

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIVES HRIBERNIK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

NIVES HRIBERNIK

**GLIKOMIMETIČNI ZAVIRALCI BAKTERIJSKIH
N-ACETILGLUKOZAMINIDAZ**

**GLYCOMIMETIC INHIBITORS OF BACTERIAL
N-ACETYLGLUCOSAMINIDASES**

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2017

Magistrsko naloge sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Dušana Turka. Spektroskopske meritve in ostale analize so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in na Inštitutu Jožef Stefan v Ljubljani. Testiranje spojin z metodo SPR je bilo opravljeno v Infrastrukturnem centru za raziskave molekulskih interakcij (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani).

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju prof. dr. Marku Anderluhu in somentorju prof. dr. Dušanu Turku za priložnost za delo na tem zanimivem področju, vso strokovno pomoč in za novo pridobljeno znanje.

Zahvaljujem se tudi svojim najbližnjim, ki so mi stali ob strani tekom študija in med izdelavo te naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko naloge samostojno izdelala pod mentorstvom prof. dr. Marka Anderluha, mag. farm. in somentorstvom prof. dr. Dušana Turka. Naloga je del ARRS projekta »Inhibicija prenove celične stene Staphylococcus aureus« (šifra projekta J1-8152), pod vodstvom prof. dr. Dušana Turka.

Nives Hribenik

Predsednik komisije: prof. dr. Marija Bogataj, mag. farm.

Član komisije: asist. dr. Nejc Horvat, mag. farm.

VSEBINA

I. POVZETEK.....	IV
II. ABSTRACT	V
III. SEZNAM OKRAJŠAV.....	VI
1. UVOD	1
1.1 STAPHYLOCOCCUS AUREUS	1
1.1.1 OPIS	1
1.1.2 OKUŽBE	2
1.1.3 ZNANE UČINKOVINE	3
1.1.4 ODPORNOST NA ANTIBIOTIKE.....	4
1.2 PEPTIDOGLIKAN	6
1.2.1 ZGRADBA PEPTIDOGLIKANA.....	6
1.2.2 DINAMIČNO RAVNOTEŽJE MED IZGRADNJO IN RAZGRADNJO PEPTIDOGLIKANA.....	7
1.3 AVTOLIZINI	10
1.3.1 OPREDELITEV.....	10
1.3.2 AVTOLIZIN E.....	11
1.4 GLIKOMIMETIKI IN ZAVIRALCI BAKTERIJSKIH N-ACEILGLUKOZAMINIDAZ	
13	
2. NAMEN IN POTEK DELA	17
3. MATERIALI IN METODE	20
4. EKSPERIMENTALNI DEL	23
4.1 SINTEZA GLIKOZIL DONORJA	23
4.1.1 Sinteza 2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- α,β -D-glukopiranoze	23
4.1.2 Sinteza 1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- α,β -D- glukopiranoze.....	24
4.1.3 Sinteza 3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- α,β -D- glukopiranoze.....	25
4.1.4 Sinteza 3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- α -D- glukopiranozil trikloroacetimidata	26
4.1.5 Sinteza 1,3,4,6-tetra-O-benzoil-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- α,β -D- glukopiranoze.....	27

4.1.6 Poskus sinteze 3,4,6-tri-O-benzoil-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- α , β -D-glukopiranoze.....	28
4.2 SERIJA 1: GLIKOZIL AKCEPTORJI: ENOSTAVNI BENZILNI ALKOHOLI	28
4.2.1 Sinteza 1-benzil-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- β -D-glukopiranoze.....	28
4.2.2 Sinteza 1-benzil-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-acetamido- β -D-glukopiranoze.....	29
4.2.3 Poskus sinteze 1-benzil-2-deoksi-2-acetamido- β -D-glukopiranoze.....	30
4.2.4 Sinteza 1-feniletil-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- β -D-glukopiranoze.....	30
4.2.5 Sinteza 1-feniletil-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-acetamido- β -D-glukopiranoze	31
4.2.6 Sinteza 1-feniletil-2-deoksi-2-acetamido- β -D-glukopiranoze.....	32
4.3 SERIJA 2: GLIKOZIL AKCEPTORJI: TERCIARNI AMINSKI DERIVATI.....	32
4.3.1 Poskus sinteze N-metil-1-fenilmetanamina z reduktivnim aminiranjem	32
4.3.2 Sinteza N-metil-1-fenilmetanamina iz benzilklorida	33
4.3.3 Sinteza 2-(benzil(metil)amino)etan-1-ola.....	34
4.3.4 Poskus sinteze 1-(2-(benzil(metil)amino)etoksi)-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- β -D-glukopiranoze.....	35
4.4 SERIJA 3: GLIKOZIL AKCEPTORJI: BENZIMIDAZOLNI DERIVATI.....	35
4.4.1 Sinteza 2-((1H-benzoimidazol-2-il)tio)-N-(2-hidroksietil)acetamida	35
4.4.2 Sinteza 2-((1H-benzoimidazol-2-il)tio)-N-(3-hidroksipropil)acetamida.....	36
4.4.3 Sinteza 2-((1H-benzoimidazol-2-il)tio)-1-(4-hidroksipiperidin-1-il)etan-1-ona.....	37
4.4.4 Poskus glikozilacije z benzimidazolnimi glikozil akceptorji	38
4.5 SERIJA 4: GLIKOZIL AKCEPTORJI: FTALIMIDNI DERIVATI.....	39
4.5.1 Sinteza 2-(2-hidroksietil)isoindolin-1,3-diona	39
4.5.2 Sinteza 2-(3-hidroksipropil)isoindolin-1,3-diona	39
4.5.3 Sinteza 1-(2-(1,3-dioksoisoindolin-2-il)etoksi)-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- β -D-glukopiranoze.....	40
4.5.4 Sinteza 1-(2-(1,3-dioksoisoindolin-2-il)etoksi)-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-acetamido- β -D-glukopiranoze	41
4.5.5 Sinteza 1-(2-(1,3-dioksoisoindolin-2-il)etoksi)-2-deoksi-2-acetamido- β -D-glukopiranoze	41
4.5.6 Sinteza 1- (3-(1,3-dioksoisoindolin-2-il)propoksi)-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- β -D-glukopiranoze.....	42
4.5.7 Sinteza 1- (3-(1,3-dioksoisoindolin-2-il)propoksi)-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-acetamido- β -D-glukopiranoze	43

4.5.8 <i>Sinteza 1-(3-(1,3-dioksoisoindolin-2-il)propoksi)-2-deoksi-2-acetamido-β-D-glukopiranoze</i>	43
5. REZULTATI IN RAZPRAVA	45
5.1 RAZPRAVA K UVEDBI N-ZAŠČITNE SKUPINE.....	45
5.2 RAZPRAVA K UVEDBI O-ZAŠČITNE SKUPINE.....	47
5.3 RAZPRAVA K ODŠČITI ANOMERNE SKUPINE	49
5.4 RAZPRAVA K SINTEZI GLIKOZIL TRIKLOROACETIMIDATA.....	50
5.5 RAZPRAVA H GLIKOZILACIJI	51
5.5.1 <i>RAZMISLEK K DRUGAČNEMU PRISTOPU H GLIKOZILACIJI</i>	53
5.6 RAZPRAVA K SINTEZI GLIKOZIL AKCEPTORJEV, KI VSEBUJEJO TERCIARNI AMIN.....	54
5.7 RAZPRAVA K SINTEZI BENZIMIDAZOLNIH GLIKOZIL AKCEPTORJEV.....	54
5.8 RAZPRAVA K SINTEZI FTALIMIDNIH GLIKOZIL AKCEPTORJEV.....	55
5.9 RAZPRAVA K ODŠČITI TROC IN ACETILIRANJU AMINSKE SKUPINE.....	56
5.10 RAZPRAVA K ODŠČITI ACETATOV PO ZEMPLENOVEM POSTOPKU	57
5.11 RAZPRAVA K REZULTATOM TESTIRANJA Z METODO SPR	58
6. SKLEP IN ZAKLJUČEK	61
7. LITERATURA	63
8. PRILOGE	67
PRILOGA 1: ANALIZNI IZVIDI SPEKTROSKOPSKIH TEHNIK	67
PRILOGA 2: SENZORGRAMI	70
PRILOGA 3: TESTIRANJE Z METODO SPR	73

I. POVZETEK

Bakterijske okužbe že od nekdaj pestijo človeštvo in so še vedno odgovorne za skoraj petino vseh smrti. Bakterije so sposobne izjemnih prilagoditev na okolje, ena takšnih je tudi bakterijska rezistenca na antibiotike. Sevi *S. aureus*, patogene bakterije iz rodu stafilocokov, ki med drugim povzroča gnojne okužbe kože, kirurških ran, opeklin, če se razširi v kri pa tudi endokarditis in sepsa, so tako razvili rezistenco zoper meticilin in ostale β -laktamske antibiotike (MRSA) ter tudi zoper vankomicin (VRSA). Zaradi vedno številčnejših pojavov bakterijske rezistence na antibiotike, ostaja iskanje novih tarč in načrtovanje novih protibakterijskih učinkovin eno od pomembnih raziskovalnih področij. V okviru magistrske naloge smo se osredotočili na še nevalidirano tarčo avtolizin E bakterije *S. aureus*. Avtolizin E je ena od petih N-acetylglukozaminidaz bakterije *S. aureus* in ima pomembno vlogo pri ohranjanju dinamičnega ravnotežja med razgradnjo in izgradnjo peptidoglikana. Ohranjanje ravnotežja med temo procesoma je izjemnega pomena za preživetje bakterije, zato bi zaviranje delovanja avtolizina E lahko predstavljalno pomembno novo možnost za terapijo na druge antibiotike odpornih sevov *S. aureus*. V magistrski nalogi smo se odločili sintetizirati glikomimetične zaviralce avtolizina E, pri načrtovanju le-teh smo se opirali na strukturo peptidoglikana in kristalno strukturo avtolizina E. Glikomimetiki, ki smo jih pripravili, so sestavljeni iz *N*-acetilglukozamina, ki sicer skupaj z *N*-acetilmuraminsko kislino tvori strukturo peptidoglikana, in nenaravnega aglikonskega dela, ki je z *N*-acetilglukozaminom povezan preko β -glikozidne vezi. Sintezna pot je potekala tako, da smo najprej sintetizirali glikozil donor (ustrezno zaščiten in aktiviran glukozamin) ter posamične glikozil akceptorje (aglikonski del glikomimetikov), nato smo jih povezali z reakcijo glikozilacije in odstranili še zaščitne skupine. Sintetizirane glikomimetike in dodatno še nekaj glikozil akceptorjev, ki smo jih sintetizirali tekom izdelave magistrske naloge, smo ovrednotili s stališča vezave na avtolizin E z metodo površinske plazmonske resonance. Glikomimetične spojine presenetljivo niso pokazale vezave na protein, kot potencialno obetavne pa so se zlasti izkazale aglikonske spojine, ki so vsebovale benzimidazolno strukturo. Tekom magistrske naloge smo vzpostavili in optimizirali pot sinteze *N*-acetilglukozaminskih glikomimetikov ter naredili prvi korak k potencialnim inhibitorjem avtolizina E.

