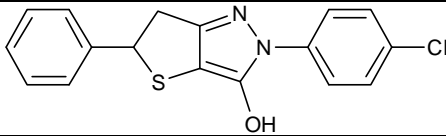
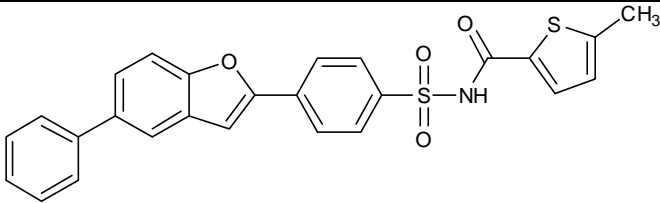
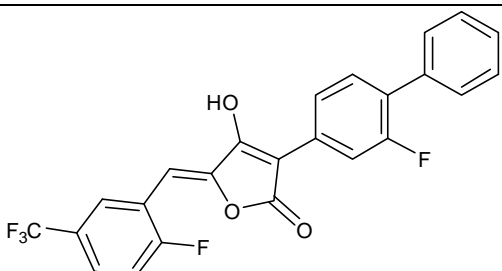
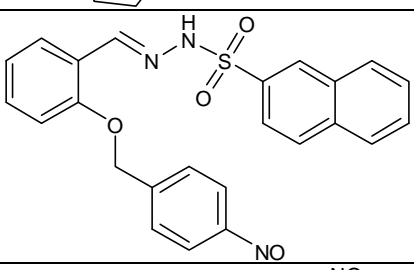
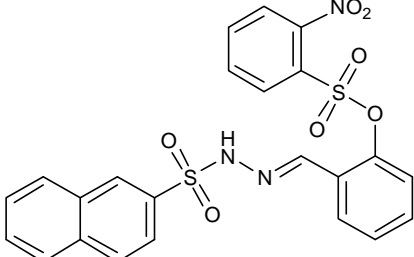
- leži nad centralno domeno, sestavlja jo 5 paralelnih  $\beta$ -struktur in 1 antiparalelna  $\beta$ -struktura, katere obdaja 5  $\alpha$ -vijačnic;
- tvori povezave z ribozo in  $\alpha$ -fosfatno skupino ATP ter je odgovorna za vezavo in orientacijo substrata L-alanina. (9, 23)

Slika 11: *MurC Escherichie coli*.Slika 12: *Reakcija katalizirana z encimom MurC.*

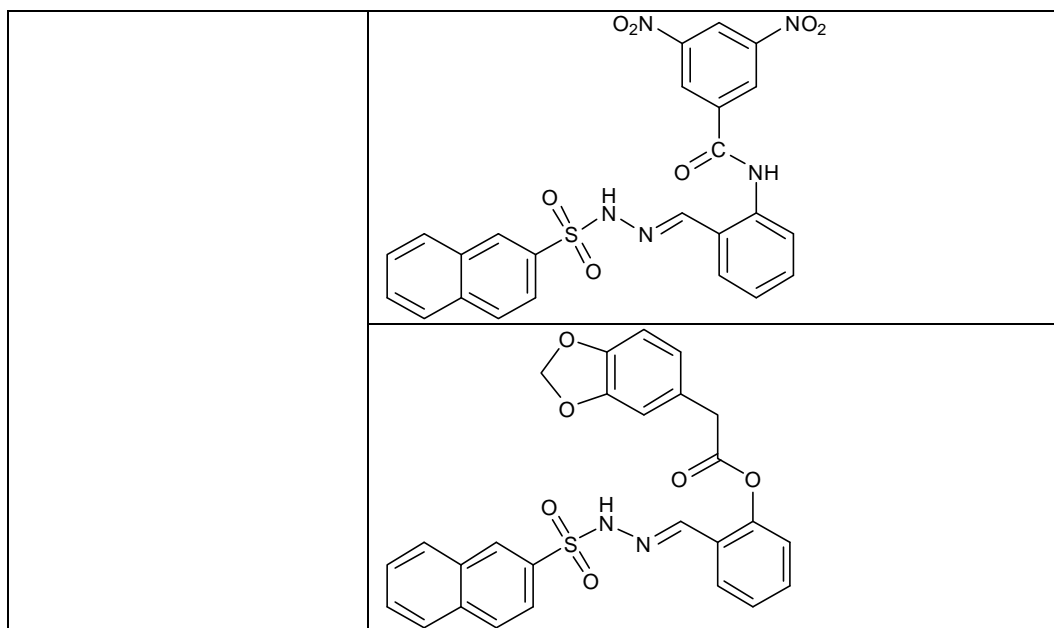
Znanih je že nekaj inhibitorjev encima MurC, ki so predstavljeni v preglednici III (12, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32).

PREGLEDNICA III: Inhibitorji MurC.

<b>Fosfinatni inhibitorji</b>	
	
<b>Benzilidenrodanini</b>	
	

	
<b>Derivati</b> <b>2-fenil-5,6-dihidro-2H-</b> <b>tieno [3,2-c] pirazol-3-ola</b>	
	
	
<b>Derivati benzofuran acil-</b> <b>sulfonamidov</b>	
<b>Pulvinoni</b>	
<b>Sulfonohidrazidi</b>	
	





#### 4.5.2. *LIGAZA MurD*

Encim UDP-N-acetilmuramoil-L-alanin D-glutamat ligaza (MurD) sodi v naddružino Mur-sintetaz in je 47 kDaltonov velik protein, ki katalizira pripenjanje D-glutaminske kisline in tako nastanek produkta UDP-N-acetilmuramil-L-Ala-D-Glu (Slika 14).

Encim MurD potrebuje za svoje delovanje dva  $Mg^{2+}$  iona, ki sta odgovorna za vezavo ATP in nastanek acilfosfata ter je sestavljen iz treh domen (Slika 13):

1. N-terminalna domena:

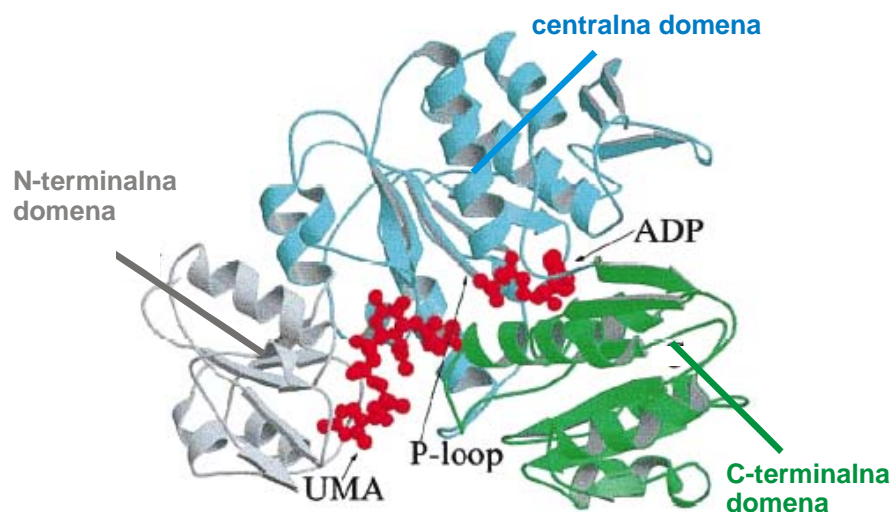
- sestavlja jo 5 paralelnih  $\beta$ -struktur, ki jih obdajajo štiri  $\alpha$ -vijačnice in vsebuje dinukleotidni vezavni zavo (Rossmanovo zvitje);
- veže nukleotidni del substrata UDP-N-acetilmuramil-L-Ala.

2. centralna domena:

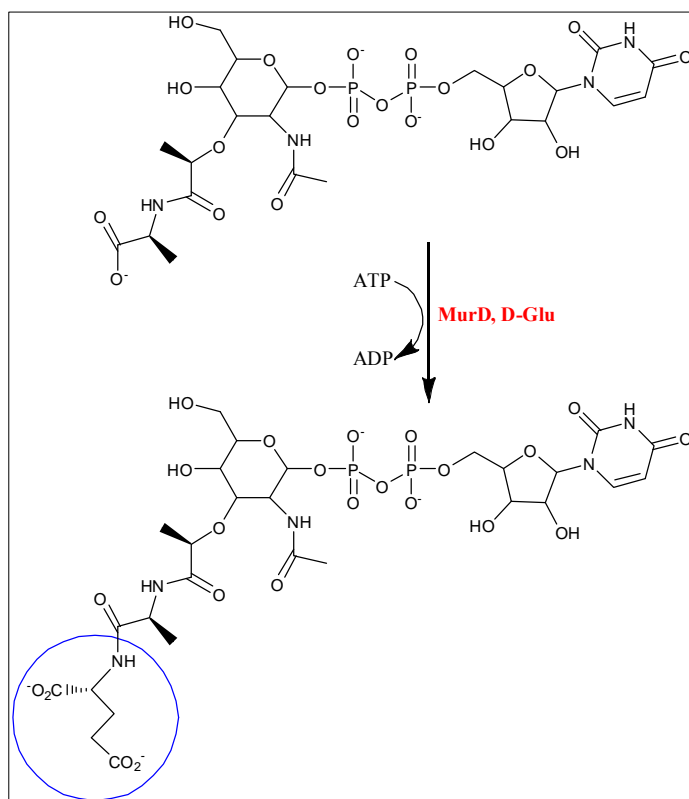
- sestavlja jo 6 paralelnih  $\beta$ -struktur, obdaja pa jih 7  $\alpha$ -vijačnic in 3 majhne antiparalelne  $\beta$ -strukture;
- odgovorna za vezavo ATP.

3. C-terminalna domena:

- sestavlja jo 5 paralelnih  $\beta$ -struktur in 1 antiparalelna  $\beta$ -struktura, katere obdaja 5  $\alpha$ -vijačnic;
- katalizira pripenjanje D-glutaminske kislin. (22, 26)



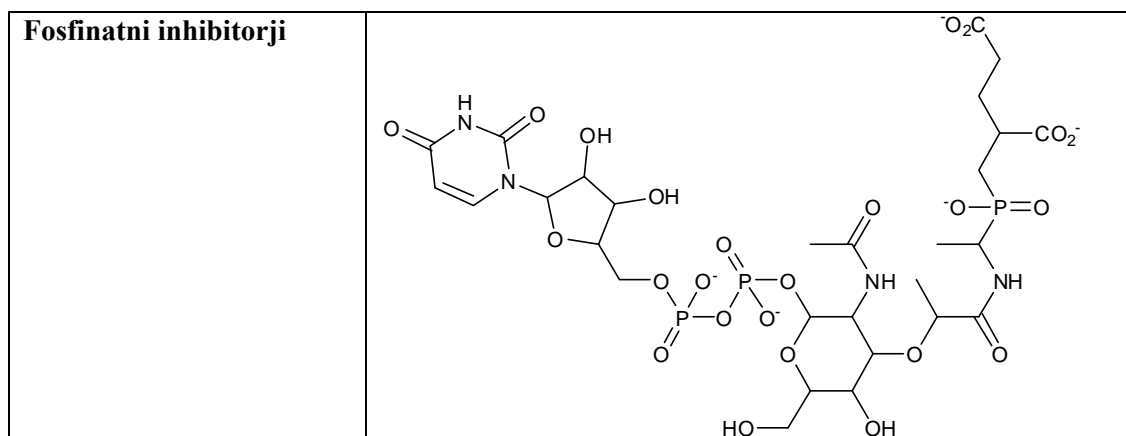
Slika 13: *Struktura Mur D-substrat-ATP kompleksa.*

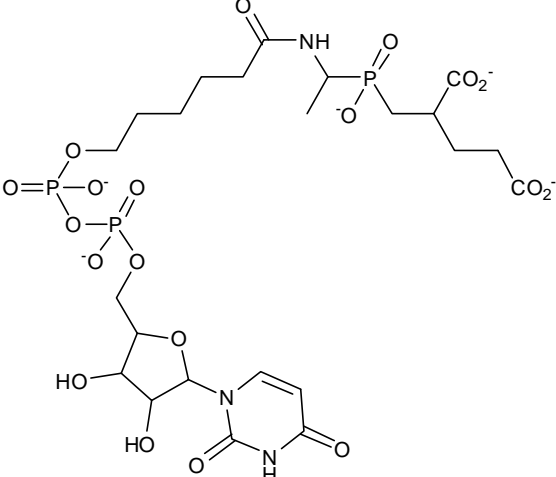
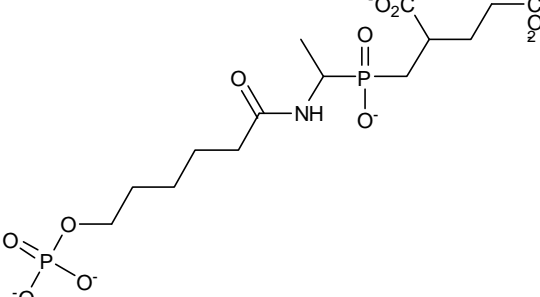
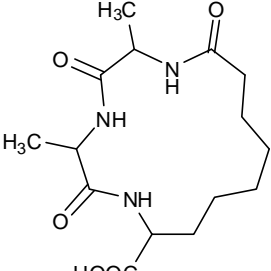
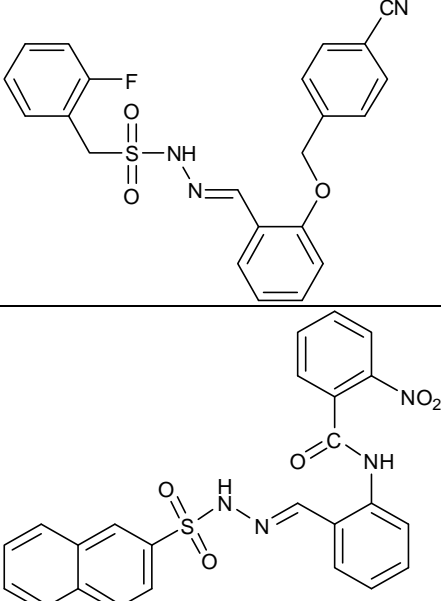


Slika 14: *Reakcija katalizirana z encimom MurD.*

V preglednici IV so predstavljeni nekatere nove spojine, ki izkazujejo inhibično delovanje proti encimu MurD (12, 33, 34).

PREGLEDNICA IV: *Inhibitorji MurD.*

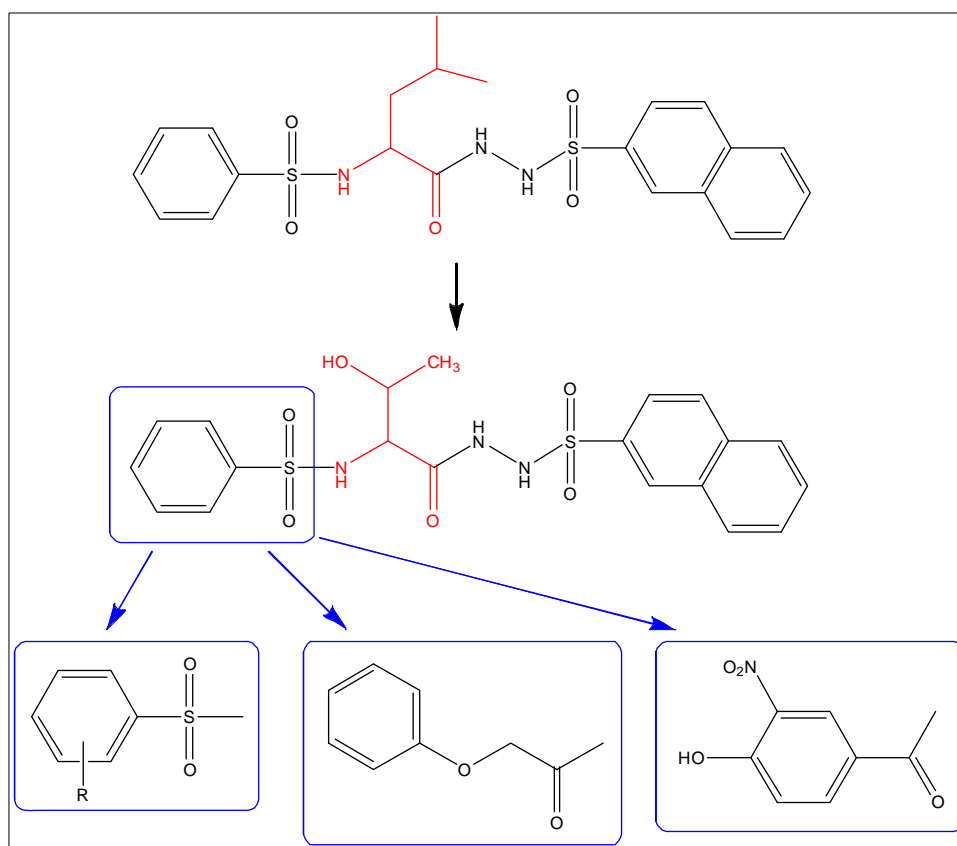


	 <p>Chemical structure of a complex molecule featuring a ribose sugar, a pyridinone ring, and a long chain with two phosphate groups and a terminal carboxylate group.</p>
	 <p>Chemical structure of a molecule with a long chain, a phosphate group, and a terminal carboxylate group.</p>
<b>Makrociklični inhibitorji</b>	 <p>Chemical structure of a macrocyclic inhibitor with a 10-membered ring and several amide and methyl groups.</p>
<b>Sulfonohidrazidi</b>	 <p>Chemical structures of two sulfonohydrazide derivatives. The top one has a fluorophenyl group and a cyanophenyl group. The bottom one has a naphthalenyl group and a nitrophenyl group.</p>

## 5. NAČRT DELA

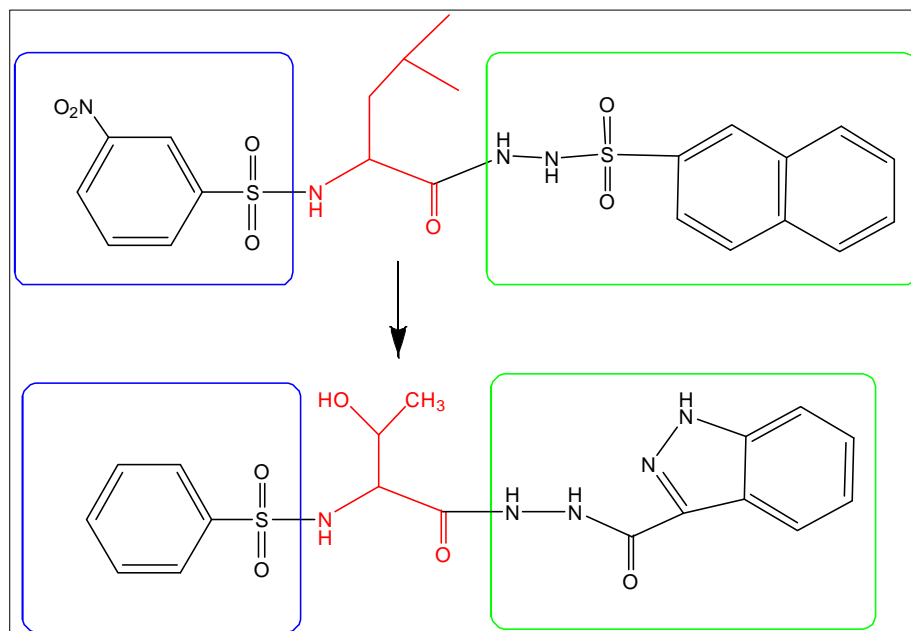
V okviru diplomske naloge bomo pripravili več novih, potencialnih inhibitorjev encimov MurC in MurD, in sicer s posnemanjem strukture substratov in produktov encimskih reakcij, ki jih ta dva encima katalizirata. Pri načrtovanju spojin bomo kot spojino vodnico uporabili *N*-(4-metil-1-(2-naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksopentan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamid, ki ima v 250  $\mu\text{M}$  koncentraciji rezidualno aktivnost 43% ter  $\text{IC}_{50}$  približno 245  $\mu\text{M}$  na izoliranem MurC encimu. Spojina vodnica je imela tudi izraženo protibakterijsko delovanje na grampozitivni *S. aureus* (MRSA) z  $\text{MIC} = 128 \mu\text{g/mL}$ .

Spojino vodnico bomo modificirali na različnih mestih, in sicer tako, da bomo levcinski del molekule zamenjali s treoninskim fragmentom z namenom izboljšanja vodotopnosti. 3-nitrofenilsulfonamidni fragment bomo nato zamenjali z različnimi aromatskimi sulfonamidi, z 2-fenoksiacetamidom in 4-hidroksi-3-nitrobenzamidom ter tako pripravili različne analoge (Slika 15).



Slika 15: Zamenjava levcinskega dela in 3-nitrobenzensulfonilnega dela spojine vodnice.

Prav tako bomo pripravili spojino, ki ima poleg zamenjave levcinskega dela s treoninskim modificirana oba konca molekule, in sicer bomo zamenjali 3-nitrofenilsulfonilni fragment s fenilsulfonilno skupino ter naftalen-2-sulfonilni del z 1H-indazol-3-karbohidrazidom (Slika 16).



Slika 16: Zamenjava levcinskega dela, 3-nitrobenzensulfonilskega dela in naftalen-2-sulfonohidrazidnega dela spojine vodnice.

Vsem novim spojinam bomo z biokemičnimi testiranjmi določili *in vitro* inhibitorno aktivnost na MurC in MurD encimih. Pričakujemo, da bodo dobljeni rezultati pripomogli k razumevanju strukturnih zahtev za inhibitorno delovanje na Mur-ligazah in nam dali koristne napotke za nadaljnje raziskave na področju nizkomolekularnih inhibitorjev biosinteze bakterijske celične stene.

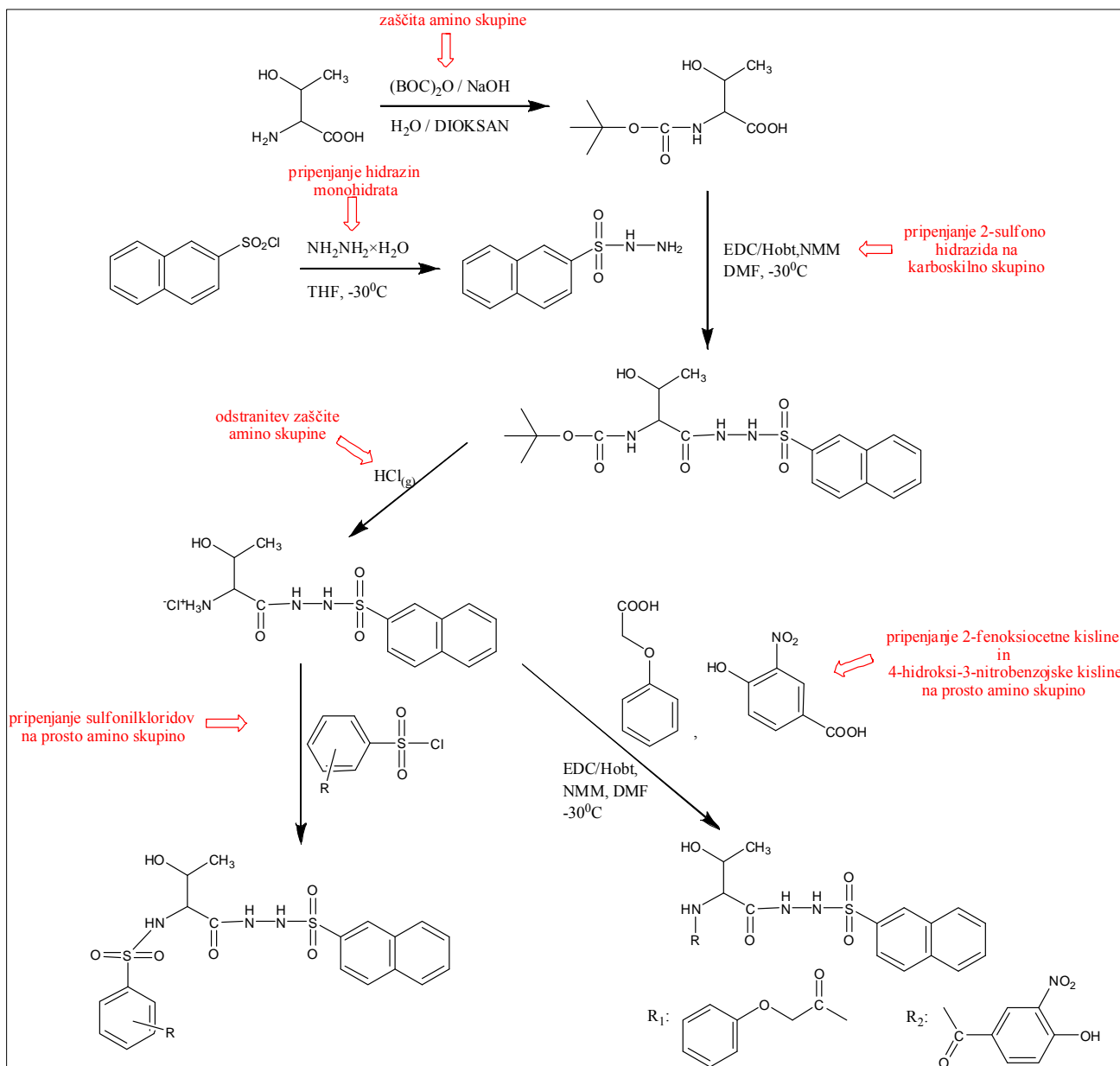
## 5.1. REAKCIJSKE SCHEME

Sinteza spojin bo potekala po dveh različnih sinteznih poteh:

### 1. sintezna pot

Kot izhodno spojino bomo uporabili L-treonin in najprej z (BOC)<sub>2</sub>O (di-*tert*-butildikarbonat) zaščitili prosto aminske skupino. Iz naftalen-2-sulfonilklorida in hidrazin monohidrata bomo pripravili naftalen-2-sulfonohidrazid kot pomemben sinton ter ga

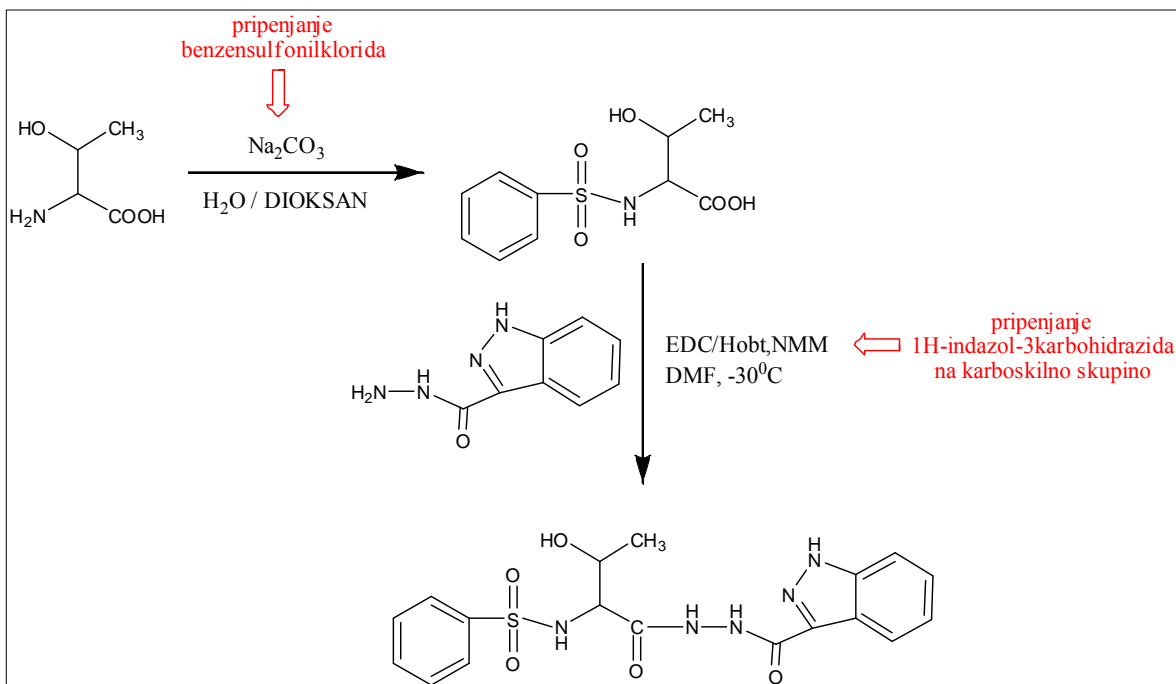
pripeli na prosto karboksilno skupino L-treonina. Sledila bo odstranitev terc-butilkarboksilne zaščite v kislem s HCl ter pripenjanje različnih aromatskih sulfonilkloridov ter 2-fenoksiacetne kisline in 4-hidroksi-3-nitrobenzojske kisline na odščiteni amsko skupino (Slika 17).



Slika 17: Reakcijska shema prve sintezne poti.

## 2. sintezna pot

Na prosto aminsko skupino izhodne spojine L-treonina bomo pripeli benzensulfonilklorid. Pripravili bomo aromatski hidrazid kot pomembni sinton in ga uvedli na prosto karboksilno skupino L-treonina, pri čemer bo prišlo do tvorbe amidne vezi (Slika 18).



Slika 18: Reakcijska shema druge sintezne poti.



## 6. MATERIALI IN METODE

### 6.1. MATERIALI

Pri delu smo uporabljali kemikalije in topila proizvajalcev Acros Organics, Aldrich, Fluka, Merck in Kemika.

### 6.2. METODE

#### 6.2.1. KROMATOGRFSKE METODE

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

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

Za flash kromatografijo smo kot stacionarno fazo uporabljali slikikagel z velikostjo delcev 0,040 – 0,063 nm izdelovalca Merck in različne mobilne faze.

#### 6.2.2. SPEKTROSKOPSKE METODE

##### Jedrska magnetna resonanca (NMR)

<sup>1</sup>H NMR spektri so bili posneti z instrumentom Bruker Avance DPX<sub>300</sub> na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo Univerze v Ljubljani, ki deluje v okviru Centra za jedrsko magnetno resonanco visoke ločljivosti. Kot topilo smo uporabljali DMSO-d<sub>6</sub> in DCCl<sub>3</sub>. Spektri so bili posneti pri 300,12 MHz s TMS kot internim standardom pri temperaturi 302K. Za obdelavo spektrov smo uporabili računalniški program MestRe-C podjetja Masterlab Research S.L.

### Masna spektrometrija (MS)

Masni spektri so bili posneti na spektrometru Varian-MAT 311 A, Q-TOF Premier z ESI tehniko na Inštitutu Jožefa Štefana v Ljubljani.

### Infrardeča spektroskopija (IR)

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

### **6.2.3. ELEMENTNA ANALIZA**

Elementne analize spojin za elemente ogljik, vodik in dušik so bile opravljene z analizatorjem Perkin Elmer 2400 CHN na Fakulteti za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerze v Ljubljani.

### **6.2.4. DOLOČEVANJE TALIŠČA**

Temperatura tališča je bila izmerjena z Polytherm A Heintsch mikroskopom podjetja Wagner & Munz z ogrevalno mizico.

### **6.2.5. OPTIČNA SUČNOST**

Optična sučnost spojin je bila izmerjena s polarimetrom Perkin – Elmer 1241MC na Fakulteti za farmacijo, na katedri za farmacevtsko kemijo, in sicer pri valovni dolžini 589,3 nm v kiveti dolžine 10 cm.

### **6.2.6. BIOLOŠKA TESTIRANJA**

Spojine, ki smo jih sintetizirali, so bile testirane na inhibitorno aktivnost na encimih MurC in MurD s testom z malahitnim zelenim. Test se izvaja na mikrotitrski ploščici s pripravljenimi raztopinami encima, substrata in testiranih spojin. Osnova testa je tvorba fosfomolibdatnega kompleksa med Pi, ki nastane pri hidrolizi ATP, in barvilom malahitnim zelenim. Kompleks lahko kvantificiramo spektrofotometrično pri valovni dolžini 650 nm. Katalitično aktivnost encimov MurC in MurD ovrednotimo na podlagi

množine fosfata, ki nastane pri reakciji. Ob dodatku inhibitorja se katalitična aktivnost zniža, zato je množina nastalega fosfata manjša v primerjavi s kontrolo brez inhibitorja.

Testi so bili izvedeni v okviru projekta INTAFAR na Katedri za farmacevtsko kemijo, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani.

### **6.3. APARATURE IN LABORATORIJSKA OPREMA**

Pri delu smo uporabljali standardno laboratorijsko opremo ter naslednje aparature: odstranjevalec topil pod znižanim tlakom (rotavapor) Buchi, magnetni mešalnik, laboratorijska tehtnica Mettler Toledo, analitska tehtnica Mettler Toledo.