Ključne besede: avtolizin E, N-acetylglukozaminidaze, *S. aureus*, glikomimetiki

II. ABSTRACT

Humans have always been exposed to bacterial infections and to this date, bacterial infections are still responsible for almost a fifth of all deaths in human population. Bacteria are capable of exceptional adaptations to the environment, one of which is also bacterial resistance towards antibiotics. *S. aureus* is an example of staphylococcal pathogenic bacteria that causes skin and wound infections and is also a leading cause of bloodstream infections such as endocarditis and sepsis. Some strains of *S. aureus* have developed resistance against methicillin and other beta-lactam antibiotics (MRSA) and against vancomycin (VRSA). Due to more and more cases of bacterial resistance to antibiotics, search for new targets and design of new antibacterial agents remains an important research field. Within master's thesis we have focused on a yet non-validated target autolysin E of *S. aureus*. Autolysin E is one of the five N-acetylglucosaminidases of *S. aureus* and plays an important role in murein turnover. Murein turnover is a process composed of murein degradation and it's synthesis and keeping these two processes in balance guides the growth and survival of the bacterium. Inhibition of autolysin E could therefore represent an important new option for the treatment of infections caused by strains of *S. aureus* with antibiotic resistance. We decided to synthesize glycomimetic inhibitors of autolysin E. Their design was based on murein structure and crystalline structure of autolysin E. In compounds, aglycon moiety is linked to N-acetylglucosamine (N-acetylglucosamine forms murein backbone together with N-acetylmuramic acid) with β -glycosidic bond. Synthesis plan was based on synthesis of glycosyl donor (protected and activated glucosamine) and synthesis of glycosyl acceptors (aglycon part of glycomimetics). They were then linked together with glycosylation followed by removal of protecting groups. Synthesized glycomimetics and additionally a few glycosyl acceptors were evaluated with surface plasmon resonance method to show whether they bind to autolysin E. Surprisingly glycomimetics did not show binding to the protein, however binding was noticed with a few other compounds, among them benzimidazole containing structures occurred to be particularly promising. During the master's thesis, we established and optimized the route for synthesis of N-acetylglucosamine glycomimetics and made the first step towards the potential autolysin E inhibitors.

Keywords: autolysin E, N-acetylglucosaminidases, *S. aureus*, glycomimetics

III. SEZNAM OKRAJŠAV

AtlE	avtolizin E
DBU	1,8-diazabiciklo[5.4.0]undec-7-en
DKM	diklorometan
DMF	dimetilformamid
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EtOAc	etilacetat
EtOH	etanol
Eq	ekvivalent
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
HOBt	hidroksibenzotriazol
MeOH	metanol
Mr	relativna molekulska masa
MRSA	angl. <i>methicillin resistant S. aureus</i> -na meticilin odporni <i>S. aureus</i>
MS	masna spektroskopija
MSSA	angl. <i>methicillin sensitive S. aureus</i> -na meticilin občutljiv <i>S. aureus</i>
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NAG	<i>N</i> -acetilglukozamin
NAM	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NHS	<i>N</i> -hidroksisukcinimid
NMR	nuklearna magnetna resonanca
NaOMe	natrijev metoksid
PBP	angl. <i>penicillin binding protein</i> -protein, ki veže penicilin

Rf	retencijski faktor
SPR	angl. <i>surface plasmon resonance</i> -površinska plazmonska resonanca
TEA	trietilamin
TMSOTf	trimetilsilil trifluorometansulfonat
Troc	trikloroetyl kloroformat
Ttal	temperatura tališča
VRSA	angl. <i>vancomycin resistant S. aureus</i> -na vankomicin odporni S. aureus
λ	valovna dolžina
η	izkoristek

1. UVOD

Bakterije so se pojavile že zelo zgodaj v zgodovini življenja na Zemlji in že od nekdaj pestijo človeštvu. Še dandanes so bakterijske okužbe odgovorne za skoraj petino vseh smrti po podatkih svetovne observacijske epidemiološke študije (Global Burden of Disease Study).

(1) Boj proti tem povzročiteljem nalezljivih bolezni pa ni lahek, saj imajo izjemne sposobnosti evolucijskega razvoja. Genetski zapis bakterij se, vsaj v primerjavi z evkariontskimi organizmi, dokaj enostavno spreminja pod vplivom sprememb iz okolja. Ker imajo poleg tega še kratek generacijski čas in številčno velike populacije, njihova evolucija poteka hitro.

Če se je za kratek čas zdelo, da človeštvo zmaguje v boju proti bakterijam, je kaj kmalu postalo jasno, da je bila dobljena zgolj bitka, medtem ko vojna še traja.

V zadnjih letih se pojavlja vse več poročil o tako imenovanih superbakterijah, ki so odporne na večino znanih antibiotikov.

Leta 2015 je Svetovna zdravstvena organizacija sprejela globalni načrt ukrepanja zoper bakterijsko rezistenco. Načrt obsega 5 strateških točk (2):

1. izboljšati razumevanje in osveščenost o bakterijski rezistenci,
2. okrepliti nadzor in raziskave,
3. zmanjšati incidenco okužb,
4. optimizirati uporabo protibakterijskih zdravil in
5. zagotoviti trajnostne naložbe v boju zoper bakterijsko rezistenco.

Ena od možnosti, kako lahko prispevamo v boju zoper ta javnozdravstveni problem, je torej z raziskavami na tem področju, pri tem sta zlasti pomembna identifikacija novih bioloških tarč in razvoj novih protimikrobnih učinkovin.

1.1 STAPHYLOCOCCUS AUREUS

1.1.1 OPIS

S. aureus je ena od več kot 30 vrst bakterij iz rodu stafilokokov. Stafilokoki so po Gramu pozitivni koki premera približno 1 μm , ki se na gojišču urejajo v nepravilne gruče. So negibljivi, fakultativni anaerobi, ki imajo encim katalazo, bolje rastejo v aerobnem okolju in ne sporulirajo. (3)

Z medicinskega stališča je najbolj pomembna vrsta *S. aureus*, ki ima edina izmed vrst iz rodu stafilokokov encim koagulazo. *S. aureus* je patogena bakterija, medtem ko koagulazno negativni stafilokoki, kot so *S. epidermidis*, *S. haemolyticus*, *S. saprophyticus* in drugi, sodijo med oportunistične bakterije. (4)

1.1.2 OKUŽBE

Vir *S. aureus* predstavlja koža in sluznica bolnikov ter zdravih klicenoscev, ker pa bakterija dobro preživi v okolju, so lahko vir tudi predmeti, s katerimi so okuženi bili v stiku. (3)

S. aureus je razvil izjemne sposobnosti prilagoditve za preživetje v človeškem organizmu. Površinski polisaharidi in različni beljakovinski receptorji omogočajo bakteriji vstop oz. ohranitev na površini ali v notranjosti gostitelja. (3) »Clumping factor«, »fibronectin-binding protein« in »collagen-binding protein« so adhezini na celični steni, ki se specifično vežejo s fibrinogenom, fibronektinom in kolagenom in predstavljajo orodje pri vezavi bakterije na tkiva ozziroma površine. Na površini celične stene je tudi beljakovina A, ki se veže na Fc enoto imunoglobulina IgG. Lažna vezava imunoglobulina na beljakovino A preprečuje pravilno vezavo protitelesa za opsonizacijo in s tem fagocitozo. (4) Encimi koagulaza, lipaza, hialuronidaza, fibronolizin in nukleaza, ki jih izdeluje *S. aureus*, omogočajo lažje prodiranje bakterij v zdrava tkiva in hitrejše širjenje okužb. (3)

Okužbe, ki jih povzroča *S. aureus*, se glede na patogenezo in simptomatiko delijo na več skupin: (3,4)

1. Lokalizirane okužbe kože in mehkih tkiv; mednje sodijo folikulitis, impetigo, furunkel, karbunkel, okužbe ran, celulitis in abces dojke. Za ta tip okužb je značilno, da patogen prodre skozi kožo ali sluznico, tam ostane in povzroči lokalizirane infekcije, za katere je značilno gnojno vnetje.
2. Bakteriemija, k čemur sodita sepsa, ki se pogosto pojavlja z metastatičnimi abcesi v pljučih, kosteh, ledvicah, možganih in koži, ter endokarditis, ki je zlasti pogost pri zamenjavah srčnih zaklopk.
3. Okužbe osrednjega živčnega sistema, to so možganski abces, meningitis in epiduralni abces.
4. Okužbe zgornjih dihal, kamor sodijo vnetje obnosnih sluznic, vnetje srednjega ušesa in peritonzilarni abces.
5. Okužbe spodnjih dihal, mednje štejemo primarno in inhalacijsko pljučnico ter sekundarno pljučnico.

6. Okužbe lokomotornega aparata, kot sta osteomielitis in septični artritis.
7. Okužbe sečil, to sta ledvični absces in vnetje sečnega mehurja.
8. Stafilocokne okužbe, ki so posledica delovanja tokсинov, mednje sodi sindrom toksičnega šoka, ki ga povzroča 1% sevov *S. aureusa*, ki lokalno proizvajajo toksin toksičnega šoka, ta nato vstopa v kri in povzroča sprostitev velikih količin interlevkina-1, interlevkina-2 in tumor nekrotizirajočega faktorja. Poleg tega pa še stafilokokni kožni sindromi z luščenjem, ki ga povzročajo sevi, ki proizvajajo eksfoliativni toksin, ter zastrupitve s hrano, ki je okužena z enterotoksini.

1.1.3 ZNANE UČINKOVINE

V tabeli I je predstavljen pregled do sedaj znanih skupin učinkovin, ki se uporabljajo za zdravljenje okužb s *S. aureus*, kratko opisan njihov mehanizem delovanja in primeri učinkovin. Učinkovine so razdeljene glede na to ali se uporabljajo za zdravljenje MSSA (angl. *methicillin sensitive S. aureus*=na meticilin občutljiv *S. aureus*), MRSA (angl. *methicillin resistant S. aureus*=na meticilin odporni *S. aureus*), dodani pa sta še dve skupini novejših učinkovin.

Tabela I: Znane učinkovine zoper *S. aureus*. Povzeto po (5).

	Skupina	Mehanizem delovanja	Primeri učinkovin
ZDRAVLJENJE MSSA	Penicilini	Inhibicija transpeptidaze	Benzilpenicilin, Flukloksacilin
	Penicilin+inhibitor β-laktamaze	Inhibicija transpeptidaze in β-laktamaze	Amoksicilin/klavulanat
	Cefalosporini	Inhibicija transpeptidaze	Cefazolin
	Karbapenemi	Inhibicija transpeptidaze	Imipenem, meropenem
	Makrolidi	Vezava na 50s enoto ribosoma in s tem zaviranje sinteze bakterijskih proteinov	Eritromicin, klaritromicin, azitromicin
	Linkozamidi	Vezava na 50s enoto ribosoma in s tem	Linkomicin, klindamicin

		zaviranje sinteze bakterijskih proteinov	
	Trimoksazol	Inhibiranje sinteze folata na 2 encimskih stopnjah	Trimetoprim+sulfametok-sazol
	Aminoglikozidi	Ireverzibilna interakcija s 30s	Gentamicin
ZDRAVLJENJE MRSA	Glikopeptidi	Vezava na peptidoglikanski prekurzor UDP-N-acetilmuramilpentapeptid, zaviranje transpeptidaz in karboksipeptidaz	Vankomicin, teikoplanin
	Rifampicin	Inhibicija od DNA odvisne RNA-polimeraze	Rifampicin
	Fluorokinoloni	Inhibicija topoizomeraze II in topoizomeraze IV	Ciprofloksacin, gatifloksacin, moksifloksacin
NOVE UČINKOVINE	Streptogramini	Vezava na različne strani 50s podenote ribosoma in s tem zaviranje sinteze bakterijskih proteinov	Kvinupristin/ dalfopristin (*registriran v ZDA)
	Oksazolidinoni	Vezava na 50s, preprečevanje povezave s 30s	Linezolid

1.1.4 ODPORNOST NA ANTIBIOTIKE

Zaradi mutacij genov, ki nosijo zapis za penicilin vežoče beljakovine, so se pojavili stafilokoki, ki so odporni proti vsem β -laktamskim antibiotikom. (3) Pojem MRSA, ki označuje na meticilin odporne seve *S. aureus*, je bil prvič uporabljen v 50. letih prejšnjega stoletja, ko so se pojavile okužbe, ki se jih ni dalo pozdraviti s penicilinom ali meticilinom. Takšni bakterijski sevi so velikokrat odporni tudi proti drugim protistafilokoknim antibiotikom, kot so eritromicin, gentamicin in rifampicin. (6,7)

Pojavnost okužb s sevi MRSA je najpogostejsa pri 3 različnih skupinah ljudi; gre bodisi za okužbe, ki prizadenejo bolnike, ki so hospitalizirani, bodisi bolnike, ki so v stiku z bolnišnično oskrbo (bolniki na dializi, kemoterapije ...) ali pa se okužba pojavlja znotraj neke skupnosti ljudi, pogosta je v domovih za ostarele ali vrtcih, znani so celo primeri pojavnosti znotraj posamezne ekipe športnikov. (8)

Biosinteza peptidoglikana poteka tako, da se monomerne enote peptidoglikana sintetizirajo znotrajcelično z nizom encimov s skupnim imenom ligaze Mur, temu sledi pripenjanje monomerne enote na undekaprenilno jedro z encimom MraY (lipid I) in pripenjanje *N*-acetilglukozamina, nastali lipid II pa se z lipazo FtsW prenese na zunanj stran celične membrane (9). Glikoziltransferaze polimerizirajo peptidoglikanske monomere, nato pa transferaze, (angl. *penicillin-binding-proteins*=PBPs), pripenjajo nove verige peptidoglikana na že obstoječe preko peptidnih mostičkov. PBP prepoznavata D-alanil-D-alaninske aminokislinske ostanke, penicilini pa delujejo kot strukturni analogi le-teh in se kovalentno vežejo na PBP. S tem inaktivirajo PBP in inhibirajo sintezo peptidoglikana. Sevi MRSA pa proizvajajo PBP2', ki ima zelo nizko afiniteto do β -laktamov, zato lahko sinteza peptidoglikana poteka nemoteno. (10)

Za zdravljenje okužb s sevi MRSA se v večini primerov lahko uporablja le še antibiotika vankomicin in teikoplanin, vendar so že leta 1996 na Japonskem odkrili prvi sev z zmanjšano občutljivostjo na vankomicin (VRSA). (3)

Vankomicin in teikoplanin sta glikopeptidna antibiotika. Za vezavo glikopeptidov obstajata 2 tarči, lahko se vežejo na D-alanil-D-alanin v že zgrajenem sloju peptidoglikana oziroma v nastajajoči verigi ali pa na monomere peptidoglikana na citoplazemski membrani, ki služijo kot substrati za glikoziltransferaze. (10) Prvi tip tarče ne zaustavi sinteze peptidoglikana, za delovanje antibiotika se mora le-ta vezati na tarče v citoplazmi, ki zato niso več primeren substrat za glikoziltransferaze. Da pa lahko glikopeptidni antibiotik deluje, mora preiti skozi vsaj 20 plasti peptidoglikana, ne da bi pri tem ostal ujet. VRSA ima odebeleno plast peptidoglikana (30-40 plasti), zato molekule antibiotika težje preidejo v citoplazmo, poleg tega pa se zunanjji sloj peptidoglikana po vezavi vankomicina razgradi in na ta način prepreči nadaljnje prodiranje antibiotika. (10)

1.2 PEPTIDOGLIKAN

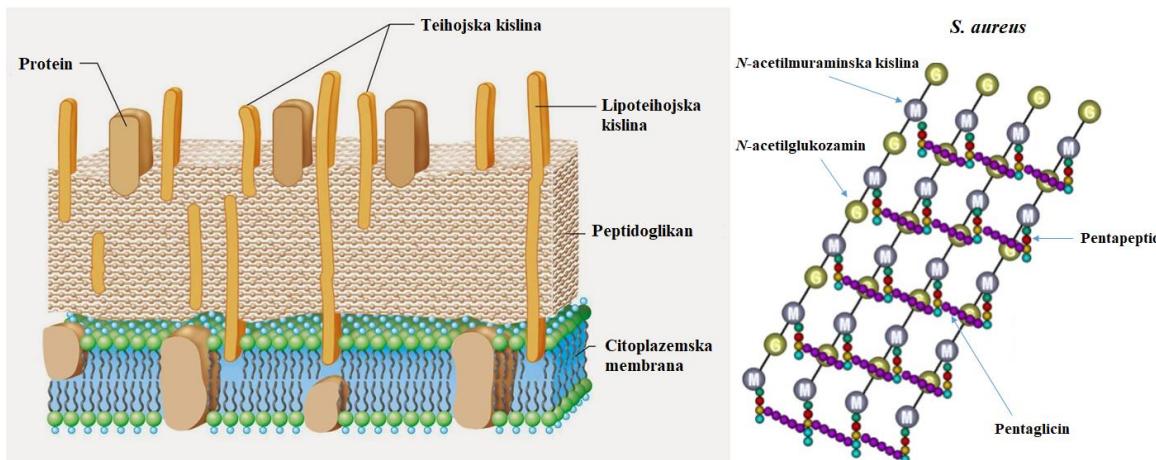
1.2.1 ZGRADBA PEPTIDOGLIKANA

Bakterijska stena je trdno ogrodje, ki daje bakterijskim celicam obliko in trdnost ter jim omogoča preživetje v okolju, kjer koncentracije osmozno aktivnih molekul niso uravnovešene. V citoplazmi bakterij so namreč koncentrirane številne osmozno aktive molekule (elektroliti, ogljikovi hidrati, beljakovine), le-te povzročajo velik notranji osmotski tlak, ki presega trdnost citoplazemske membrane. (11)

Peptidoglikan je kompleksen polimer, ki omogoča trdno zgradbo bakterijske stene. Po Gramu pozitivne bakterije ovija do 40 plasti peptidoglikanske mreže, kar tvori tudi do 50% mase bakterijske stene. (11) Poleg tega vsebuje bakterijska stena po Gramu pozitivnih bakterij še večje količine teihojске in lipoteihojске kisline. Po Gramu negativne bakterije pa so ovite le z eno ali dvema plastema peptidoglikana, navzven pa so obdane še z zunanjimembrano, ki jo od peptidoglikana loči periplazemski prostor. (12)

Peptidoglikanski ovoj sestavljajo zaporedno vezane enote amino sladkorjev, *N*-acetilglukozamina in *N*-acetilmuraminske kisline, ki so med seboj povezane z β -1,4-glikozidno vezjo. Posamezne verige peptidoglikana so med seboj povezane s kratkimi peptidi, in sicer gre za pentapeptide, v katerih so izmenjujoče povezane D- in L-aminokisline, ki so pripete na D-laktat *N*-acetilmuraminske kisline (13). Pri *S. aureus* je pentapeptid sestavljen iz L-Ala~D-isoGlu~L-Lys~D-Ala~D-Ala, na lizin pa je vezan še pentaglicin. (14)

Pri po Gramu pozitivnih bakterijskih vrstah so na debelo plast peptidoglikana kovalentno vezani še teihojска kisline in polisaharidi, ki ovijajo peptidoglikan. Skozi celoten peptidoglikan so prepletene lipoteihojске kisline, ki so kovalentno vezane na glikolipide plazemske membrane. (12) Slika 1 prikazuje zgradbo bakterijske stene po Gramu pozitivnih bakterij in zgradbo peptidoglikana bakterije *S. aureus*.



Slika 1: Zgradba bakterijske stene po Gramu pozitivnih bakterij (levo) in zgradba peptidoglikana *S. aureus* (desno). Pritejeno po (41, 42).

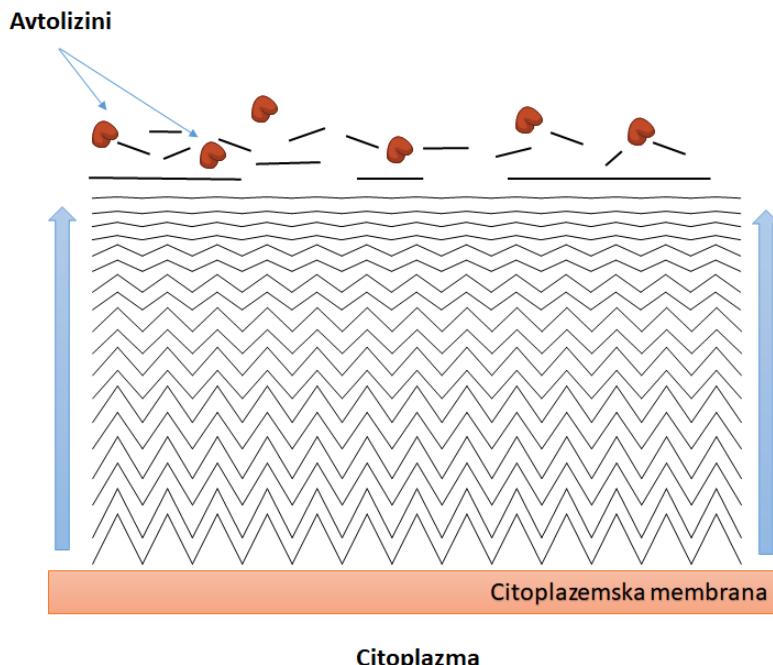
1.2.2 DINAMIČNO RAVNOTEŽJE MED IZGRADNJO IN RAZGRADNJO PEPTIDOGLIKANA

Biosinteza peptidoglikana je dandanes že dobro raziskan proces. Kar nekaj antibiotikov, med njimi tudi β -laktamski antibiotiki in vankomicin, delujejo tako, da zavirajo encime udeležene v biosintezi peptidoglikana. Na drugi strani pa predstavlja dinamično ravnotežje med izgradnjo in razgradnjo peptidoglikana pri bakterijah še precejšnjo neznanko. Znano pa je, da je ohranjanje teh procesov v ravnotežju bistvenega pomena za rast in preživetje bakterije.

Pri delitvi bakterije se tudi do 50% peptidoglikana sprosti iz celične stene, kar bi, v primeru, da procesa njegove ponovne uporabe in sinteze ne bi bila v ravnotežju z razgradnjo, pomenilo veliko izgubo materiala (15), najverjetneje pa v primeru porušenega ravnotežja do delitve bakterije sploh ne bi prišlo. Prvič so pojav dinamičnega ravnotežja peptidoglikana opisali leta 1962, od takrat je bilo na to temo narejenih kar nekaj študij. V večini študij se kot modelni organizem uporablja po Gramu negativna bakterija *E. coli*, pri kateri je zato ta pojav tudi najbolje raziskan. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah je pri razlagi pojava dinamičnega ravnotežja med izgradnjo in razgradnjo peptidoglikana znatno več neznank. V nadaljevanju bomo zato najprej pojasnili, kako proces poteka pri *E. coli* in nato pojasnili kakšne so podobnosti v tem procesu pri po Gramu pozitivnih bakterijah, s poudarkom na bakteriji *S. aureus*, ter v katerih točkah so razlike.