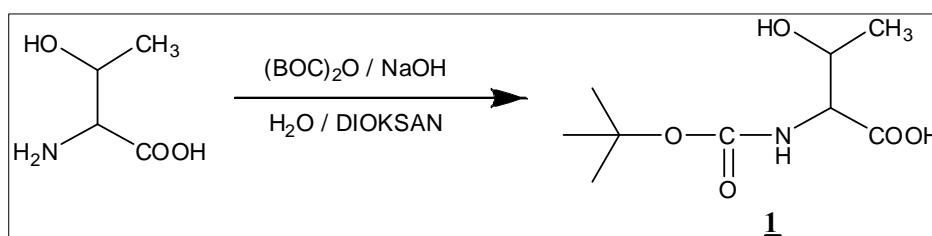
### **6.4. NOMENKLATURA IN RISANJE SPOJIN**

Za risanje in poimenovanje strukturnih formul spojin smo uporabljali računalniški program ChemBioDraw 11.0.1 podjetja CambridgeSoft.

## 7. EKSPERIMENTALNO DELO

### 7.1. PRVA SINTEZNA POT

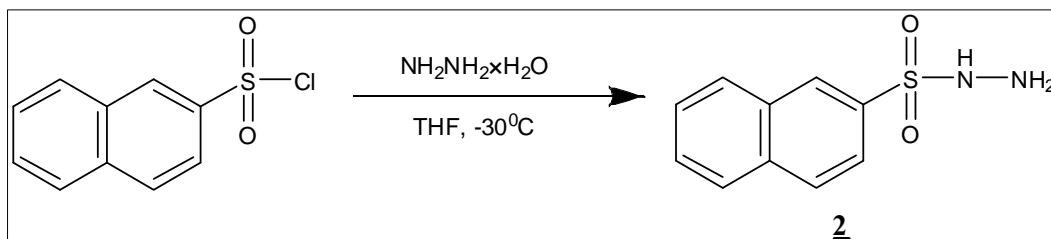
#### 7.1.1. *Sinteza N-(terc-butiloksikarbonil) L-treonina (1)*



Spojino **1** smo sintetizirali po postopku iz članka (13).

20,00 g (0,1679 mol) L-treonina smo raztopili v 300 mL vode in dodali 6,72 g (0,1679 mol) NaOH. Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli in po kapljicah ob mešanju dodali 40,31 g (0,1847 mol) di-*terc*-butilkarbonata ((BOC)<sub>2</sub>O) raztopljenega v 200 mL dioksana. Pri sobni temperaturi smo nato reakcijsko zmes mešali 2 uri in pod znižanim tlakom uparili dioksan. Zaostanku smo dodali 300 mL vode in ekstrahirali z 2 × 100 mL etilacetata. Nato smo vodno fazo nakisali z 1M HCl do pH = 1 ter ekstrahirali z etilacetatom (3×100 mL), da je vsa spojina **1** prešla v organsko fazo. Ekstrakcijo smo spremljali s TLC (MF: DKM/MeOH = 7/1, orositveni reagent: ninhidrin). Združene organske frakcije smo sprali s 30 mL nasičene raztopine NaCl, nato smo dodali brezvodni Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odfiltrirali in pod znižanim tlakom uparili etilacetat. Nastala je viskozna brezbarvna tekočina. Dodali smo dietileter, segreli in po kapljicah dodali petroleter, nato smo dietileter uparili in ostanek v bučki posušili z vodno črpalko. Nastali so beli kristali katerih masa je bila 29,58 g (144 mmol, 80%).

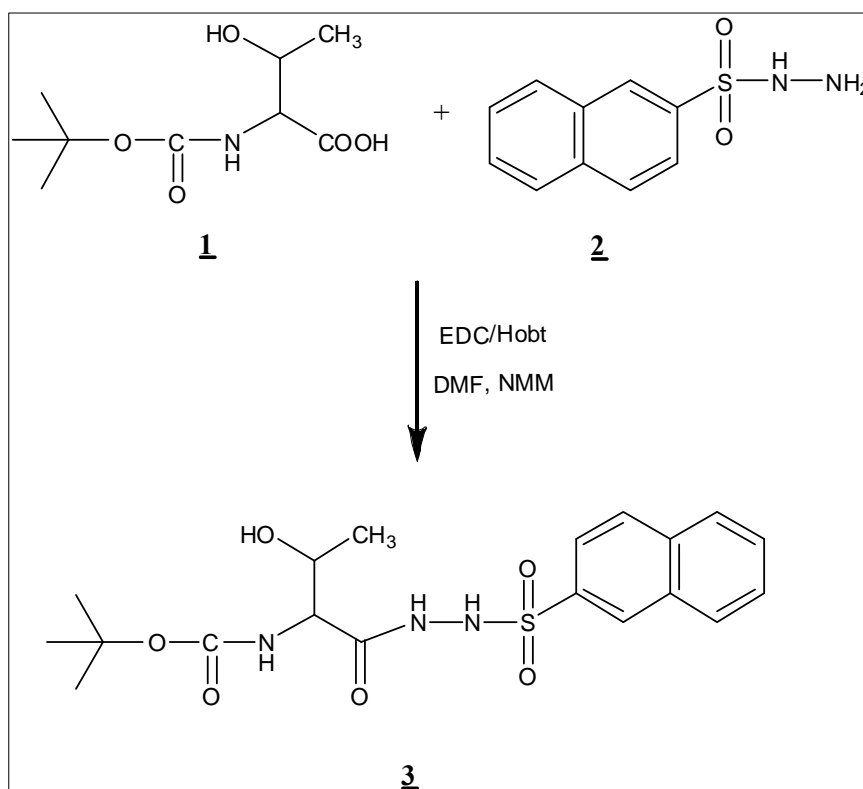
T<sub>tališča</sub>: 152-154<sup>0</sup>C (v lit.: 153-154<sup>0</sup>C (13))

7.1.2. *Sinteza naftalen-2-sulfonohidrazida (2)*

Spojino **2** smo sintetizirali po postopku iz članka (14).

Raztopino 33,50 g (148 mmol) naftalen-2-sulfonilklorida v 200 mL THF smo počasi s kapalnikom dodajali v raztopino 45,9 mL (148 mmol) hidrazin hidrata pri  $-30^{\circ}\text{C}$ . Reakcijsko zmes smo 1 uro mešali na ledeni kopeli, nato pa čez noč pri sobni temperaturi. Po pretečenem času smo THF odparili pod znižanim tlakom in ostanek v bučki prelili s 400 mL etilacetata ter sprali z  $2 \times 30$  mL nasičene raztopine NaCl. Raztopino smo počasi ob mešanju zlili v 1 L heksana. Izpadla je oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem. Dobili smo 32,70 g (147 mol, 100 %) belih kristalov.

$T_{\text{tališča}}$ :  $130\text{-}132^{\circ}\text{C}$  (v lit.:  $131^{\circ}\text{C}$ )

7.1.3. *Sinteza **terc-butil 3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksobutan-2-ilkarbamata (3)***

18,00 g (82,1 mmol) N-(*terc*-butiloksikarbonil)-L-treonina (**1**) smo raztopili v 80 mL DMF, ohladili na ledeni kopeli do približno  $-30^{\circ}\text{C}$  in dodali 18,25 g (82,1 mmol) naftalen-2-sulfonilhidrazina (**2**), 13,7 mL N-metilmorfolina, 17,32 g (90,3 mmol) EDC in 12,19 g (90,3 mmol) HOBt. Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom in 24 ur mešali na sobni temperaturi in nato 24 ur pri temperaturi vrenja. Topilo smo odparili pod znižanim tlakom. Ostanke smo dodali 200 mL etilacetata in spirali štirikrat s 15 mL 10% citronske kisline, dvakrat s 15 mL nasičene vodne raztopine  $\text{NaHCO}_3$  in s 15 mL nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo 15 minut sušili z brezvodnim  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Ostanek smo prelili s 60 mL diklorometana in bučko postavili v hladilnik za 24 ur. Izpadla je bela oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem. Dobili smo 13,48 g (31,8 mmol, 39%) belih kristalov.

**Rf** (MF: diklorometan/metanol = 20/1): 0,22

**Izkoristek:** 39 %

**M** = 423,48 g/mol

**Elementna sestava:**  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 194–196 $^{\circ}\text{C}$

**$^1\text{H-NMR}$**  (300MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 0.96 (d,  $J$  = 5.9 Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH-OH}$ ), 1.37 (s, 9H,  $(\text{CH}_3)_3\text{-C}$ ), 3.77-3.61 (m, 2H,  $\text{CH-CH}$ ), 4.64 (d,  $J$  = 5.6 Hz, 1H,  $\text{CH-OH}$ ), 6.25 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H,  $\text{CH-CH(NH)-CO}$ ), 7.60-7.74 (m, 2H, Ar-H), 7.83 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 8.03 (m, 2H, Ar-H), 8.10 (d,  $J$  = 7.7 Hz, 1H, Ar-H), 8.41 (s, 1H, Ar-H), 9.97 (s, 1H,  $\text{CO-NH-NH}$ ), 10.05 (s, 1H,  $\text{NH-NH-SO}_2$ ) ppm

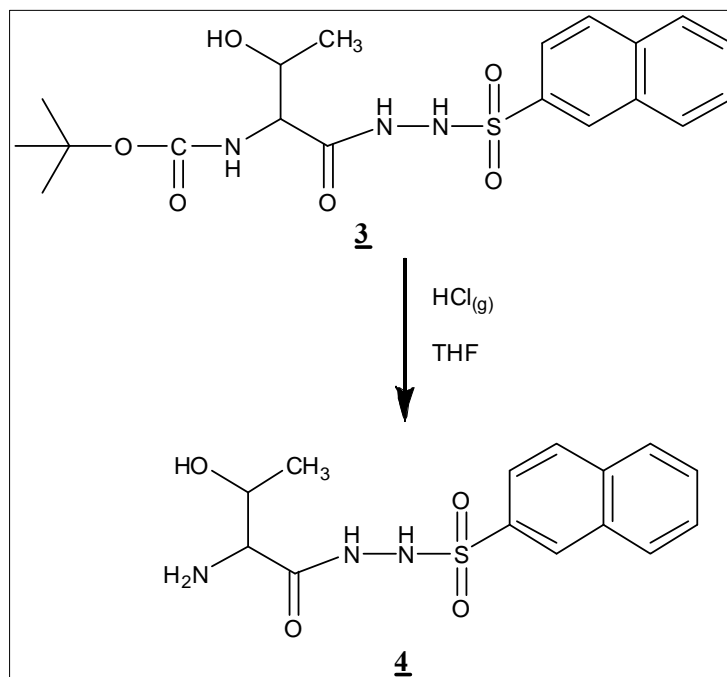
**MS** (ESI): m/z (%): 446 ( $\text{MNa}^+$ , 100), 424,2 ( $\text{MH}^+$ , 9)

**Elementna analiza** za  $\text{C}_{19}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ :

	% C	% H	% N
Izračunano:	53,89	5,95	9,92
Ugotovljeno:	53,81	5,87	10,20

**IR** (KBr): 3431, 3348, 3056, 2979, 2830, 2361, 2342, 1672, 1517, 1447, 1391, 1345, 1245, 1158, 1132, 1054, 1019, 949, 883, 859, 816, 778, 746, 658, 618, 573, 548, 479  $\text{cm}^{-1}$

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -36,5^0$  ( $c = 0,265$  g /100 mL, MeOH)

7.1.4. **Sinteza *N*'-(2-amino-3-hidroksibutanoil)naftalen-2-sulfonohidrazida (**4**)**

5,00 g (11,8 mmol) *tert*-butil 3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksobutan-2-ilkarbamata (**3**) smo raztopili v 200 mL THF in 30 minut na ledu prepihovali z nasičeno HCl. Nato smo pod znižanim tlakom odparili topilo, ostanek v bučki prelili z dietiletrom in nastalo belo oborino odfiltrirali s presesavanjem. Masa nastalih belih kristalov je znašala 3,24 g (10,0 mol, 85 %).

**R<sub>f</sub>** (MF: diklorometan/metanol = 7/1, orositveni reagent: ninhidrin): 0,14

**Izkoristek:** 85%

**M** = 323,37 g/mol

**Elementna sestava:** C<sub>14</sub>H<sub>17</sub>N<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 130-132<sup>0</sup>C

**<sup>1</sup>H-NMR** (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1.08 (d, *J* = 6.3 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-CH-OH), 3.34-3.43 (m, 1H, CH-OH), 3.61 (m, 1H, CH-NH), 5.58 (s, 1H, CHOH), 7.62-7.77 (m, 2H, Ar-H), 7.88-8.35 (m, 6H, Ar-H + NH<sub>3</sub>), 8.46 (m, 1H, ArH), 10.28 (s, 1H, CO-NH-NH), 10.51 (s, 1H, NH-NH-SO<sub>2</sub>), ppm

**MS** (ESI): *m/z* (%): 346,1 (MNa<sup>+</sup>, 25), 324,1 (MH<sup>+</sup>, 61), 136,1 (100)

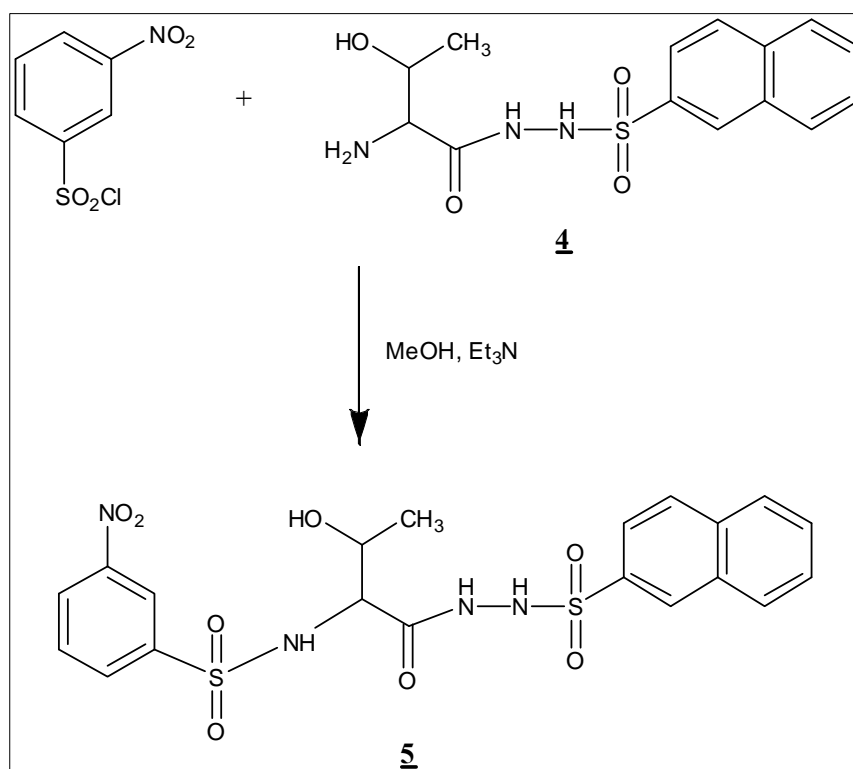
**Elementna analiza** za  $C_{14}H_{17}N_3O_4S \times HCl$ :

	% C	% H	% N
Izračunano:	46,73	5,04	11,68
Ugotovljeno:	46,87	4,71	11,82

**IR** (KBr): 3256, 3071, 2361, 2343, 1678, 1527, 1432, 1337, 1206, 1155, 1132, 1075, 950, 921, 859, 840, 801, 747, 724, 662, 621, 549, 478  $cm^{-1}$

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = -33,2^0$  ( $c = 0,250$  g /100 mL, MeOH)

**7.1.5. Sinteza *N*-(3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonyl)hidrazinil)-1-oksobutan-2-il)-3-nitrobenzensulfonamida (**5**)**



800 mg (2,47 mmol) *N*-(2-amino-3-hidroksibutanoil)naftalen-2-sulfonohidrazida (**4**) smo raztopili v 50 mL metanola in ohladili na ledeni kopeli do približno  $-15^0C$  ter dodali 0,68 mL (4,95 mmol) Et<sub>3</sub>N. Nato smo počasi dodali 548 mg (2,47 mmol) 3-nitrobenzen-1-sulfonylchlorida in pustili mešati na sobni temperaturi 24 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo in ostanek prelili z diklorometanom. Raztopino smo spirali dvakrat s 50 mL 10% citronske kisline, enkrat z 30 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in



enkrat z 30 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo 15 minut sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Ostanek v bučki smo prelili z dietiletrom in postavili v hladilnik za 24 ur. Oborili so se svetlo rjavi kristali, ki smo jih odfiltrirali s presesavanjem. Masa svetlo rjavih kristalov je bila 102 mg (0,201 mmol, 8 %).