Kot pojasnjuje »inside-to-outside growth« model, se pri izgradnji peptidoglikanske ovojnice na novo sintetizirani material nalaga na notranji strani celične stene v relaksirani obliki, ko

pa se polimerizacija nadaljuje, pa se material pomika navzven in se zaradi notranjega tlaka celice raztegne. Tako je na zunanji strani celične stene star in maksimalno raztegnjen peptidoglikan, ki ga hidrolizirajo avtolizini. (15) Slika 2 prikazuje princip »inside-to-outside growth« modela.



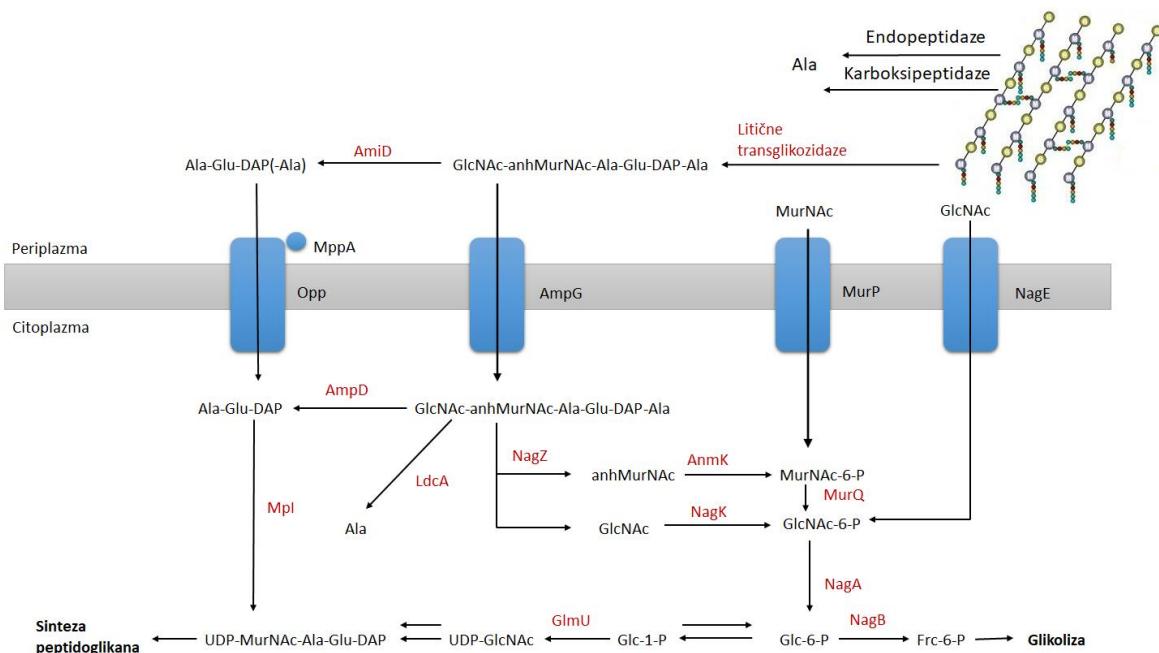
Slika 2: Princip »inside-to-outside growth« modela.

Pri deleči se bakterijski celici *E. coli* sta po celotni dolžini celične stene, razen na polih, ki sta metabolično neaktivna, izgradnja in razgradnja peptidoglikana v ravnotežju. Med podaljševanjem celice peptidni del peptidoglikana razgrajujejo endopeptidaze in karboksipeptidaze, ki hidrolizirajo prečne povezave in pri tem sprostijo terminalni D-Ala. Vez med *N*-acetilglukozaminom in *N*-acetilmuraminsko kislino pa cepijo litične transglikozidaze, pri tem se sproščajo anhidromuropeptidi, ki se ujamejo v periplazmi. (16) Nadalje jih tam cepijo periplazemske amidaze, predvsem AmiD. (15)

Manjši del peptidoglikanskih tripeptidov in tetrapeptidov ter anhidromuropeptidov bakterija iz periplazme v citoplazmo privzame z oligopeptidnim prenašalcem Opp, večji del pa privzame preko specifičnega sekundarnega prenašalca AmpG. (17, 18)

V citoplazmi se nadalje anhidromuropeptidi razgradijo z NagZ, AmpD in LdcA do *N*-acetilglukozamina, anhidro *N*-acetilmuraminske kisline, D-Ala in L-Ala- γ -D-Glu-m-DAP tripeptida. Tripeptid se z muropeptidno ligazo MpI direktno pretvori v UDP-MurNAc in vstopi v pot sinteze peptidoglikana. Sladkorja pa se fosforilirata s kinazami NagK in AnmK

ter se pretvorita v MurNAc-6-fosfat in GlcNAc-6-fosfat, nadalje pa se tudi MurNAc-6-fosfat pretvori v GlcNAc-6-fosfat z MurNAc-6-fosfatno eterazo MurQ, pri čemer se sprosti D-laktat. Nazadnje se ves nastali GlcNAc-6-fosfat deacetilira z NagA in kot tak vstopi v sintezo prekurzorja celične stene UDP-GlcNAc ali katabolično pot glikolize. (15) Proses obnavljanja peptidoglikana je shematsko ponazorjen na sliki 3.



Slika 3: Prikaz obnavljanja peptidoglikana pri *E. coli*. Povzeto po (15).

Poleg opisanih prenašalcev pa lahko *N*-acetilglukozamin in *N*-acetilmuraminska kislina vstopita v celico tudi s pomočjo fosfotransferaznih prenašalcev kot sta MurNAc-6-fosfat in GlcNAc-6-fosfat. (15)

Poleg nepotrebne izgube materiala, je proces obnavljanja peptidoglikana pomemben tudi z drugih stališč. Muropeptidi imajo pomembno funkcijo prenašalcev informacij in signalnih molekul v bakterijski komunikaciji. Pri evkariontskih organizmih prisotnost muropeptidov sproži imunski odziv in ponovna uporaba gradnikov peptidoglikana omogoča bakterijski celici preživetje v gostiteljskem organizmu. (19)

Kemijska struktura peptidoglikana po Gramu pozitivnih bakterij je zelo podobna kot pri po Gramu negativnih bakterijah. Razlikuje se v sestavi peptidov, stopnji premreženosti in dolžini peptidoglikanskih verig. Po Gramu pozitivne bakterije sicer nimajo zunanje stene, vendar pa imajo le-tej podobne strukture, kot je zunanja ovojnica iz plasti polisaharidov in

proteinov. Prav tako so pri bakteriji *S. aureus* ugotovili, da ima območje, ki je podobno periplazemskemu prostoru. Ugotovljeno je bilo tudi, da obnavljanje celične stene pri *S. aureus* ni omejeno zgolj na peptidoglikan, podobnim procesom so podvrženi tudi teihoska kislina in polisaharidi kapsule. (15)

Z encimskega stališča se po Gramu pozitivne bakterije razlikujejo od po Gramu negativnih. S primerjavo prisotnosti genov med posameznimi vrstami po Gramu pozitivnih bakterij v primerjavi z *E. coli* so ugotovili, da litične transglikozidaze in anhidromuropeptidaze igrajo manjšo vlogo pri po Gramu pozitivnih bakterijah, saj genov za AmpG, AmiD in AmpD praktično ni zaslediti. Bolj pogoste pa so lizocimske muramidaze in N-acetylglukozaminidaze. Prav tako pomembno vlogo pri hidrolizi peptidov igrajo amidaze in karboksipeptidaze. Pri *S. aureus* so tako kot pri drugih po Gramu pozitivnih bakterijah odkrili prisotnost gena za MppA, kar nakazuje, da je pot preko prenosalca Opp/MppA v tem primeru poglavita pot privzema, poleg tega pa sta pri *S. aureus* prisotna tudi gena za MurP in NagE, ki tudi pri *E. coli* predstavlja alternativno pot privzema aminosladkorjev. Zelo pomembna pa je prisotnost MurQ, ki nakazuje, da se sladkorji v bakterijskih celicah metabolizirajo. (15)

1.3 AVTOLIZINI

1.3.1 OPREDELITEV

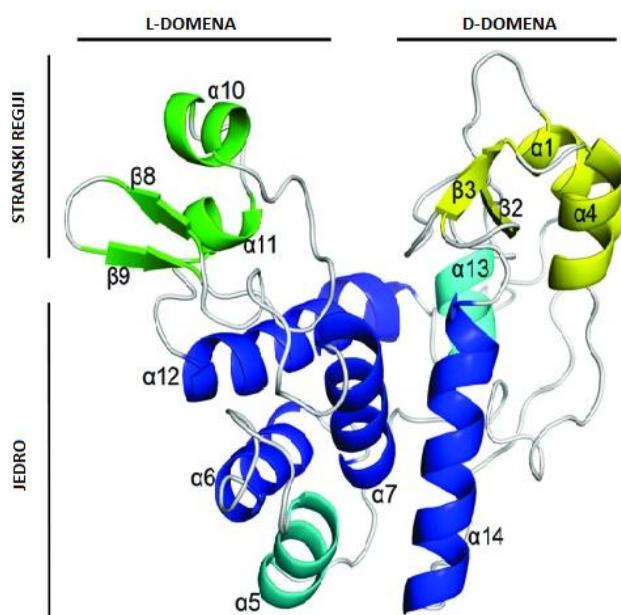
Avtolizini ali peptidoglikanske hidrolaze so skupina encimov, ki vključuje glikozidaze in peptidaze. (13) Ime avtolizini so dobili zato, ker so lahko potencialno avtolitični, če njihova funkcija ni uravnana. (20) Ta skupina encimov igra pomembno vlogo pri delitvi bakterijskih celic in njihovi gibljivosti ter pri ohranjanju dinamičnega ravnotežja med izgradnjo in razgradnjo peptidoglikana. Na strukturo peptidoglikana delujeta dve skupini avtolizinov, litične transglikozidaze in N-acetylglukozaminidaze. (13)

Nadalje se N-acetylglukozaminidaze delijo na endo- in ekso-N-acetylglukozaminidaze. Pri po Gramu pozitivnih bakterijah so ugotovili, da so N-acetylglukozaminidaze pomembne za vegetativno rast bakterijskih celic in celično delitev. (13)

Genom bakterije *S. aureus* kodira pet N-acetylglukozaminidaz. Ugotovljeno je bilo, da bakterijske celice, ki nimajo nobene od N-acetylglukozaminidaz, niso viabilne. (21)

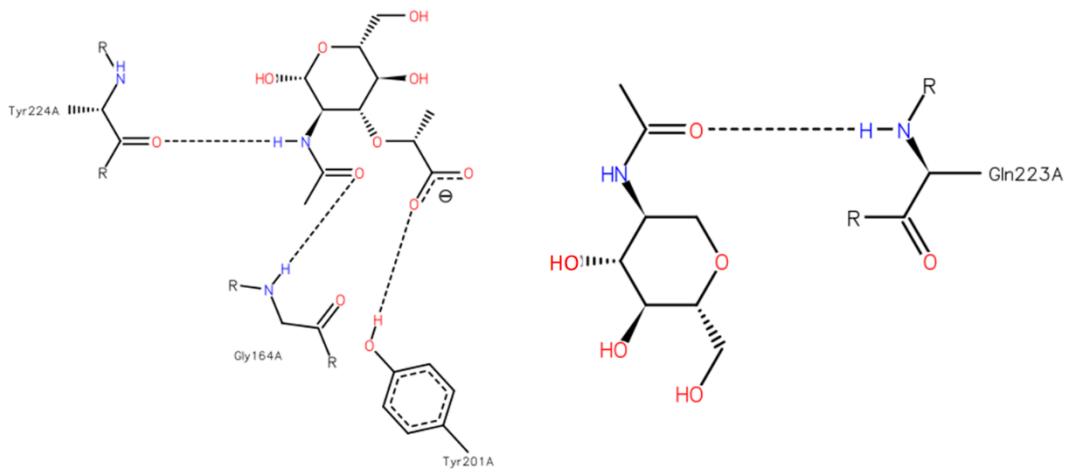
1.3.2 AVTOLIZIN E

AtlE je protein, ki ga kodira SAV2307 gen bakterije *S. aureus*. Sestavlja ga 258 aminokislinskih ostankov. (21) Kristalna struktura encima AtlE, ki je prikazana na sliki 4, je v obliki srca, razdelimo jo lahko na jedro in 2 stranski regiji oziroma na levo in desno domeno. Spodnji del obeh domen predstavlja jedro, ki je kompaktno zgrajeno iz α -vijačnic, medtem ko sta stranski regiji leve in desne domene zgrajeni iz α -vijačnic in β -ravnin. Med obema stranskima regijama skozi celoten centralni del molekule poteka dolg kanal. (21)



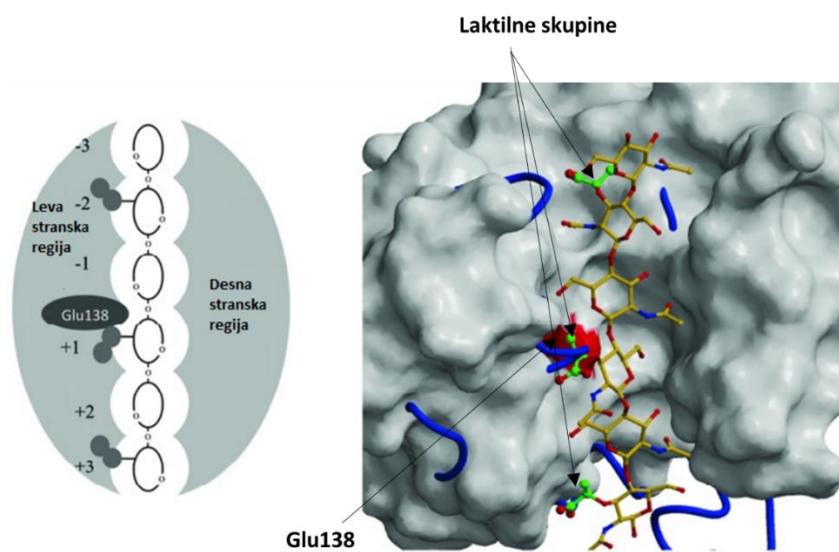
Slika 4: Encim AtlE. Prirejeno po (21).

Aminosladkorja *N*-acetilglukozamin in *N*-acetilmuraminska kislina, ki sestavlja peptidoglikan, se v strukturo molekule proteina AtlE vežeta z vodikovimi vezmi. *N*-acetilna skupina *N*-acetilglukozamina tvori vodikovo vez z amino skupino Gln223. *N*-acetilmuraminska kislina tvori vodikovi vezi z amino skupino Gly164 in karbonilom Tyr224, kisikov atom iz laktilne skupine *N*-acetilmuraminske kisline pa tvori vodikovo vez s hidroksilno skupino Tyr201, kot to prikazuje slika 5. (21)



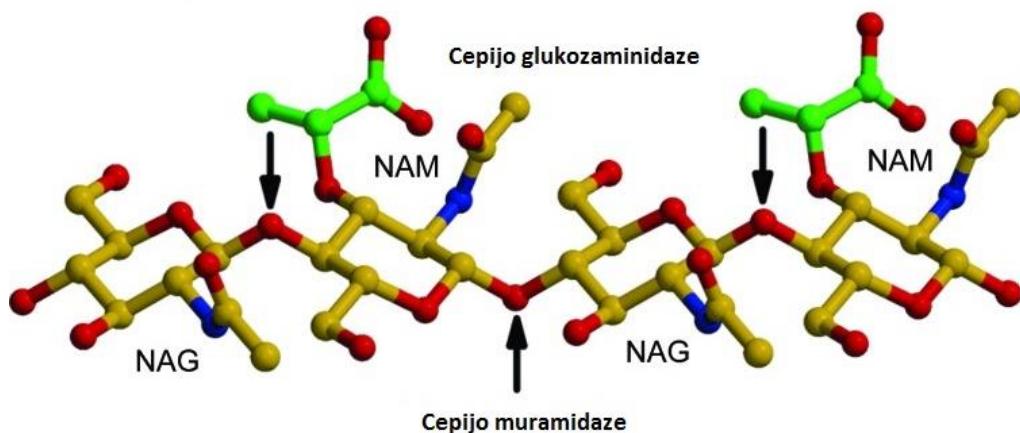
Slika 5: Interakcije *N*-acetilmuraminske kisline (levo) in *N*-acetilglukozamina (desno) z AtLE. Pritejeno po (32).

AtLE cepi β -(1,4)-glikozidno vez med *N*-acetilglukozaminom in *N*-acetilmuraminsko kislino, pri čemer se tvorijo NAG-NAM disaharidi. Vez se cepi med O4 atomom *N*-acetilglukozamina in C1 atomom *N*-acetilmuraminske kisline. Za prepoznavanje substrata v aktivnem mestu AtLE so pomembne laktilne skupine, le-te so v vezavnem mestu *N*-acetilglukozaminidaz obrnjene v levo. Strukture na levi strani vezavnega mesta prepoznavajo laktilne skupine in glikopeptidne enote, medtem ko strukture na desni strani preprečujejo njihovo vezavo. (21) Na sliki 6 je prikazano aktivno mesto encima AtLE z modelom substrata.



Slika 6: Aktivno mesto AtLE. Pritejeno po (21).

Prav tako cepijo β -(1,4)-glikozidno vez muramidaze, vendar med O4 atomom *N*-acetilmuraminske kisline in C1 atomom *N*-acetilglukozamina, odločilne za razliko v mestu cepitve vezi pa so ravno laktilne skupine. (21) Selektivnost v mestu cepitve je odločilna tudi za izbiro *N*-acetilglukozaminidaz kot možnih tarč za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Pri doseganju protibakterijskih učinkov želimo namreč selektivno inhibirati le *N*-acetilglukozaminidaze, ne pa tudi muramidaz, saj so le-te del prve linije imunskega odziva. Selektivnost pri cepitvi β -(1,4)-glikozidne vezi med *N*-acetilglukozaminom in *N*-acetilmuramsko kislino je prikazana na sliki 7.



Slika 7: Selektivnost pri cepitvi β -(1,4)-glikozidne vezi v NAM-NAG. Prikejeno po (21)

1.4 GLIKOMIMETIKI IN ZAVIRALCI BAKTERIJSKIH *N*-ACEILGLUKOZAMINIDAZ

Ogljikovi hidrati igrajo pomembno vlogo v velikem številu bioloških procesov, vendar pa je njihovo število v vrstah zdravilnih učinkovin precej omejeno.

Spojine vodnice, ki imajo v svoji strukturi mono ali oligosaharide, niso optimalne zradi svoje farmakokinetike, kar botruje manjšemu številu tovrstnih zdravilnih učinkovin na tržišču. Ker so zelo polarne, ne morejo prehajati skozi steno tankega črevesja s pasivno difuzijo, kar je predpogoj za peroralno uporabne učinkovine. Nadalje so tudi, če jih v sistemski krvni obtok administriramo parenteralno, podvržene hitremu izločanju skozi ledvice. (22)

Glikomimetiki so spojine, ki so strukturno podobne ogljikovim hidratom in ohranjajo njihovo bioaktivno funkcijo, a hkrati premagujejo zgoraj navedene težave, ki so jim pri doseganju terapevtskih učinkov podvrženi ogljikovi hidrati.

Identificiranih je bilo že več kot 80 proteinov, ki vežejo ogljikove hidrate, zato predstavljajo glikomimetiki obetavno skupino zdravilnih učinkovin.

Pristop k načrtovanju glikomimetikov se deli na 3 veje (23):

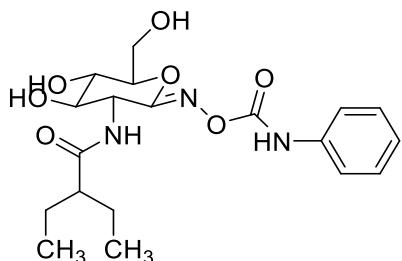
1. Multivalentni inhibitorji encimov, to so glikokonjugati, ki za antagonistično delovanje izkoriščajo multivalentne interakcije s proteini, ki jih naravnii substrati nimajo.
2. Oligosaharidi ali glikokonjugati, ki imajo nendaravne povezave med posameznimi sladkornimi enotami, imajo po eni strani izboljšane t.i. »drug-like« lastnosti, po drugi pa so tudi bolj stabilni proti encimski razgradnji. Takšni glikomimetiki imajo npr. lahko zamenjan endociklični O s C, N ali S, na ta način dobimo karbasladkorje, iminosladkorje ali tiosladkorje, lahko pa imajo z enim od teh atomov zamenjan tudi eksociklični O ter tvorijo C-glikozide, N-glikozide, S-glikozide, poznamo tudi fosfasladkorje, ki imajo ogljikov atom zamenjan s P=O skupino.
3. Glikozidi, ki imajo pripet nendaravni aglikonski del, ki oponaša naravnii ligand in lahko prispeva še dodatne interakcije. Na tem področju se zlasti raziskujejo manozidni antagonisti bakterijskega receptorja FimH in antagonisti receptorja DC-SIGN.

Na tržišču je že kar nekaj učinkovin, ki so glikomimetiki. Uporabljajo se pri sladkorni bolezni, ker preprečujejo metabolizem ogljikovih hidratov (vogliboza, miglitol, akarboza), kot preventiva proti okužbam z virusom influence (zanamivir, oseltamivir), pri zdravljenju Gaucherjeve bolezni (miglustat), epilepsije (topiramat) in osteoartritisa (hialuronat) ter kot antikoagulanti, ki se vežejo na antitrombin III (fondaparinuks, ardeparin, dalteparin, nardoparin, endoksaparin). (22)

Glikomimetiki se raziskujejo tudi kot morebitne protibakterijske učinkovine. Na tem področju veliko obetajo antagonisti receptorja FimH. Gre za učinkovine, ki bi se uporabljale kot antiadhezivna terapija zoper uropatogeno *E. coli* pri zdravljenju infekcij urinarnega trakta. Kristalna struktura receptorja FimH in vezava ligandov v vezavno mesto sta že zelo dobro raziskana. Načrtovanje antagonistov FimH je primer že zelo dovršenega pristopa k razvoju novih glikomimetičnih protibakterijskih učinkovin, medtem ko je delovanje na druge možne tarče, kot so tudi bakterijske N-acetylglukozaminidaze, še v zgodnejših stopnjah raziskav.