**Rf** (MF: diklorometan/metanol = 7/1): 0,39

**Izkoristek:** 8%

**M** = 508,52 g/mol

**Elementna sestava:** C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>

**Opis:** svetlo rjavi kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 124-127<sup>0</sup>C

**<sup>1</sup>H-NMR** (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0.87 (d, *J* = 5.8 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-CH-OH), 3.50-3.65 (m, 2H, CH-CH), 4.68 (m, 1H, CH-OH), 7.60-7.85 (m, 4H, Ar-H), 7.98-8.18 (m, 5H, Ar-H + SO<sub>2</sub>NH), 8.35 (m, 1H, Ar-H), 8.42 (m, 1H, Ar-H), 8.53 (m, 1H, ArH), 10.28 (s, 1H, CO-NH-NH), 10.51 (s, 1H, NH-NH-SO<sub>2</sub>) ppm

**MS** (ESI): *m/z* (%): 531,1 (MNa<sup>+</sup>, 100), 509,1 (MH<sup>+</sup>, 84)

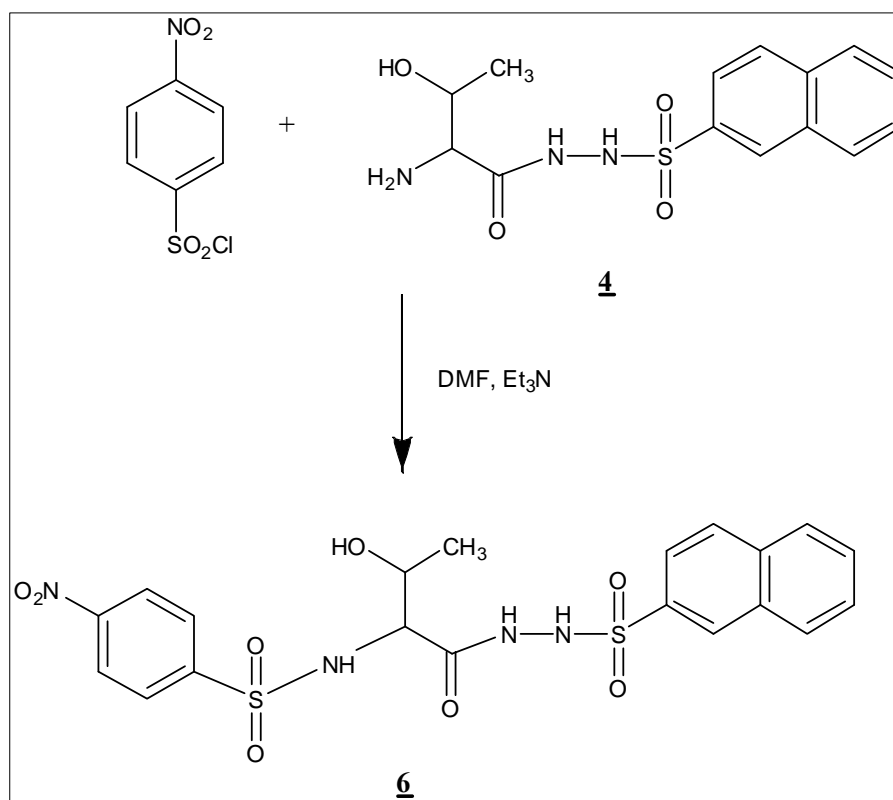
**Elementna analiza** za C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>:

	% C	% H	% N
Izračunano:	47,24	3,96	11,02
Ugotovljeno:	47,62	3,80	10,41

**IR** (KBr): 3487, 3294, 3056, 2361, 2342, 1675, 1607, 1533, 1406, 1352, 1164, 1130, 1075, 1025, 924, 878, 856, 813, 735, 662, 618, 595, 546, 476 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -64,6<sup>0</sup> (c = 0,285 g /100 mL, MeOH)

7.1.6. *Sinteza N-(3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonyl)hidrazinil)-1-oksobutan-2-il)-4-nitrobenzensulfonamida (6)*



520 mg (1,61 mmol) N`-(2-amino-3-hidroksibutanoil)naftalen-2-sulfonohidrazida (**4**) smo raztopili v 30 mL DMF, ohladili na ledeni kopeli do približno  $-15^{\circ}\text{C}$  in dodali 0,44 mL (3,22 mmol) Et<sub>3</sub>N. Nato smo počasi dodali 356 mg (1,61 mmol) 4-nitrobenzen-1-sulfonylklorida in pustili mešati na sobni temperaturi 24 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo in ostanek prelili z etilacetatom. Raztopino smo spirali dvakrat z 15 mL 10% citronske kisline, dvakrat z 10 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in enkrat z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo 15 minut sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (SF: silikagel, MF: heksan/etilacetat = 1/1). Dobili smo 212 mg (0,417 mmol, 26 %) belih kristalov.

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

**Izkoristek:** 26%

**M** = 508,52 g/mol

**Elementna sestava:** C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 123-125<sup>0</sup>C

**<sup>1</sup>H-NMR** (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 0.88 (d, *J* = 5.6 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-CH-OH), 3.50-3.65 (m, 2H, CH-CH), 4.71 (d, *J* = 4.0 Hz, 1H, CH-OH), 7.59-7.74 (m, 2H, Ar-H), 7.78 (m, 1H, Ar-H), 7.99-8.19 (m, 3H, Ar-H + SO<sub>2</sub>NH), 8.14 (A<sub>2</sub>X<sub>2</sub>, *J* = 8.8 Hz, Δ*v* = 108 Hz, 4H, Ar-H), 8.32 (A<sub>2</sub>X<sub>2</sub>, *J* = 8.8 Hz, Δ*v* = 108 Hz, 2H, Ar-H), 8.38 (s, 1H, Ar-H), 9.84 (s, 1H, CO-NH-NH), 10.00 (s, 1H, NH-NH-SO<sub>2</sub>) ppm

**MS** (ESI): *m/z* (%): 531,1 (MNa<sup>+</sup>, 100), 509,1 (MH<sup>+</sup>, 29,5)

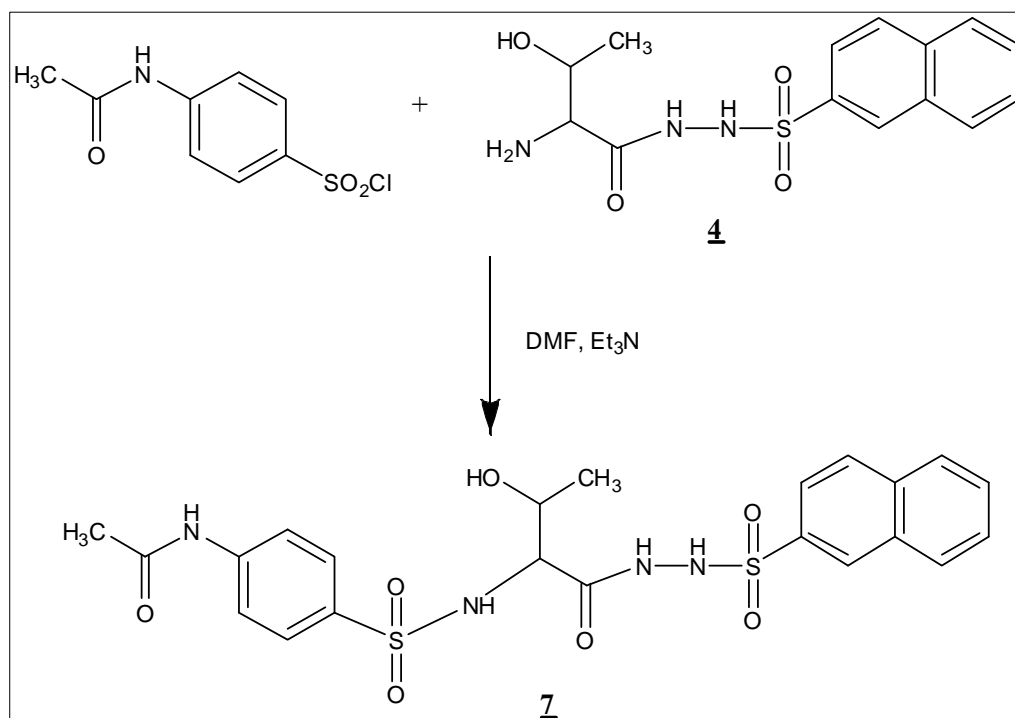
**Elementna analiza** za C<sub>20</sub>H<sub>20</sub>N<sub>4</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>:

	% C	% H	% N
Izračunano:	47,24	3,96	11,02
Ugotovljeno:	47,20	3,87	10,89

**IR** (KBr): 3488, 3317, 3060, 2361, 2343, 1701, 1683, 1606, 1524, 1340, 1165, 1132, 1075, 916, 854, 815, 739, 684, 619, 547, 477 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -43,6<sup>0</sup> (c = 0,260 g /100 mL, MeOH)

**7.1.7. Sinteza** *N*-(4-(*N*-(3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonyl)hidrazinil)-1-okso-butan-2-il)sulfamoil)fenil)acetamida (**7**)



500 mg (1,55 mmol) N'-(2-amino-3-hidroksibutanoil)naftalen-2-sulfonohidrazida (**4**) smo raztopili v 30 mL DMF, ohladili na ledeni kopeli do približno  $-15^{\circ}\text{C}$  in dodali 0,64 mL (4,64 mmol)  $\text{Et}_3\text{N}$ . Nato smo počasi dodali 361 mg (1,55 mmol) N-acetilsulfanilil klorida in pustili mešati na sobni temperaturi 24 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo in ostanek prelili z etilacetatom. Raztopino smo spirali dvakrat z 15 mL 10% citronske kisline, dvakrat z 15 mL nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$  in enkrat z 10 mL nasičene raztopine  $\text{NaCl}$ . Organsko fazo smo 15 minut sušili z  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ , nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Produkt smo prekrizalizirali iz etanola. Dobili smo 42 mg (0,081 mmol, 5 %) belih kristalov.

**Rf** (MF: diklorometan/metanol = 9/1): 0,25

**Izkoristek:** 5%

**M** = 520,58 g/mol

**Elementna sestava:**  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_2$

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 187-188 $^{\circ}\text{C}$

**$^1\text{H-NMR}$**  (300MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  = 0.83 (d,  $J$  = 6.2 Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH-OH}$ ), 2.08 (s, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CO-NH}$ ), 3.51 (m, 1H,  $\text{NHCHCH}$ ), 3.54-3.62 (m, 2H,  $\text{CH-CH}$ ), 4.62 (d,  $J$  = 5.1 Hz, 1H,  $\text{CH-OH}$ ), 7.37 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 7.73-7.61 (m, 6H, Ar-H), 7.80 (m, 1H, Ar-H), 7.98-8.06 (m, 2H, Ar-H +  $\text{SO}_2\text{NH}$ ), 8.09 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.40 (m, 1H,  $\text{NH-CH-CH}$ ), 9.91 (s, 1H,  $\text{CO-NH-NH}$ ), 9.92 (s, 1H,  $\text{NH-NH-SO}_2$ ), 10.26 (s, 1H, Ar-NH-CO) ppm

**MS** (ESI): m/z (%): 543,1 ( $\text{MNa}^+$ , 100), 521,1 ( $\text{MH}^+$ , 38)

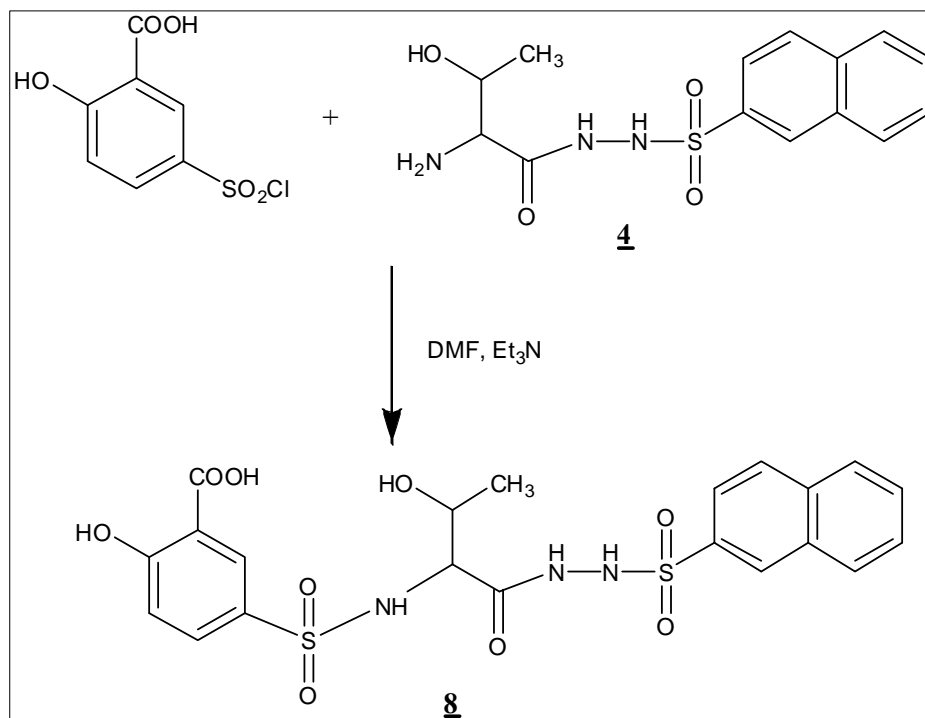
**Elementna analiza** za  $\text{C}_{22}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}_2$ :

	% C	% H	% N
Izračunano:	50,76	4,65	10,76
Ugotovljeno:	50,45	4,72	10,95

**IR** (KBr): 3594, 3246, 3055, 2360, 1679, 1593, 1535, 1402, 1338, 1267, 1159, 1068, 923, 670, 548  $\text{cm}^{-1}$

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -55,4^{\circ}$  ( $c = 0,260$  g /100 mL, MeOH)

7.1.8. *Sinteza 2-hidroksi-5-(N-(3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonyl)hidrazinil)-1-oksobutan-2-il)sulfamoil)benzojske kisline (8)*



500 mg (1,55 mmol) N<sup>1</sup>-(2-amino-3-hidroksibutanoil)naftalen-2-sulfonohidrazida (**4**) smo raztopili v 30 mL DMF, ohladili na ledeni kopeli do približno -30<sup>0</sup>C ter dodali 0,64 mL (4,64 mmol) Et<sub>3</sub>N. Nato smo počasi dodali 366 mg (1,55 mmol) 5-(klorosulfonyl)-2-hidroksibenzojske kisline in pustili mešati na sobni temperaturi 24 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo in ostanek prelili z etilacetatom ter dodali 1M NaOH (pH=10). Raztopino smo spirali dvakrat z 10 mL diklorometana in jo nato z 1M HCl nakisali do pH = 1, pri čemer so se oborili rjavi kristali, ki smo jih odfiltrirali s presesavanjem. Organsko in vodno fazo smo združili, jo segreli in pustili 24 ur. Oborino, ki je nastala, smo odfiltrirali s presesavanjem. Dobili smo 26 mg (0,050 mmol, 3 %) belih kristalov.

**Rf** (MF: diklorometan/metanol = 4/1): 0,29

**Izkoristek:** 3%

**M** = 523,07 g/mol

**Elementna sestava:** C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 141-143<sup>0</sup>C

**<sup>1</sup>H-NMR** (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1.09 (d, *J* = 6.2 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-CH-OH), 3.49 (m, 1H, NHCH-CH), 3.53-3.63 (m, 1H, CH-CH-OH), 7.05 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.54 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.75-7.59 (m, 2H, Ar-H), 7.80 (m, 2H, Ar-H), 7.99-8.06 (m, 2H, Ar-H + SO<sub>2</sub>NH), 8.09 (d, *J* = 7.7 Hz, 1H, Ar-H), 8.17 (m, 1H, Ar-H), 9.88 (s, 1H, CO-NH-NH), 9.94 (s, 1H, NH-NH-SO<sub>2</sub>) ppm

**MS** (ESI): *m/z* (%): 524,1 (MH<sup>+</sup>, 100), 546,1 (MNa<sup>+</sup>, 57), 522,1 (MH<sup>+</sup>, 100)

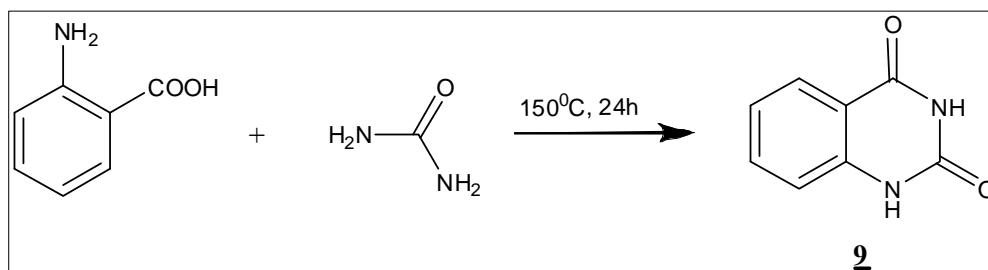
**Elementna analiza** za C<sub>21</sub>H<sub>21</sub>N<sub>3</sub>O<sub>9</sub>S<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O:

	% C	% H	% N
Izračunano:	45,08	4,50	7,51
Ugotovljeno:	45,44	4,42	7,91

**IR** (KBr): 3854, 3293, 2361, 2343, 1696, 1528, 1348, 1217, 1165, 1132, 1074, 816, 747, 669, 548, 477 cm<sup>-1</sup>

**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = +3,6<sup>0</sup> (c = 0,240 g /100 mL, MeOH)

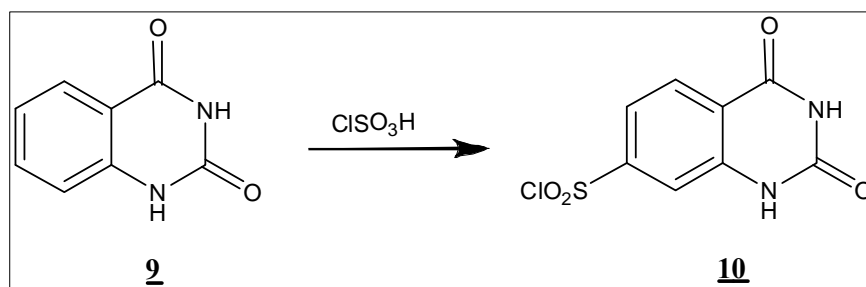
#### 7.1.9. *Sinteza kinazolin-2-4(1H,3H)-diona (2)*



Spojino **2** smo sintetizirali po postopku iz članka (24).

10 g (73 mmol) 2-aminobenzojske kisline smo natehtali v bučko, dodali 43,78 g (730 mmol) sečnine in segrevali na 150<sup>0</sup>C 24 ur. Zmes smo nato ohladili na 100<sup>0</sup>C in dodali volumsko enak ekvivalent vode. Po 10 minutah smo oborino odfiltrirali, jo resuspendirali v 150 mL NaOH ter dodali 1M HCl, pri čemer je izpadla svetlorjava oborina. Masa nastalega produkta je bila 7,80 g (48 mmol, 66 %).

**T<sub>tališča</sub>**: nad 300<sup>0</sup>C (v lit.: nad 300<sup>0</sup>C (24))

7.1.10. *Sinteza 2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidrokinazolin-7-sulfonil klorida (10)*

8,98 mL (146 mmol) klorsulfonske kisline smo ohladili na ledeni kopeli in počasi med mešanjem na ledu dodali 4,0 g (29 mmol) spojine **9**. Bučko z reakcijsko zmesjo smo opremili s povratnim vodnim hladilnikom in klorkalcijevo cevko ter pustili mešati preko noči pri sobni temperaturi. Reakcijsko zmes smo ohladili in vsebino bučke počasi, med stalnim mešanjem zlili na led, pri čemer je izpadla oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem. Masa nastalega produkta je znašala 3,48 g (21 mmol, 74%).

**Rf** (MF: diklorometan/metanol = 20/1): 0,19

**Izkoristek:** 74 %

**M** = 260,65 g/mol

**Elementna sestava:** C<sub>8</sub>H<sub>5</sub>ClN<sub>2</sub>O<sub>4</sub>S

**Opis:** svetlo rjavi prašek

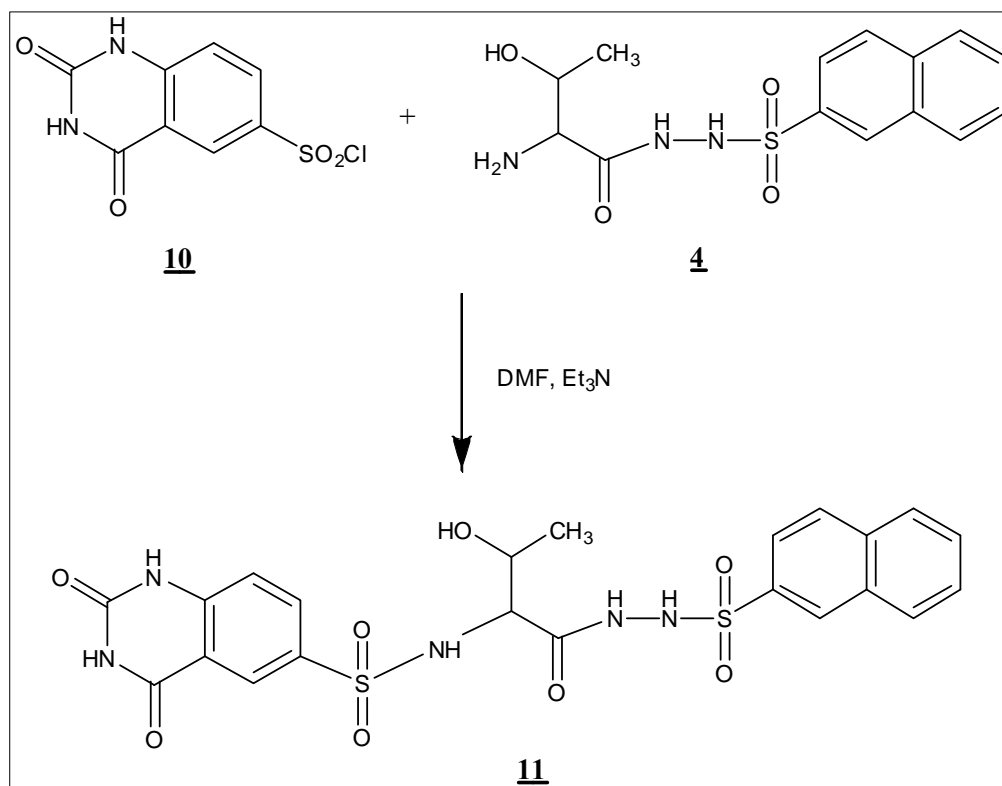
**T<sub>tališča</sub>:** 228-233<sup>0</sup>C

**<sup>1</sup>H-NMR** (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 7.12 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.82 (m, 1H, Ar-H), 8.10 (m, 1H, Ar-H), 11.23-11.20 (m, 1H, Ar-NH-CO), 11.31-11.26 (m, 1H, Ar-CO-NH) ppm

**MS** (ESI): *m/z* (%): 259 (MH<sup>-</sup>, 100)

**IR** (KBr): 3245, 3036, 2840, 1716, 1616, 1438, 1368, 1293, 1175, 1070, 834, 762, 620, 497 cm<sup>-1</sup>

7.1.11. *Sinteza N-(3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonyl)hidrazinil)-1-oksobutan-2-il)-2,4-diokso-1,2,3,4-tetrahidrokinazolin-6-sulfonamida (11)*



500 mg (1,55 mmol) N`-(2-amino-3-hidroksibutanoil)naftalen-2-sulfonohidrazida (**4**) smo raztopili v 30 mL DMF, ohladili na ledeni kopeli do približno  $-30^{\circ}\text{C}$  in dodali 0,64 mL (4,64 mmol) Et<sub>3</sub>N. Nato smo počasi dodali 403 mg (1,55 mmol) spojine **10** in pustili mešati na sobni temperaturi 24 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo in ostanek prelili z etilacetatom. Raztopino smo spirali trikrat z 10 mL 1M HCl in enkrat z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo 15 minut sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Ostanek v bučki smo prelili z metanolom in nastalo oborino prefiltrirali s presesavanjem. Dobili smo 69 mg (0,13 mmol, 8 %) svetlo oranžnih kristalov.

**Rf** (MF: diklorometan/metanol = 7/1): 0,31

**Izkoristek:** 8%

**M** = 547,56 g/mol

**Elementna sestava:** C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>

**Opis:** svetlo oranžni kristali



$T_{\text{tališča}}$ : 190-192<sup>0</sup>C

<sup>1</sup>H-NMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 0.85 (d,  $J$  = 6.1 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-CH-OH), 3.45-3.65 (m, 2H, CH-CH), 4.62 (d,  $J$  = 5.0 Hz, 1H, CH-OH), 7.23 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, Ar-H), 7.60-7.73 (m, 3H, Ar-H), 7.77 (m, 1H, Ar-H), 7.91 (m, 1H, Ar-H), 8.07-7.98 (m, 2H, Ar-H + SO<sub>2</sub>NH), 8.10 (d,  $J$  = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 8.22 (m, 1H, Ar-H), 8.37 (s, 1H, Ar-H), 9.81 (m, 1H, NHNHCO), 9.91 (m, 1H, NHNHSO<sub>2</sub>), 11.48 (s, 1H, NH-CO-NH), 11.51 (s, 1H, NH-CO-NH) ppm

MS (ESI): m/z (%): 570,1 (MNa<sup>+</sup>, 100), 548,1 (MH<sup>+</sup>, 19)

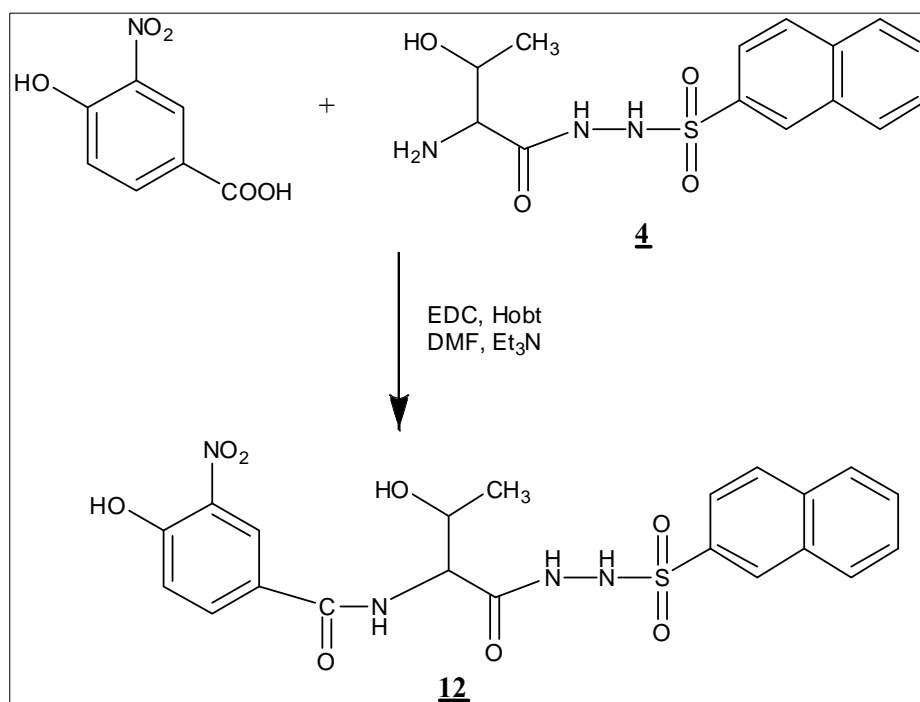
Elementna analiza za C<sub>22</sub>H<sub>21</sub>N<sub>5</sub>O<sub>8</sub>S<sub>2</sub>×2H<sub>2</sub>O:

	% C	% H	% N
Izračunano:	45,28	4,32	12,00
Ugotovljeno:	45,11	4,34	12,03

IR (KBr): 3437, 3221, 3078, 2934, 2361, 2343, 1719, 1696, 1618, 1507, 1448, 1336, 1299, 1241, 1168, 1132, 1073, 1032, 929, 906, 841, 812, 752, 712, 500 cm<sup>-1</sup>

Optična sučnost:  $[\alpha]_D^{20} = -6,8^0$  (c = 0,240 g /100 mL, DMSO)

7.1.12. *Sinteza 4-hidroksi-N-(3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksobutan-2-il)-3-nitrobenzenamida (12)*



500 mg (1,55 mmol) N'-(2-amino-3-hidroksibutanoil)naftalen-2-sulfonohidrazida (**4**) smo raztopili v 30 mL DMF, ohladili na ledeni kopeli do približno  $-15^{\circ}\text{C}$  in dodali 0,64 mL (4,64 mmol)  $\text{Et}_3\text{N}$ . Nato smo dodali 283 mg (1,55 mmol) 4-hidroksi-3-nitrobenzojske kisline, 326 mg (1,70 mmol) EDC in 230 mg (1,70 mmol) HOBt ter pustili mešati na sobni temperaturi 24 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo in ostanek prelili z etilacetatom. Raztopino smo spirali dvakrat z 10 mL 10% citronske kisline in enkrat z 10 mL nasičene raztopine NaCl, pri čemer je nastala oborina, ki smo jo odfiltrirali s presesavanjem. Produkt smo prekrystalizirali iz etanola. Dobili smo 245 mg (0,50 mmol, 32 %) belih kristalov.

**Rf** (MF: diklorometan/metanol = 9/1): 0,36

**Izkoristek:** 32%

**M** = 488,47 g/mol

**Elementna sestava:**  $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 250-252 $^{\circ}\text{C}$

**$^1\text{H-NMR}$**  (300MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 1.00 (d,  $J$  = 6.0 Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH-OH}$ ), 3.80 (m, 1H,  $\text{HO-CH-CH}$ ), 4.24 (m, 1H,  $\text{CH-CH-NH}$ ), 4.79 (d,  $J$  = 4.64 Hz, 1H,  $\text{CH}_3\text{-CH-OH}$ ), 7.18 (d,  $J$  = 8.7 Hz, 1H, CONH), 7.53 (m, 2H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.64 (m, 2H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.81 (d,  $J$  = 8.6 Hz, 1H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 7.90-7.81 (m, 4H, Ar- $\underline{\text{H}}$  +  $\text{SO}_2\text{NH}$ ), 8.14 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 8.39 (m, 2H, Ar- $\underline{\text{H}}$ ), 9.99 (s, 1H,  $\text{CO-NH-NH}$ ), 10.32 (s, 1H,  $\text{NH-NH-SO}_2$ ), 11.60 (s, 1H, Ar- $\underline{\text{OH}}$ ) ppm

**MS** (ESI): m/z (%): 548,1 ( $\text{MH}^+$ , 44), 149,0 (100)

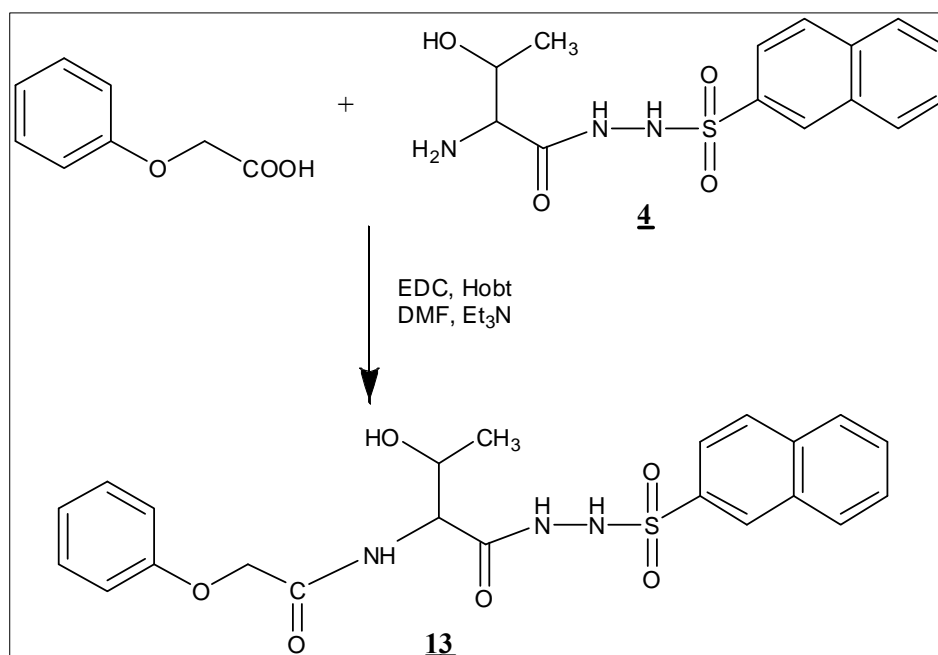
**Elementna analiza** za  $\text{C}_{20}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_9\text{S}_2$ :

	% C	% H	% N
Izračunano:	51,64	4,13	11,47
Ugotovljeno:	51,30	4,00	11,39

**IR** (KBr): 3314, 3058, 2827, 2361, 1633, 1537, 1486, 1421, 1400, 1192, 1154, 1131, 1076, 1016, 951, 899, 845, 817, 756, 659, 548, 477  $\text{cm}^{-1}$

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -21,1^{\circ}$  ( $c = 0,250$  g /100 mL, DMSO)

7.1.13. *Sinteza N-(3-hidroksi-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonyl)hidrazinil)-1-oksobutan-2-il)-2-fenoksiacetamida (13)*



276 mg (0,854 mmol) N`-(2-amino-3-hidroksibutanoil)naftalen-2-sulfonohidrazida (**4**) smo raztopili v 30 mL DMF, ohladili na ledeni kopeli do približno  $-30^{\circ}\text{C}$  in dodali 0,35 mL (2,56 mmol) Et<sub>3</sub>N. Nato smo dodali 130 mg (0,85 mmol) 2-fenoksiocetne kisline, 180 mg (0,94 mmol) EDC in 127 mg (0,94 mmol) Hobt ter pustili mešati na sobni temperaturi 24 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo in ostanek prelili z etilacetatom. Raztopino smo spirali dvakrat z 15 mL 10% citronske kisline, dvakrat z 15 mL nasičene raztopine NaHCO<sub>3</sub> in enkrat z 10 mL nasičene raztopine NaCl. Organsko fazo smo 15 minut sušili z Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, nato smo odfiltrirali sušilno sredstvo in pod znižanim tlakom odparili topilo. Produkt smo prekrizalizirali iz etanola. Dobili smo 204 mg (0,45 mmol, 29 %) belih kristalov.