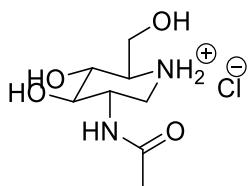
Prve raziskave na tem področju so se osredotočale na iskanje zaviralcev NagZ, N-acetylglukozaminidaze prisotne citoplazmi, ki deluje na disaharidne glikopeptidne

intermediate med procesom obnavljanja peptidoglikana. Do sedaj sta znana dva potencialna zaviralca tega encima. Spojina EtBuPUG, ki je prikazana na sliki 8, je selektivni zaviralec NagZ bakterije *P. aeruginosa* ($K_i=3,5 \mu\text{M}$). (24) Načrtovana je tako, da oponaša domnevno stanje oksokarbenijevega iona. Med reakcijo captive glikozidnih vezi z NagZ (ter tudi z litičnimi transglikozidazami) namreč nastajajo oksokarbenijeve zvrsti. Raziskovalci so ugotovili, da bi zaviranje aktivnosti NagZ lahko povečalo učinkovitost β -laktamskih antibiotikov na *P. aeruginosa* in druge po Gramu negativne bakterije. (24)



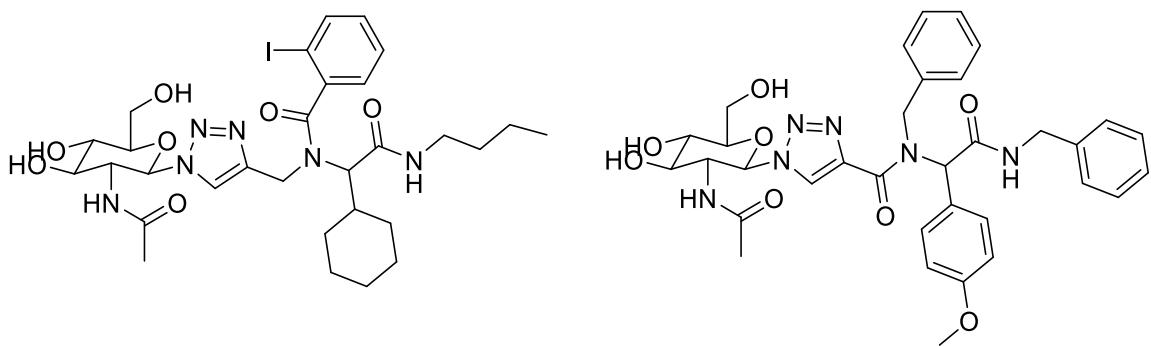
Slika 8: Spojina EtBuPUG. Povzeto po (24).

Prav tako je morebitni mimetik oksokarbenijevih zvrsti tudi druga spojina, iminosladkor prikazan na sliki 9, ki je kompetitivni inhibitor NagZ bakterije *P. aeruginosa* ($K_i=300 \pm 15 \text{ nM}$). (25)



Slika 9: Iminosladkor, kompetitivni inhibitor NagZ. Povzeto po (25).

Edini do zdaj znani uspešni poskus sinteze zaviralcev N-acetilglukozaminidaz, ki delujejo na celično steno, poroča o dveh potencialnih zavircih teh encimov bakterije *B. subtilis* ($\text{MIC} \sim 60 \mu\text{M}$) z glikozil triazolnim farmakoforom, prikazanih na sliki 10. (13)



Slika 10: Potencialna inhibitorja N-acetilglukozaminidaz *B. subtilis*. Povzeto po (13).

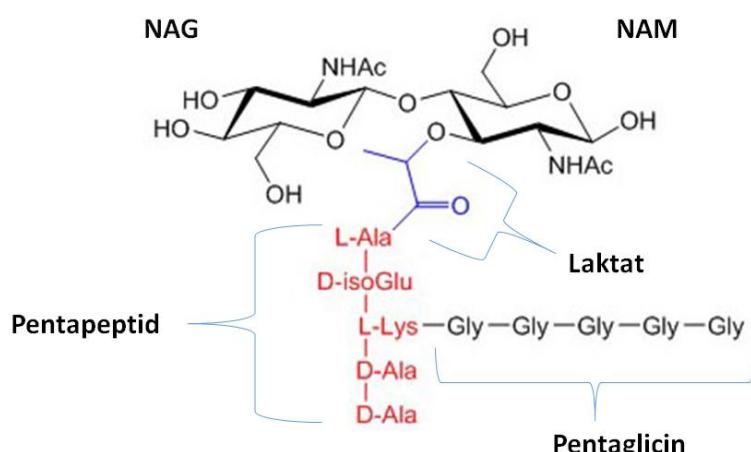
Spojini sta pokazali bakteriostatično delovanje na *B. subtilis* v sub-MIC koncentraciji, delitev celic je bila okrnjena. (13) Tudi v splošnem je zaradi narave tarče pričakovati bakteriostatično delovanje zaviralcev N-acetilglukozaminidaz, za baktericidni učinek bi morali uvesti terapijo v kombinaciji z drugimi antibiotiki.

Skupni lastnosti, ki povezujeta naštete potencialne glikomimetične zaviralce N-acetilglukozaminidaz, sta bazični center v strukturi, ki oponaša pozitivni naboj, ki nastane pri reakciji hidrolize glikozidne vezi, ter število in orientacija hidroksilnih skupin, kar tvori konformacijo, ki se selektivno prilega v vezavno mesto encima.

2. NAMEN IN POTEK DELA

V okviru magistrske naloge bomo sintezno pripravili nove glikomimetične spojine in aglikone, potencialne zaviralce bakterijskih N-acetilglukozaminidaz.

Pri načrtovanju potencialnih zaviralcev si bomo pomagali z že obstoječo kristalno strukturo encima AtlE, osnovo pri načrtovanju pa nam predstavlja tudi kemijska struktura peptidoglikana. Peptidoglikan je, kot je to razvidno iz slike 11, sestavljen iz *N*-acetilglukozamina in *N*-acetilmuraminske kisline, ki sta med seboj povezana z β -1,4-glikozidno vezjo. Na laktat, ki je pripel na C3 atom v *N*-acetilmuraminski kislini, je vezana kratka peptidna veriga. (12)

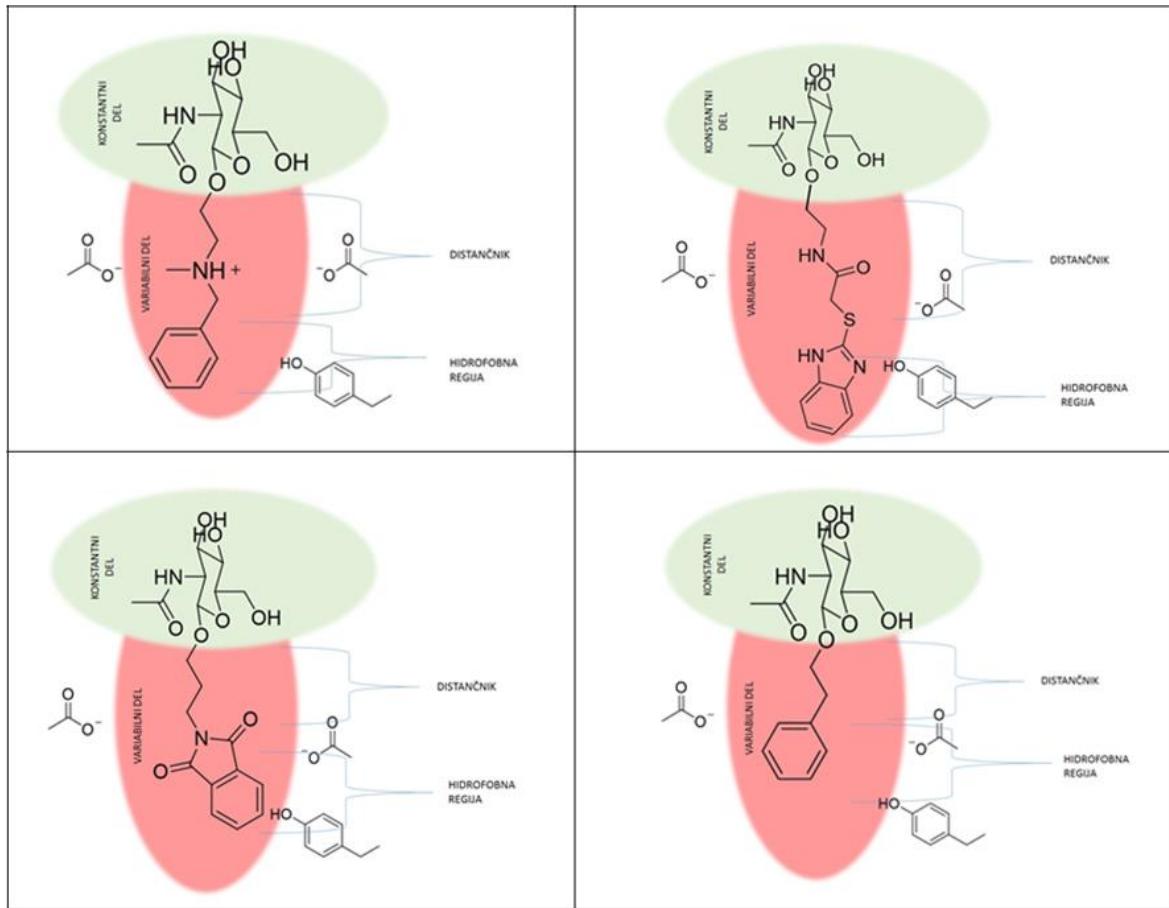


Slika 11: Struktura peptidoglikana bakterije *S. aureus*

Pristop, ki ga bomo ubrali, je sinteza nendaravnih O-glikozidov, na *N*-acetilglukozamin bomo pripeli sintezno pridobljen aglikon. Na ta način bomo skušali doseči, da se potencialni zaviralec veže v vezavno mesto encima namesto naravnega substrata, to je peptidoglikana, a ga hkrati encim ne more cepiti. Možni pristopi, ki bi jih še lahko uporabili, so tudi tvorba C- in N-glikozidov, namesto na *N*-acetilglukozamin bi lahko aglikonski del pripenjali tudi na *N*-acetilmuraminsko kislino.

N-acetilglukozamin bo predstavljal konstantni del v strukturi novo načrtovanih zaviralcev. Predvidevamo, da se bo vezal v vezavno mesto za *N*-acetilmuraminsko kislino, četudi nanj nismo pripeli laktata na C3 atom sklepamo, da bo še vedno tvoril dovolj interakcij z vezavnim mestom za pravilno orientacijo spojin in ustrezeno afiniteto. Variabilni del

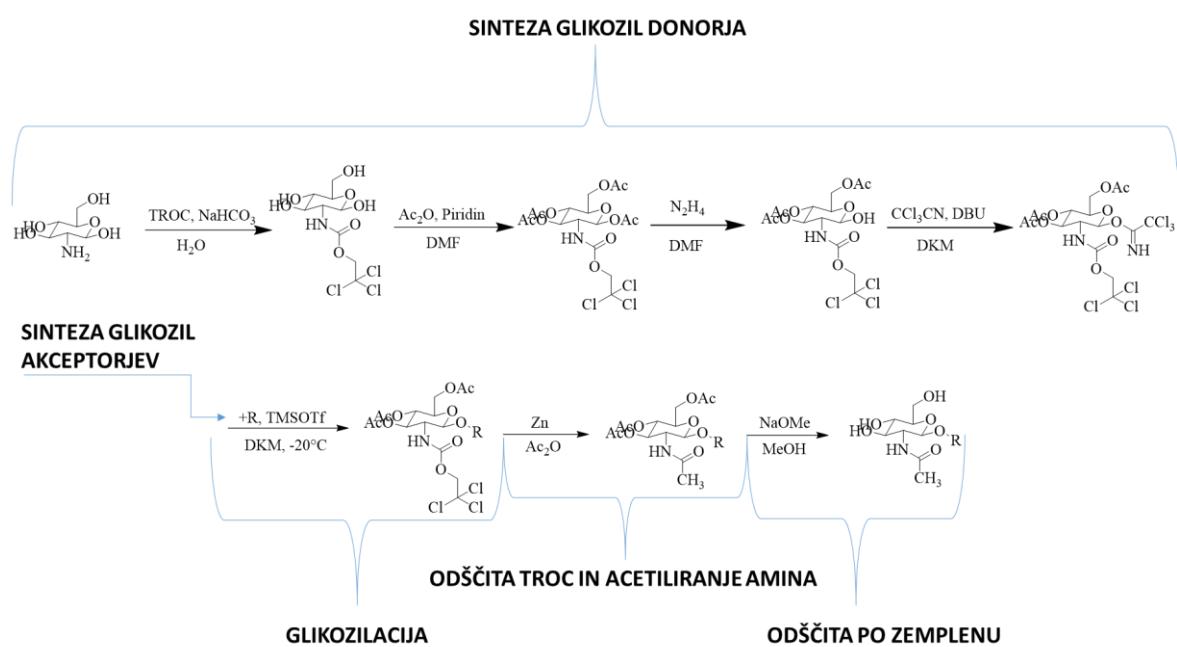
strukture zaviralcev pa bo aglikonski del, s katerim želimo doseči dodatne interakcije, in sicer vezavo v katalitično mesto, kamor se kokristaliziran disaharid NAM-NAG ne veže. Variabilni del bo zgrajen iz distančnika iz 2 ali 3 C atomov, kationskega centra, s katerim skušamo doseči interakcijo s karboksilatoma dveh aminokislinskih ostankov v bližini katalitičnega mesta, in lipofilnega dela, ki bo potencialno tvoril interakcijo s tirozinskim aminokislinskim ostankom. Strukture načrtovanih zaviralcev in naša predpostavka vezave le-teh v vezavno mesto so prikazani na sliki 12.