**Rf** (MF: diklorometan/metanol = 9/1): 0,44

**Izkoristek:** 29%

**M** = 457,50 g/mol

**Elementna sestava:** C<sub>22</sub>H<sub>23</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S

**Opis:** beli kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 176-178<sup>0</sup>C

**$^1\text{H-NMR}$**  (300MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  = 0.94 (d,  $J$  = 6.3 Hz, 3H,  $\text{CH}_3\text{-CH-OH}$ ), 3.85-3.71 (m, 1H,  $\text{CH-CH}$ ), 4.12 (m, 1H,  $\text{CH-CH-NH}$ ), 4.49 (m, 2H,  $\text{O-CH}_2\text{-CO}$ ), 4.88 (d,  $J$  = 5.3 Hz, 1H,  $\text{CH}_3\text{-CH-OH}$ ), 6.87-7.00 (m, 3H,  $\text{Ar-H} + \text{CONH}$ ), 7.32-7.23 (m, 2H,  $\text{Ar-H}$ ), 7.58- 7.72 (m, 3H,  $\text{Ar-H}$ ), 7.83 (m, 1H,  $\text{Ar-H}$ ), 8.10 (d,  $J$  = 7.8 Hz, 1H), 8.04 (d,  $J$  = 8.8 Hz, 1H), 8.00 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H), 8.41 (m, 1H,  $\text{Ar-H}$ ), 9.96 (s, 1H,  $\text{CO-NH-NH}$ ), 10.21 (s, 1H,  $\text{NH-NH-SO}_2$ ) ppm

**MS** (ESI):  $m/z$  (%): 458,2 ( $\text{MH}^+$ , 100), 480,2 ( $\text{MNa}^+$ , 32,5)

**Elementna analiza** za  $\text{C}_{22}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$ :

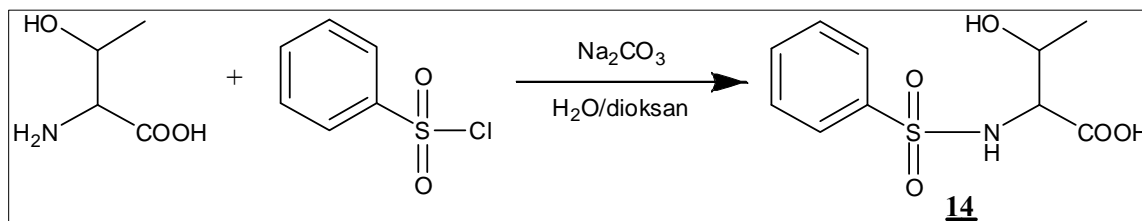
	% C	% H	% N
Izračunano:	57,76	5,07	9,18
Ugotovljeno:	57,57	5,02	9,27

**IR** (KBr): 3303, 3055, 2361, 2342, 1661, 1599, 1535, 1496, 1438, 1339, 1221, 1154, 1130, 951, 857, 814, 788, 749, 658, 618, 592, 546, 478  $\text{cm}^{-1}$

**Optična sučnost:**  $[\alpha]_D^{20} = -28,0^0$  ( $c = 0,265 \text{ g} / 100 \text{ mL}$ , MeOH)

## 7.2. DRUGA SINTEZNA POT

### 7.2.1. Sinteza 3-hidroksi-2-(fenilsulfonamido)butanojske kisline (**14**)



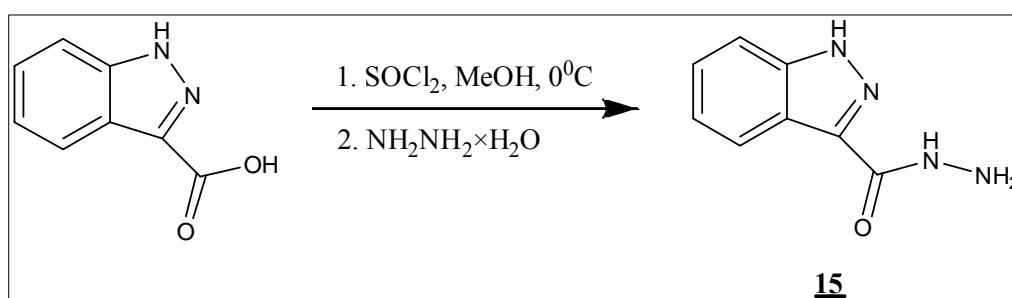
Spojino **14** smo sintetizirali po postopku iz članka (25).

23,80 g (0,174 mol) L-treonina smo raztopili v 50 mL vode, dodali 46,11 g (0,435 mol)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , ohladili na ledeni kopeli do približno  $-15^0\text{C}$  in dodali 30,29 mL (0,696 mol) benzonsulfonil klorida. Reakcijsko zmes smo pustili mešati pri sobni temperaturi 48 ur. Nastala je bela oborina, ki smo jo sprali z  $2 \times 100 \text{ mL}$  etilacetata in nakisali z 1M HCl do  $\text{pH} = 1$ . Nato smo produkt ekstrahirali z etilacetatom (50 mL) tolikokrat, da je vsa spojina OJT **35** prešla v organsko fazo. Ekstrakcijo smo spremljali s TLC (MF: DKM/MeOH = 7/1).

Združili smo vse frakcije etilacetata, sprali z 30 mL nasičene raztopine NaCl, nato smo dodali Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, odfiltrirali in pod znižanim tlakom uparili etilacetat. Nastali so beli kristali katerih masa je bila 41,61 g (0,160 mol, 92%).

$T_{\text{tališča}}$ : 145-147<sup>0</sup>C (v lit.: 146-148<sup>0</sup>C (25))

### 7.2.2. *Sinteza 1H-indazol-3-karbohidrazida (15)*



Sinteza spojine **15** je potekala v dveh stopnjah. Najprej smo tvorili ester po postopku iz članka ( $T_{\text{tališča}}$  estra: 161-163<sup>0</sup>C (v lit.: 162-163<sup>0</sup>C)) (35). V drugi stopnji smo 990 mg (5,62 mmol) metil 1H-indazol-3-karboksilata raztopili v 50 mL etanola in mu na ledu dodali 0,17 mL (5,62 mmol) hidrazin hidrata. Reakcijsko zmes smo segrevali pod refluksom 12 ur in nato pod znižanim tlakom odparili topilo. Produkt smo prekristalizirali iz vode. Masa nastalih svetlo rjavih kristalov je znašala 771 mg (4,73 mmol, 78%).

$R_f$  (MF: diklorometan/metanol = 9/1): 0,22

**Izkoristek:** 78%

$M$  = 176,18 g/mol

**Elementna sestava:** C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>N<sub>4</sub>O

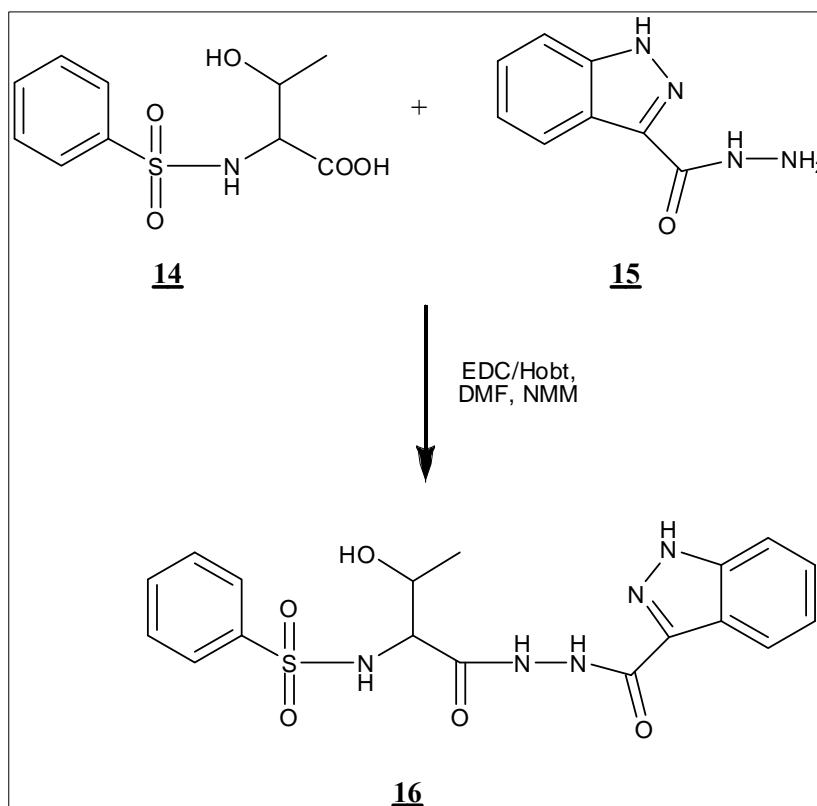
**Opis:** svetlo rjavi kristali

$T_{\text{tališča}}$ : 191-200<sup>0</sup>C

<sup>1</sup>H-NMR (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  = 4.49 (s, 2H, NH<sub>2</sub>), 7.21-7.26 (m, 1H, Ar-H), 7.38-7.44 (m, 1H, Ar-H), 7.61 (d,  $J$  = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 8.16 (d,  $J$  = 8.1 Hz, 1H, Ar-H), 9.55 (s, 1H, NH-NH<sub>2</sub>), 13.5 (s, 1H, C=N-NH) ppm

**IR** (KBr): 3367, 3108, 2821, 2668, 2363, 1686, 1407, 1321, 1164, 920, 753, 675, 546 cm<sup>-1</sup>

7.2.3. *Sinteza N-(1-(2-(3H-indazol-3-karbonil)hidrazinil)-3-hidroksi-1-oksobutan-2-il)benzensulfonamida (16)*



1000 mg (3,86 mmol) 3-hidroksi-2-(fenilsulfonamido)butanojske kisline (**14**) in 680 mg (3,86 mmol) spojine **15** smo raztopili v 40 mL DMF, ohladili na ledeni kopeli do približno  $-15^{\circ}\text{C}$  in dodali 1,06 mL (7,71 mmol) N-metilmorfolina. Nato smo dodali 813 mg (4,24 mmol) EDC in 573 mg (4,24 mmol) Hobt ter pustili mešati na sobni temperaturi 24 ur. Po končani reakciji smo pod znižanim tlakom odparili topilo in ostanek prelili z diklorometanom. Raztopino smo spirali dvakrat z 10 mL 10% citronske kisline in dvakrat z 10 mL nasičene raztopine  $\text{NaHCO}_3$ . V diklorometanski fazi so se oborili svetlo rjavi kosmiči, ki smo jih odfiltrirali s presesavanjem. Dobili smo 145 mg (0,347 mmol, 9%) svetlo rjavih kristalov.

**Rf** (MF: diklorometan/metanol = 20/1): 0,15

**Izkoristek:** 9%

**M** = 417,44 g/mol

**Elementna sestava:**  $\text{C}_{18}\text{H}_{19}\text{N}_5\text{O}_5\text{S}$

**Opis:** svetlo rjavi kristali

**T<sub>tališča</sub>:** 155-157<sup>0</sup>C

**<sup>1</sup>H-NMR** (300MHz, DMSO-d<sub>6</sub>): δ = 1.10 (d, *J* = 5.9 Hz, 3H, CH<sub>3</sub>-CH-OH), 3.77-3.91 (m, 2H, CH-CH), 7.26 (m, 1H, Ar-H), 7.43 (m, 1H, Ar-H), 7.69-7.50 (m, 5H, Ar-H), 7.90-7.83 (m, 2H, Ar-H + SO<sub>2</sub>NH), 7.95 (s, 1H, C=N-NH), 8.13 (d, *J* = 8.2 Hz, 1H, Ar-H), 10.55-9.69 (s, 2H, NH-NH) ppm

**MS** (ESI): m/z (%): 440,1 (MNa<sup>+</sup>, 100), 418,1 (MH<sup>+</sup>, 10)

**Elementna analiza** za C<sub>22</sub>H<sub>24</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup>×H<sub>2</sub>O:

	% C	% H	% N
Izračunano:	45,81	4,70	14,84
Ugotovljeno:	35,64	4,41	15,10

**IR** (KBr): 3253, 2361, 2342, 1686, 1654, 1527, 1448, 1347, 1323, 1160, 1092, 1070, 1025, 998, 915, 753, 723, 690, 591 cm<sup>-1</sup>

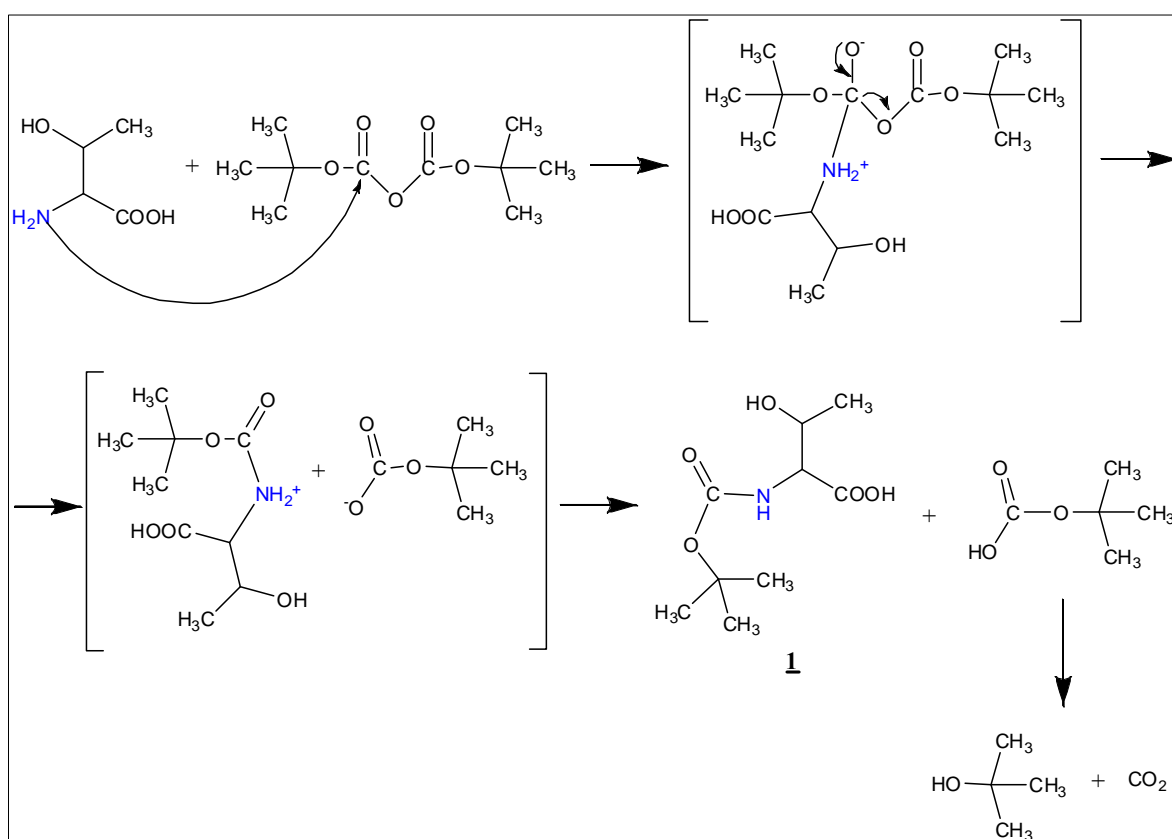
**Optična sučnost:** [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> = -51,9<sup>0</sup> (c = 0,275 g /100 mL, MeOH)

## 8. REZULTATI IN RAZPRAVA

### 8.1. RAZPRAVA O SINTEZAH SPOJIN

#### 8.1.1. Zaščita amino skupine L-treonina (**1**)

Aminska skupina L-treonina je boljši nukleofil kot njegova karboksilna skupina in bi lahko motila nadaljnji potek reakcij, zato smo jo zaščitili v obliki karbamata z reagentom di-*tert*-butildikarbonatom, pri čemer je potekla nukleofilna adicija s sledečo eliminacijo oz. *N*-aciliranje. Aminska skupina je kot nukleofil reagirala s karbonilnim ogljikom (BOC)<sub>2</sub>O, pri čemer so kot končni produkti nastali *N*-(*tert*-butiloksikarbonil)L-treonin (**1**), *tert*-butilni alkohol in CO<sub>2</sub>.



Slika 19: Mehanizem zaščite NH<sub>2</sub> skupine z di-*tert*-butildikarbonatom.



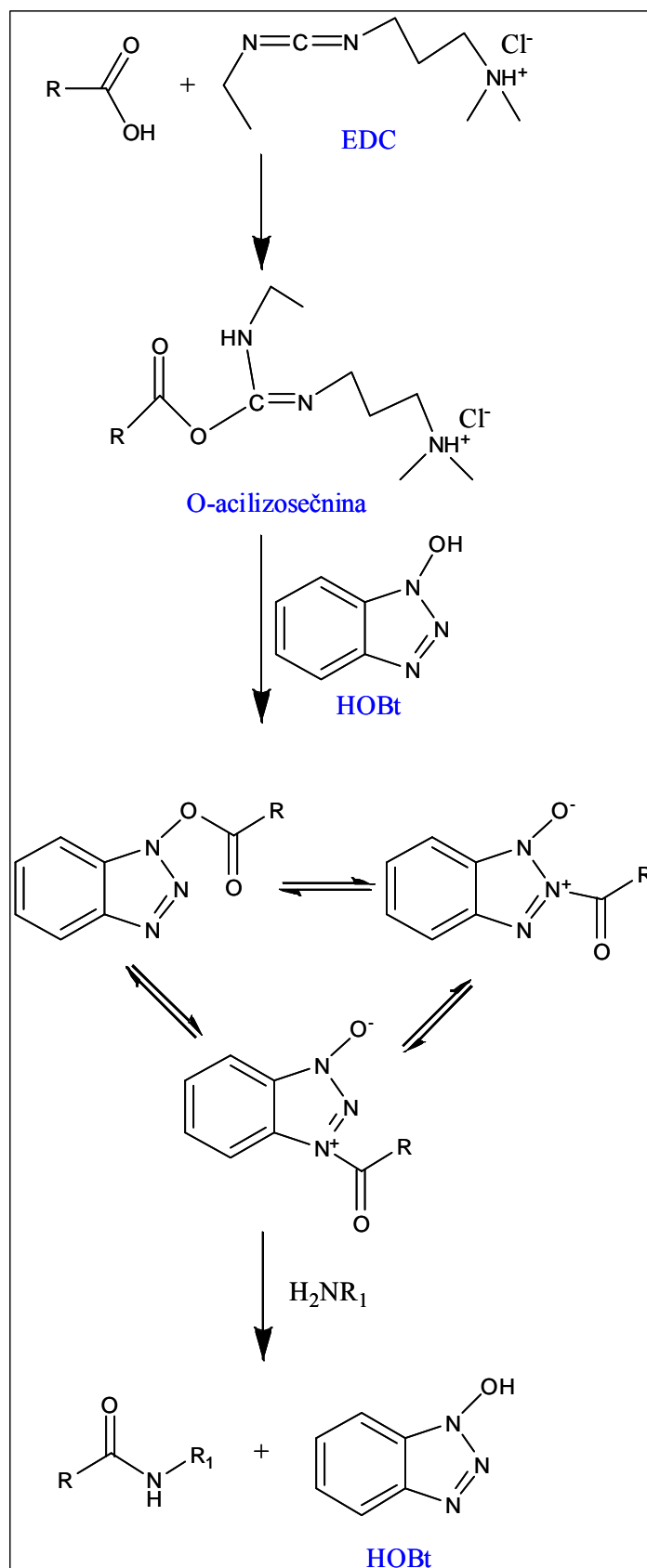
V molekuli L-treonina smo imeli dve nukleofilni skupini ( $\text{NH}_2$  in  $\text{COOH}$ ), ki bi lahko reagirali z  $(\text{BOC})_2\text{O}$ . Z uporabo nižje temperature smo usmerili reakcijo pretežno v nastajanje *N*-aciliranega produkta. S tem ko smo  $(\text{BOC})_2\text{O}$  dodajali po kapljicah na ledeni kopeli, smo se izognili njegovi morebitni hidrolizi. Dioksan smo kot topilo izbrali zato, ker se dobro meša tako s polarnimi kot nepolarnimi topili in na ta način izboljšali topnost  $(\text{BOC})_2\text{O}$  kot tudi topnost našega produkta, saj smo pričakovali da je le-ta v vodi netopen. Z dodatkom NaOH pa smo aaminsko skupino ohranili v nukleofilni neionizirani obliki.

### 8.1.2. *Sinteza naftalen-2-sulfonohidrazida (2)*

Pri sintezi naftalen-2-sulfonohidrazida smo uporabili hidrazin monohidrat ( $\text{NH}_2\text{NH}_2 \times \text{H}_2\text{O}$ ), ki je 64% raztopina brezvodnega hidrazina v vodi. Je zelo reaktiven in hitro eksotermno reagira z dobrimi elektrofilni, ki je bil v našem primeru sulfoinilklorid, pri čemer smo dobili spojino **2**. Zaradi možnosti dimerizacije smo reakcijo izvajali zelo previdno in pri nizki temperaturi.

### 8.1.3. *Tvorba amidne vezi z reagentoma EDC in HOBt (OJT 22)*

Za tvorbo amidne vezi smo uporabili karbodiimidno metodo, pri čemer smo amidno vez tvorili med prosto karboksilno skupino spojine **1** in amino skupino naftalen-2-sulfonilhidrazina (**2**). Ker karboksilna skupina BOC-L-treonina ni dovolj reaktivna, jo aktiviramo z reagentom EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimidijev klorid). Princip reakcije je adicija s sledečo eliminacijo na karbonilnem C-atomu. Karboksilatni anion se veže na protoniran karbodiimid, pri čemer nastane zelo reaktivna O-acilizosečnina, ki reagira z primarno aaminsko skupino hidrazina, ki kot nukleofil napade elektrofilni C-atom karbonilne skupine. Nastane peptid in vodotopen derivat sečnine, ki ga pri ekstrakciji z vodo enostavno odstranimo.

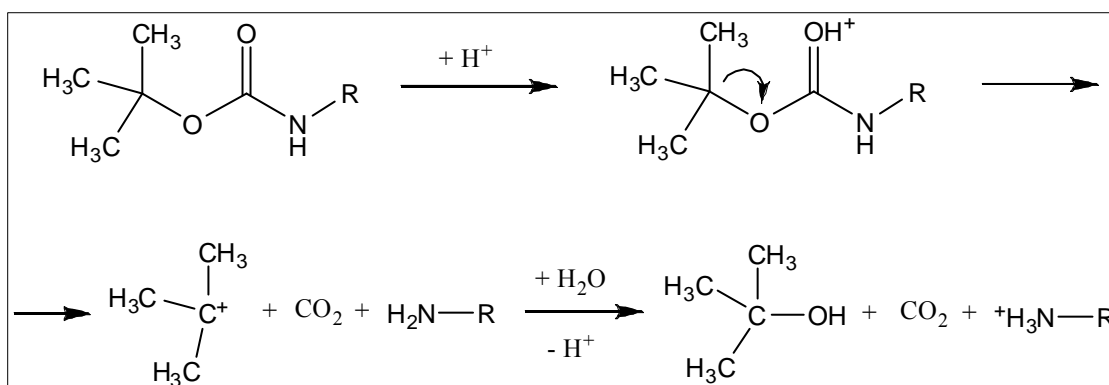


Slika 20: Mehanizem nastanka amidne vezi z uporabo reagentov EDC in HOBt.

Pri tej reakciji lahko pride do nastanka neželenih produktov kot je nastanek *N*-acilizosečnine, pri kateri pride do intramolekularne premestitve acilne skupine iz O na N. Nastane lahko tudi simetričen anhidrid, do katerega pride ko O-acilizosečnina napade drug karboksilat. Z dodatkom HOBt tako zmanjšamo obseg neželenih ciklizacij, premestitev in racemizacij.

#### 8.1.4. Odstranitev *tert*-butiloksikarbonilne (BOC) zaščite (3)

*Tert*-butiloksikarbonilno (BOC) zaščitno skupino smo odstranili tako, da smo spojino **3** raztopili v THF, nato pa smo raztopino spojine na ledu 30 minut prepihovali s plinastim HCl v brezvodnih pogojih. BOC zaščita je stabilna v pH intervalu 4-12, v močno kislih pogojih pa je neobstoja. V kislem je pri *tert*-butiloksikarbonilni zaščitni skupini prišlo do heterolitičnega razcepa C–O vezi, pri čemer je nastal zaradi pozitivnega induktivnega efekta metilnih skupin stabiliziran karbokation  $C^+(CH_3)_3$ .

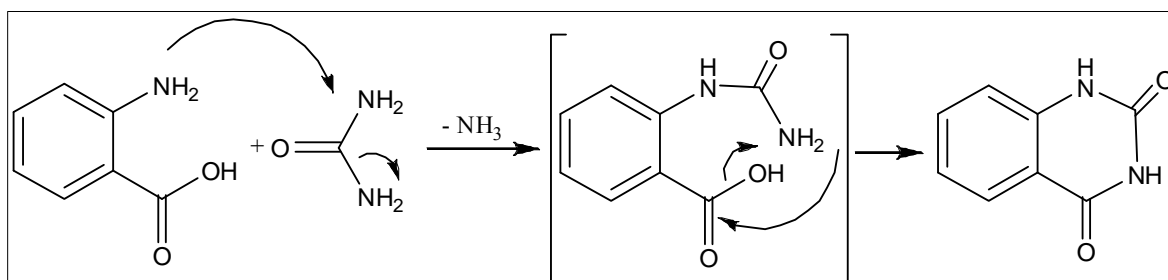


Slika 21: Mehanizem cepitve BOC zaščite v kislem.

#### 8.1.5. Sinteza kinazolin-2,4(1H,3H)-diona (9)

Princip sinteze kinazolin-2,4(1H,3H)-diona je adicija s sledečo eliminacijo (kondenzacija). Poteka iz 2-aminobenzojske kisline in sečnine pri povišani temperaturi, pri čemer  $\text{NH}_2$  skupina aminobenzojske kisline kot nukleofil tekmuje s sečninskima  $\text{NH}_2$  skupinama in napade elektrofilni C-atom sečnine. Sledi izstop  $\text{NH}_2$  skupine. Prosta  $\text{NH}_2$  skupina

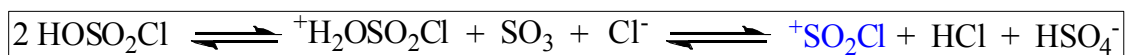
acikličnega ureida nato napade karbonilni C-atom, poteče intramolekularna ciklizacija z izstopom hidroksilne kisline.



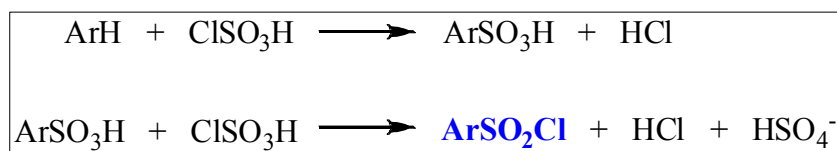
Slika 22: Mehanizem nastanka kinazolin-2,4(1H,3H)-diona.

#### 8.1.6. Priprava aromatskih sulfonilhidrazidov (5, 6, 7, 8, 11, 12, 13)

Sulfonilklorid smo pripravili tako, da smo klorosulfonsko kislino najprej ohladili na ledu in ji nato med mešanjem počasi dodali aromati. S petkratnim prebitkom klorosulfonske kisline smo reakcijo usmerili pretežno v nastajanje sulfonilklorida. Reakcija poteče po mehanizmu elektrofilne aromatske substitucije in poteka v dveh stopnjah. V prvi stopnji najprej nastane sulfonski derivat, v drugi stopnji pa dobimo ustrezen sulfonilklorid. Da se reakcija ne ustavi na prvi stopnji, je odločilen pribitek klorosulfonske kisline in ustrezna temperatura.

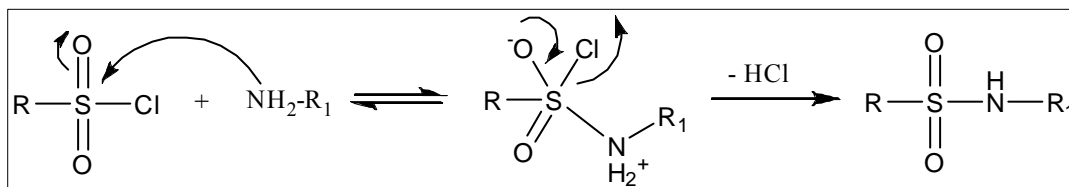


Slika 23: Nastanek elektrofila.



Slika 24: Klorosulfoniranje aromatskega obroča.

Pripenjanje sulfonilkloridov poteka po mehanizmu adicije s sledečo eliminacijo. Nukleofilna  $\text{NH}_2$  skupina s prostim elektronskim parom napade elektrofilen S-atom, sledi izstop dobro izstopajočega klorida, pri čemer nastane sulfonamidna vez.

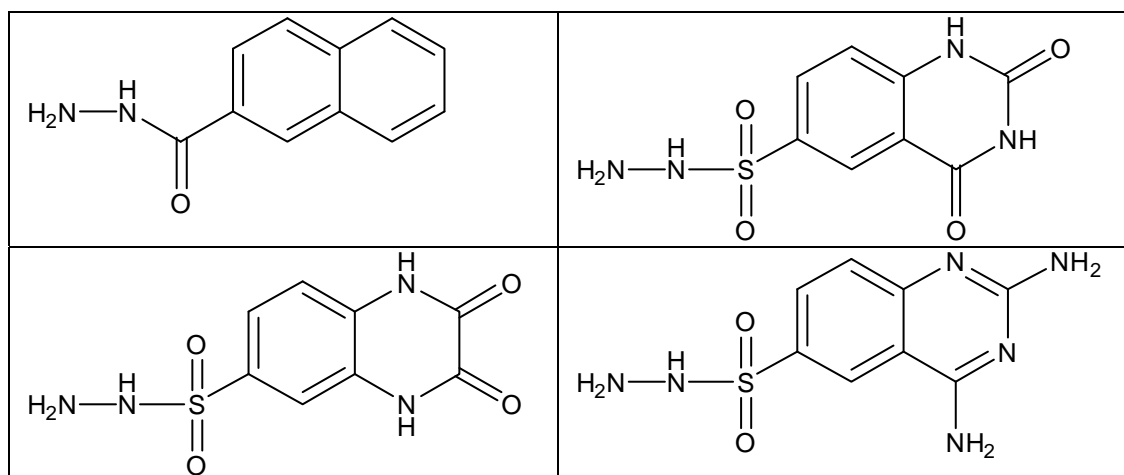


Slika 25: *Mehanizem nastanka sulfonamidne vezi.*

### 8.1.7. *Druga sintezna pot*

Po drugi sintezni poti smo poleg spojine **16** želeli pripraviti še končne spojine z uporabo spojine **14** in drugimi različnimi substituenti, ki so predstavljeni v preglednici V. Amidno vez smo želeli tvoriti z uporabo reagentov EDC in HOBt, vendar pa reakcije niso potekle.