Slika 12: Načrtovani glikomimetiki in predpostavka njihove vezave z AtLE

Sintezni načrt bo, kot je to razvidno iz slike 13, zastavljen tako, da bomo najprej sintetizirali glikozil donor, torej ustrezen zaščiten in aktiviran *N*-acetilglukozamin, nato pa še glikozil akceptor, t.j. aglikonski del. Glikozil donor in glikozil akceptor želimo povezati z β -glikozidno vezjo, saj je β -vez prisotna tudi v naravnem substratu, zato je pomembno, da to upoštevamo že v postopku sinteze glikozil donorja.

N-acetilglukozaminidaze predstavljajo še nevalidirano tarčo v razvoju novih protibakterijskih učinkovin. Poskusi vplivanja na encime, ki cepijo vezi v peptidoglikanu, so se do sedaj osredotočali predvsem na litične transglukozilaze po Gramu negativnih bakterij. Prvi obetavni poskus sinteze zaviralcev, ki bi delovali na N-acetilglukozaminidaze v celični steni, poroča o dveh potencialnih zavircih z glikozil triazolno strukturo. Raziskovalci so uspeli določiti minimalne inhibitorne koncentracije in posredno potegniti sklep, da spojini najverjetneje dosegata učinek z delovanjem na N-acetilglukozaminidaze bakterije *B. subtilis*. (13) Namen našega dela pa je, da bi sintetizirali zaviralce, ki bodo dosegali minimalne inhibitorne koncentracije in hkrati določiti kristalno strukturo encima AtlE z vezanim zavircem, torej neposredno povezati protimikrobnno delovanje z zavirnim delovanjem na N-acetilglukozaminidaze.



Slika 13: Sintezni načrt

3. MATERIALI IN METODE

Pri delu smo uporabljali reagente in topila proizvajalcev Merck, Sigma-Aldrich, Kemika, Fluka. Voda, ki smo jo uporabljali za ekstrakcije, je bila prečiščena.

Laboratorijska oprema:

- Tehnica: Sartorius
- Magnetno mešalo: RCT basic IKA
- UV svetilka: Lamag UV-Cabinet II
- Rotavapor: Büchi R-114
- Refraktometer: Biacore T100

Kromatografske metode

Tankoplastna kromatografija (TLC): Za stacionarno fazo smo uporabljali plošče proizvajalca Merck, Silica Gel 60 F254 z 0,2 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu in z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Uporabljali smo različne mobilne faze, ki smo jih pripravili sami. Za detekcijo spojin smo uporabljali UV svetilko pri $\lambda=254$ nm in orositvene reagente fosformolibdat in nihidrin.

Kolonska kromatografija: Kot stacionarno fazo smo uporabljali silikagel proizvajalca Merck, Silica Gel 60 z velikostjo delcev 0,040-0,063 mm. Uporabljali smo različne mobilne faze, ki smo jih pripravili sami. Steklene kolone, ki smo jih uporabljali, so bile različnih velikosti. Pretok mobilne faze smo po potrebi pospeševali z uvajanjem zračnega nadtlaka ali zmanjševali z zapiranjem ventila.

Spektroskopske metode

Jedrska magnetna resonanca (NMR): Spektri so bili posneti s spektrometrom Bruker Avance DPX400 na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorci so bili raztopljeni v CDCl_3 ali CD_3OD . Kot interni standard smo uporabili tetrametilsilan (TMS).

Masna spektroskopija (MS): Spektri so bili posneti z ESI tehniko ionizacije s spektrometrom VG-Analytical Autospec Q proizvajalca Micromass na Centru za masno spektrometrijo Inštituta Jožef Stefan v Ljubljani.

Določevanje tališč

Tališča smo določali s Koflerjevim talilnim mikroskopom proizvajalca Leica in so nekorigirana.

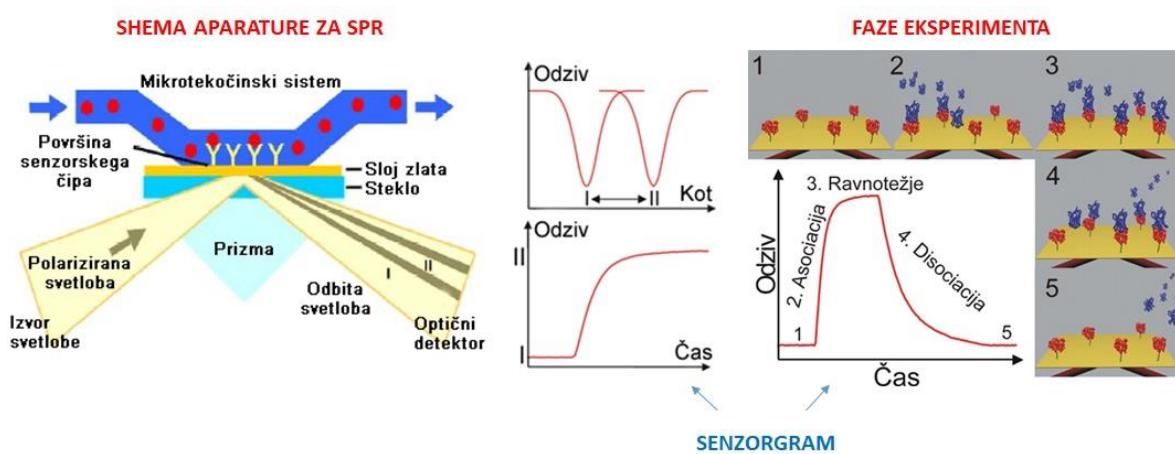
Računalniška programska oprema

Za risanje struktur smo uporabili program Chem Draw Professional 16.0, z njim smo si pomagali tudi pri poimenovanju spojin. Za risanje slik smo uporabili programa Microsoft Word in PowerPoint. NMR spektre smo asignirali s pomočjo programa MestReNova 11.0.4.

Testiranje vezave spojin na protein AtlE

Afiniteta interakcij spojin s proteinom AtlE je bila ovrednotena s pomočjo površinske plazmonske resonance (SPR), testiranje je bilo izvedeno v Infrastrukturnem centru za raziskave molekulskih interakcij (Biotehniška fakulteta, Univerza v Ljubljani).

SPR je fizikalni proces, ki se pojavi, ko žarek polarizirane svetlobe zadane tanko plast kovine pod pogoji popolnega odboja. (26) Ko se na površino čipa vežejo molekule, se spremeni lomni količnik tik ob stekleni ploščici, tanka plast zlata na čipu privzame del energije laserskega žarka in zato se spremeni kot odbite svetlobe.. Optični detektor zazna spremembo kota in jo prevede v spremembo odziva. Rezultat metode je krivulja sprememb odziva v odvisnosti od časa, t.j. senzogram (slika 13). (26, 27)



Slika 13: Aparatura in potek eksperimenta SPR. Prirejeno po (27).

Pogoji izvajanja testiranj

Aparat: Biacore T100 (GE Healthcare)

Čip: Series S sensor chip CM5 (GE Healthcare)

Nosilni pufer za titracije: 67 mM Na₂HPO₄, 12.5 mM KH₂PO₄, 70 mM NaCl, 0,05% P20, pH 7.4 , 5% DMSO

Ligand (molekula, pripeta na čip): avtolizin E, 28 kDa, pI: 8.8, Rimm: 13900 RU

Analiti (spojine, ki smo jih testirali):

- 34 spojin z oznakami 1-34
- Regeneracijska raztopina: /

Avtolizin smo najprej imobilizirali na površino senzorskega čipa po navodilih proizvajalca.

Površino dveh pretočnih celic na čipu smo najprej aktivirali z 10-minutnim pulzem mešanice EDC/NHS, nato pa samo na drugo celico nanesli avtolizin. Površino obeh celic smo blokirali s 7-minutnim vbrizganjem etanolamina. Vezavo spojin smo opazovali najprej pri dveh koncentracijah (1 mM in 100 µM), nato pa spojine, ki so se vezale, titrirali še v večjem koncentracijskem območju. Vezavo smo opazovali preko obeh pretočnih celic in morebitno nespecifično vezavo na prvi (prazni) celici sproti odštevali. Vezavo spojin smo spremljali 30 s pri pretoku 10 µl/min in nadaljnjih 30 s opazovali disociacijo.

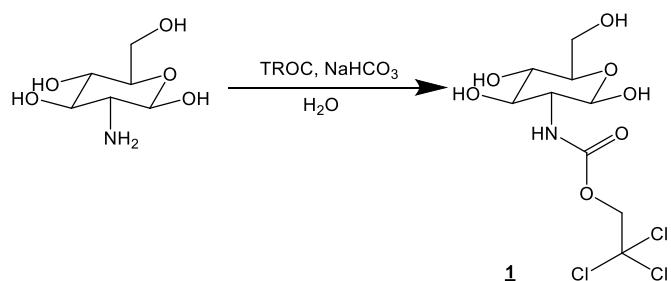
Eksperiment je potekal pri sobni temperaturi. Podatki o koncentracijah, pri katerih so bile posamične spojine testirane, se nahajajo v Prilogi 3.

4. EKSPERIMENTALNI DEL

V nadaljevanju so opisani sintezni postopki vseh končnih in vmesnih spojin. Spektroskopski analizni izvodi (NMR, MS) se nahajajo v Prilogi 1.

4.1 SINTEZA GLIKOZIL DONORJA

4.1.1 Sinteza 2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- α,β -D-glukopiranoze REAKCIJA:



V bučko smo natehtali D-glukozamin, dodali NaHCO_3 in raztopili v 50 ml vode. Nato smo ob konstantnem mešanju pri sobni temperaturi po kapljicah dodali 2,2,2-trikloroetyl kloroformat (TROC). Reakcijo smo pustili teči 1 uro, nato smo nevtralizirali s HCl , odfiltrirali belo oborino, ki je nastala, in jo posušili. Produkt smo prekristalizirali iz etanola. Reakcijo smo ponovili dvakrat z enakimi količinami reagentov. Reakcija je navedena v literaturi (28).