PREGLEDNICA V: *Pregled substituentov, predvidenih v reakcijah druge sintezne poti.*

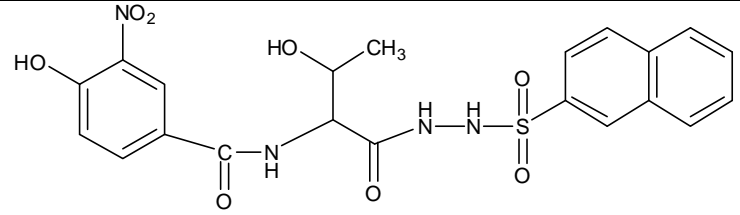
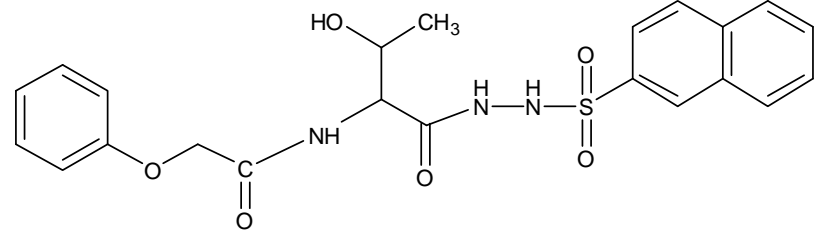
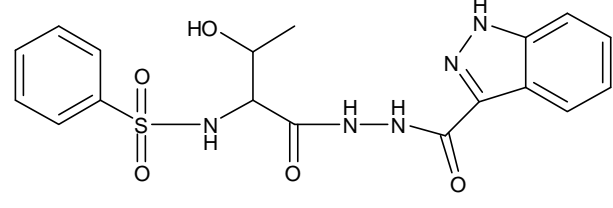


## 8.2. PREGLED SINTETIZIRANIH KONČNIH SPOJIN

Tekom diplomskega dela smo uspešno sintetizirali osem novih končnih spojin, ki so predstavljene v preglednici VI.

PREGLEDNICA VI: *Strukture končnih spojin.*

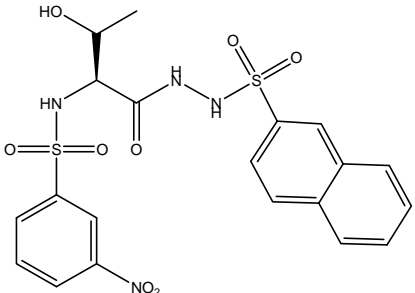
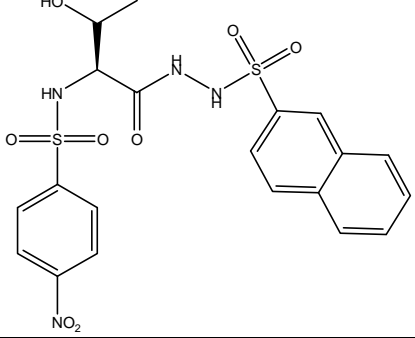
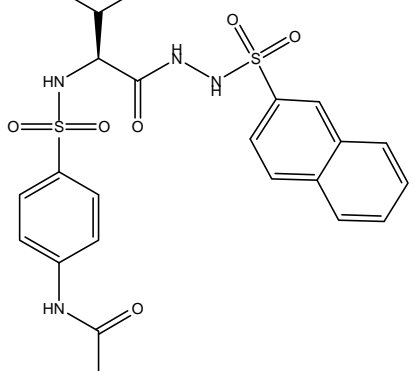
<u>5</u>	
<u>6</u>	
<u>7</u>	
<u>8</u>	
<u>11</u>	

<u>12</u>	
<u>13</u>	
<u>16</u>	

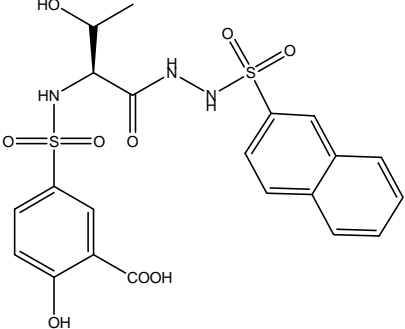
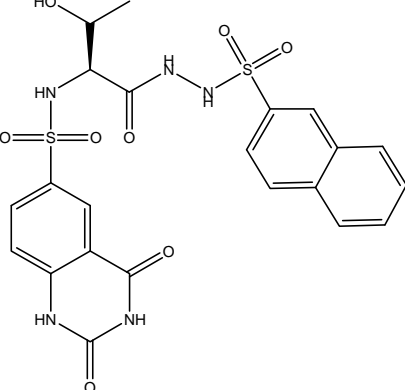
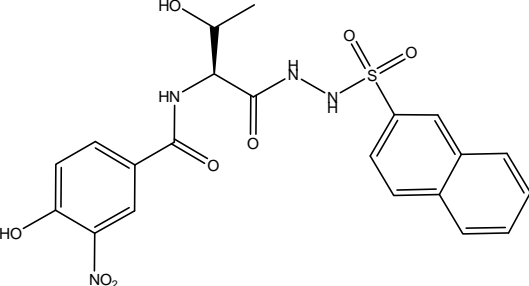
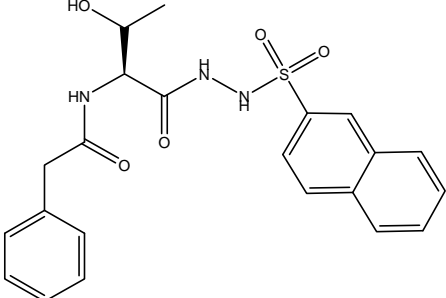
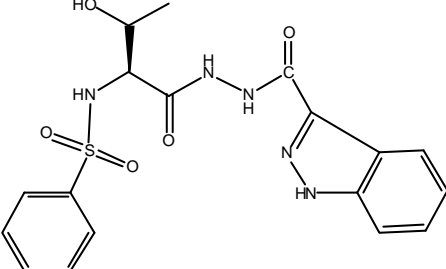
### 8.3. REZULTATI BIOKEMIJSKEGA TESTIRANJA SINTETIZIRANIH SPOJIN

Sintetizirane treoninhidrazidne derivate smo biokemično testirali na encimih MurC in MurD. Rezultati testiranja so podani v preglednici VII.

PREGLEDNICA VII: Rezultati testiranja inhibitorne aktivnosti na encima MurC in MurD.

OZNAKA	FORMULA	c (μM)	RA% MurC	RA% MurD
<u>5</u>		250	92	93
<u>6</u>		250	95	87
<u>7</u>		250	100	86



SPOJINA	FORMULA	c (μM)	RA% MurC	RA% MurD
<b><u>8</u></b>		250	<b>94</b>	<b>83</b>
<b><u>11</u></b>		250	<b>92</b>	<b>84</b>
<b><u>12</u></b>		250	<b>91</b>	<b>88</b>
<b><u>13</u></b>		250	<b>99</b>	<b>96</b>
<b><u>16</u></b>		500	<b>88</b>	<b>100</b>

Rezidualna aktivnost encima (RA) predstavlja razmerje katalitične aktivnosti encima ob prisotnosti inhibitorja in aktivnost encima brez inhibitorja. Izrazimo jo v odstotkih in je merilo za učinkovitost inhibitorja. S primerjavo RA spojin dobimo podatke o učinkovitosti ter o odnosu med strukturo in delovanjem spojin. Metoda z malahitnim zelenim poteka z določevanjem fosfata, ki nastane pri reakciji katalizirani z encimoma. Manjša kot je RA, v večji meri inhibitor pri dani koncentraciji upočasni encimsko katalizirano reakcijo. Vrednosti RA med 80–100% so v mejah eksperimentalne napake, zato spojine s takšno aktivnostjo opredelimo kot neaktivne.

Vse spojine so bile testirane v prisotnosti 0,005% koncentracije Tritona X-114, ki ima vlogo solubilizatorja in prepreči tvorbo agregatov inhibitorja ter s tem možnost inhibicije.

Iz preglednice VII je razvidno, da nobena sintetizirana spojina ni bila aktivna niti na encim MurC niti na encim MurD, saj so bile vse vrednosti rezidualne aktivnosti encimov med 83% in 100%. Glede na rezultate encimskih testiranj lahko predvidevamo, da zamenjava levcina za treonin ni ugodna za vezavo molekule v aktivno mesto encima.

## 9. SKLEP

V okviru diplomskega dela smo načrtovali in sintetizirali serijo novih treoninhidrazidnih inhibitorjev Mur-ligaz. Pri tem smo kot spojino vodnico uporabili *N*-(4-metil-1-(2-(naftalen-2-ilsulfonil)hidrazinil)-1-oksopentan-2il)-3-nitrobenzensulfonamid, ki je dokaj dober inhibitor encima MurC z RA 43% in  $IC_{50}=245\mu\text{M}$  na izoliranem MurC encimu.

Z modifikacijo spojine vodnice smo po dveh različnih poteh sintetizirali serijo osmih novih spojin. Prva modifikacija je bila zamenjava levcinskega dela s treoninskim z namenom izboljšanja topnosti končnih spojin. Pri prvi sintezni poti smo z različnimi substituenti zamenjali 3-nitrofenilsulfonilni del, po drugi sintezni poti pa naftalen-2-sulfonilni del in 3-nitrofenilsulfonilni del spojine vodnice. Pripravili smo osem končnih spojin s treoninhidrazidnim osnovnim skeletom.

Sintetizirane končne spojine niso bile aktivne na encimih MurC in MurD, saj so bile vse vrednosti rezidualne aktivnosti encimov med 83% in 100%, kar je v meji eksperimentalne napake. Glede na rezultate encimskega testa spojine vodnice (RA = 43%) lahko sklepamo, da zamenjava levcinskega dela s treoninskim, z namenom izboljšanja topnosti, ni ugodna za vezavo v aktivno mesto encima, kar posledično vodi v neaktivnost novih spojin s treoninhidrazidnim skeletom kot inhibitorjev MurC in MurD encimov.

## 10. LITERATURA

1. Williams DA, Lemke TL: Foye's Principles of Medicinal Chemistry, 5<sup>th</sup> Ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baaltimore, 2002: 759-802
2. Kotnik V: Kje in kako delujejo antibiotiki v mikrobnih celicah, Mikrobi in antibiotiki 2001; 17-25
3. Yoneyama H, Katsumata R: Antibiotic Resistance in Bacteria and Its Future for Novel Antibiotic Development, Biosci Biotechnol Biochem 2006; 70: 1060-1075
4. <http://fk.uni-mb.si/fkweb-datoteke/Mikrobiologija/antibiotiki.doc>, oktober 2008
5. Livermore D: Minimising antibiotic resistance. Lancet Infect Dis 2005; 5: 450-459
6. Silver LL: Does the cell wall of bacteria remain a viable source of targets for novel antibiotics?, Biochem Pharmacol 2006; 71: 996-1005
7. Walsh F, Amyes S: Microbiology and drug resistance mechanism of fully resistant pathogens, Cur Op Microbiol 2004; 7: 439-444
8. Thomson C, Power E, Ruebsamen-Waigmann H, Labischinski H: Antibacterial research and development in the 21<sup>st</sup> Century – an industry perspective of the challenges, Cur Op Microbiol 2004; 7: 445-450
9. Mol D, Brooun A, Dougan R, Hilgers T, Tari W, Wijnands A, Knuth W, McRee, Swanson V: Crystal Structures of Active Fully Assembled Substrate – and Product-Bound Complexes of UDP-N-Acetylmuramic Acid: L-Alanine Ligase (MurC) from Haemophilus influenzae, J Bacterio 2003; 185: 4152-4162
10. Green DW: The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. Expert Opin The Targets 2002; 6: 1-19
11. Gram Stain, <http://www.microbiologybytes.com/video/Gram.html>, oktober 2008
12. Frlan R, Kovač A, Blanot D, Gobec S, Pečar S, Obreza A: Design and Synthesis of Novel N-Benzylidenesulfonohidrazide Inhibitors of MurC and MurD as Potential Antibacterial Agents, Molecules 2008; 13: 11-30
13. Gowda, D. Channe: Letters in Peptide Science 2002; 9(1): 43-47
14. Islam AM, Abdel-Halim AM, Salama MA: Synthesis of some naphthalene sulfonohydrazides and related compounds of potential biological activity, Egyptian J. Chem. 1987; 29(4): 405-431

15. Scheffers DJ, Pinho GM: Bacterial Cell Wall Synthesis: New insights from Localization Studies, *Microbiol Mol Biol Rev* 2005; 69: 585-607
16. Glycopeptides, <http://www.chem.qmul.ac.uk/iupac/misc/glycp.html#2.1>, oktober 2008
17. Zoeiby EI, Sanschagrin F, Levesque RC: Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Molecular Microbiology* 2003; 47: 1-12
18. Volmer W, Blanot D, De Pedro M: Peptidoglycan structure and architecture, *FEMS microbiol Rev* 2007: 1-19
19. Heijenoort J: Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Nat Prod Rep* 2001; 18: 503-519
20. Smith CA: Structure, Function and Dynamics in the mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases, *J Mol Biol* 2006; 362: 640-655
21. Gobec S, Urleb U: Inhibitorji sinteze peptidoglikana. *Farm. vestn.* 1999; 50: 183-193
22. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis, *FEMS Microbiol Rev II* 2008: 1-40
23. Katz H, Caufield E: Structure-Based Design Approaches to Cell Wall Biosynthesis Inhibitors, *Current Pharmaceutical Design* 2003; 9: 857-866
24. Lee HF, Kool ET: Novel Benzopyrimidines as Widened Analouges of DNA Bases, *J Med Chem* 2005; 70: 132-140
25. Maurer P, Knudsen C, Palkowitz A, Rapoport H: Alpha-Amino Acids as Chiral Educts for Asymmetric Procuets. Chirospecific Syntheses of Methyl L-Sibirosaminide and Its C-3 Epimer from L-allothreonine, *J. Org. Chem.* 1985; 50(3): 325-332
26. Reck F et all: Inhibitors of Bacterial Wall Biosynthesis Enzyme MurC. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2001; 11: 1451-1454
27. European Bioinformatics Institute, <http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/pdbsum/>
28. Sim MM, Bee Ng S, Buss AD, Crasta SC, Goh KL, Lee SK: Benzylidene Rhodanines as Novel Inhibitors of UDP-N-Acetylmuramate/L-Alanine Ligase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2002; 12: 697-699
29. Li Z, Francisco D, Hu W, Labthavikul P, Petersen J, Severin A, Singh G, Yang Y, Rasmussen A, Lin Y, Skotnicki S, Mansour S: 2-Phenyl-5,6dihydro-2H-

- thieno[3,2c]pyrazol-3-ol Derivates as New Inhibitors of Bacterial Cell Wall Biosynthesis. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2003; 13: 2591-2594
30. Antane S, Caufield EC, Hu W, Keeney D: Pulvinones as Bacterial Cell Wall Biosynthesis Inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 2005
  31. Bertrand AJ, Auger G, Martin L, Fanchon E: Determination of the MurD Mechanism Through Crystallographic Analysis of Enzyme Complexes. *Journal of Molecular Biology* 1999; 289: 579-590
  32. Ehmann DE, Demeritt JE, Hull KG, Fisher SL: Biochemical characterization of an inhibitor of *Escherichia Coli* UDP-N-acetylmuramyl-L-alanine ligase, *Biochim et Biophys Acta* 2004; 1698: 167-174
  33. Gegnas LD, Waddell ST, Chabin RM, Reddy S, Wong KK: Inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzyme MurD, *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8: 1643-1648
  34. Horton JR, Bostock JM, Chopra I, Hesse L, Phillips SEV, Adams DJ, Johnson AP, Fishwick CWG: Macrocyclic inhibitors of the Bacterial Cell Wall Biosynthesis Enzyme MurD, *Bioorg Med Chem Lett* 2003; 13: 1557-1560
  35. Liu Z, Shi F, Martinez PD, Raminelli C, Larock RC: Synthesis of Indazoles by the [3+2] Cycloaddition of Diazo Compounds With Arynes and Subsequent Acyl Migration, *J. Org. Chem.* 2008; 73(1): 219-226