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
D-glukozamin	5,400 g	25,100	1
2,2,2-trikloroetyl kloroformat	4,05 ml	29,000	1,2
NaHCO_3	6,300 g	75,000	3

Kemijska formula: $\text{C}_9\text{H}_{14}\text{Cl}_3\text{NO}_7$

Izgled: Beli svetleči kristali

$\eta=79\%$ (7,036 g)

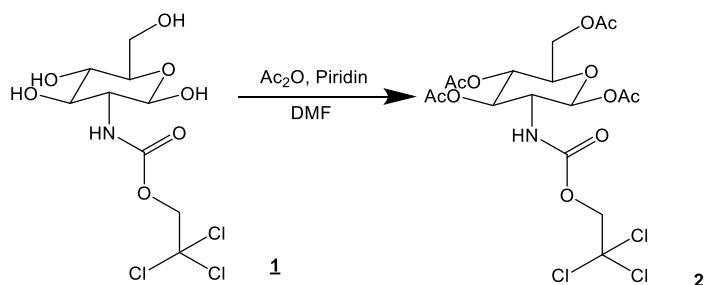
$T_{\text{tal}}=167-171^\circ\text{C}$

$R_f=0,84$ (AcCN:MeOH:H₂O=3:1:1)

$M_r=354,56$

4.1.2 Sinteza 1,3,4,6-tetra-O-acetyl-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- α,β -D-glukopiranoze

REAKCIJA:



Spojino **1** smo pod argonovo atmosfero raztopili v 10 ml brezvodnega DMF in po kapljicah dodali brezvodni piridin. Ob stalem mešanju pri sobni temperaturi smo počasi po kapljicah dodali acetanhidrid in reakcijo pustili teči 3 dni pri sobni temperaturi. Nato smo reakcijsko zmes prelili s 40 ml etilacetata in ekstrahirali z 2x20ml 0,1 M HCl, 2x20ml NaHCO₃, 2x20ml H₂O in 1x20ml NaCl. Topilo smo nato uparili in preostanek v bučki še koevaporirali s toluenom. Reakcijo smo ponovili trikrat.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 1	3,420 g	9,645	1
	7,036 g	19,844	
	0,500 g	1,410	
Acetanhidrid	4,56 ml	48,227	5
	9,38 ml	99,219	
	0,67 ml	7,050	
Piridin	2,33 ml	28,935	3
	4,80 ml	59,531	
	0,34 ml	4,230	

Kemijska formula: C₁₇H₂₂Cl₃NO₁₁

Rf=0,42 (EtOAc:Hex=1:1)

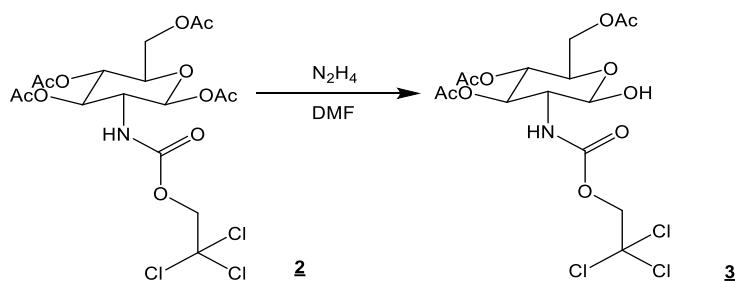
Mr=522,71

Izgled: Belo-rumenkasta pena

η =85,3% (4,301 g), 93,4% (9,688 g),
59,8% (0,441 g)

4.1.3 Sinteza 3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- α,β -D-glukopiranoze

REAKCIJA:



Spojino **2** smo raztopili v 20 ml DMF, pri sobni temperaturi smo počasi dodali hidrazin in acetno kislino. Reakcijo smo pri sobni temperaturi pustili teči 2 uri. Nato smo reakcijsko zmes prelili s 40 ml etilacetata ter ekstrahirali z 2x20ml NaHCO₃, 2x20 ml H₂O in 2x20 ml NaCl, posušili z Na₂SO₄ in uparili topilo. Reakcijo smo ponovili trikrat. Reakcija je opisana v literaturi. (28)

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 2	4,301	8,275	1
	1,000 g	1,913	
	3,598 g	6,883	
Hidrazin hidrat (35%)	0,963 ml	10,758	1,3
	0,22 ml	2,487	
	0,80 ml	8,948	
Ocetna kislina	0,615 ml	10,758	1,3
	0,14 ml	2,487	
	/	/	

Kemijska formula: C₁₅H₂₀Cl₃NO₁₀

Rf=0,29 (EtOAc:Hex=1:1)

Mr=480,67

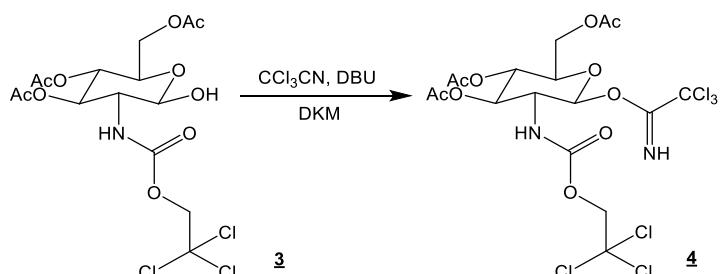
Izgled: Bledo rumenkasta oljnata smola

$\eta = 91,5\% \quad (3,640 \text{ g}), \quad 84,0\% \quad (0,772 \text{ g}),$

95,7% (3,143 g)

4.1.4 Sinteza 3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- α -D-glukopiranozil trikloroacetimidata

REAKCIJA:



Spojino **3** smo pod argonovo atmosfero raztopili v 20 ml brezvodnega diklorometana, dodali trikloroacetonitril in DBU in pri sobni temperaturi ob stalnem mešanju pustili reakcijo teči 2 uri. Nato smo uparili topilo in produkt očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo EtOAc:heksan=3:1. Reakcijo smo ponovili trikrat. Reakcija je opisana v literaturi. (28)

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 3	3,640 g	7,573	1
	0,772 g	1,606	
	3,842 g	7,993	
Trikloroacetonitril	7,60 ml	75,726	10
	1,61 ml	16,060	
	8,015 ml	79,930	
DBU	0,28 ml	1,893	0,25
	0,06 ml	0,4015	
	0,30 ml	2,000	

Kemijska formula: $C_{17}H_{20}Cl_6N_2O_{10}$

$\eta=21,4\% \quad (1,101 \text{ g}), \quad 60,7\% \quad (0,610 \text{ g}),$

Mr=625,05

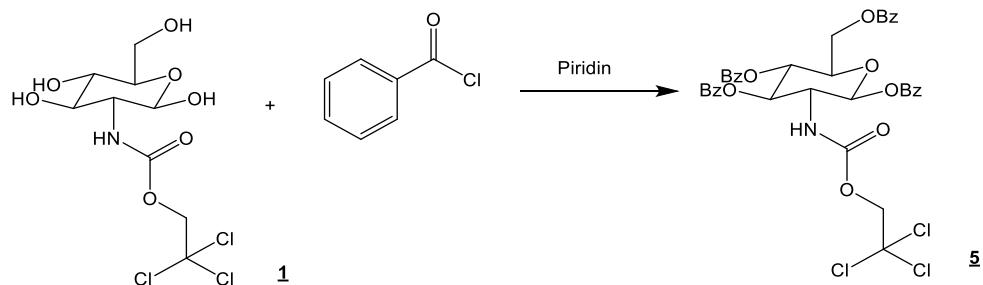
36,2% (1,811 g)

Rf=0,56 (EtOAc:heksan=1:1)

Izgled: Bela pena

4.1.5 Sinteza 1,3,4,6-tetra-O-benzoil-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- α,β -D-glukopiranoze

REAKCIJA:



Spojino **1** smo raztopili v 10 ml brezvodnega piridina in ohladili na ledeni kopeli. Nato smo postopoma po kapljicah dodajali benzoil klorid. Reakcijo smo pustili pri sobni temperaturi teči čez noč. Nato smo uparili topilo in produkt očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo EtOAc:heksan=1:1.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 1	3,000 g	8,460	1
Benzoil klorid	3,930 ml	33,840	4

Kemijska formula: C₃₇H₃₀Cl₃NO₁₁

Mr=770,99

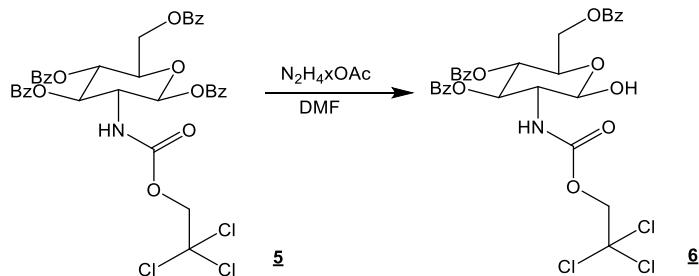
η =92,6% (6,042 g)

Rf=0,22 (EtOAc:Hex=1:1)

Izgled: Rumenkasta oljnata smola

4.1.6 Poskus sinteze 3,4,6-tri-O-benzoil-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- α , β -D-glukopiranoze

REAKCIJA:



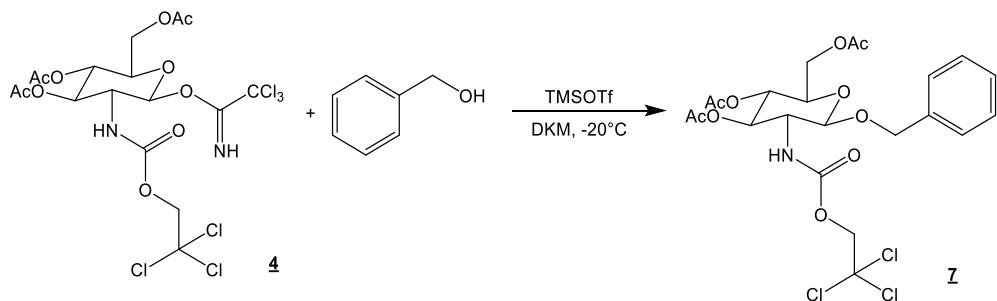
Spojino **5** smo raztopili v 10 ml DMF. Nato smo po kapljicah dodali hidrazin in ekvivalent ocetne kisline. Reakcijo smo pri sobni temperaturi pustili teči čez noč. TLC je pokazal, da reakcija ni potekla.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 5	0,500 g	0,649	1
Hidrazin hidrat (35%)	0,075 ml	0,843	1,3
Oacetna kislina	0,048 ml	0,843	1,3

4.2 SERIJA 1: GLIKOZIL AKCEPTORJI: ENOSTAVNI BENZILNI ALKOHOLI

4.2.1 Sinteza 1-benzil-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- β -D-glukopiranoze

REAKCIJA:



Spojino **4** smo pod argonovo atmosfero raztopili v 10 ml brezvodnega diklorometana in dodali benzilni alkohol. Ohladili smo na -20°C, nato dodali TMSOTf. Reakcijo smo pustili teči pri -20°C čez noč in nato še 6 ur pri sobni temperaturi. Reakcijo smo ustavili z dodatkom

2,6 eq Et₃N in uparili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo toluen:EtOAc=7:3.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 4	0,150 g	0,240	1,5
Benzilni alkohol	0,017 ml	0,160	1
TMSOTf	0,015 ml	0,080	0,5

Kemijska formula: C₂₂H₂₆Cl₃NO₁₀

R_f=0,42 (Toluen:EtOAc=7:3)

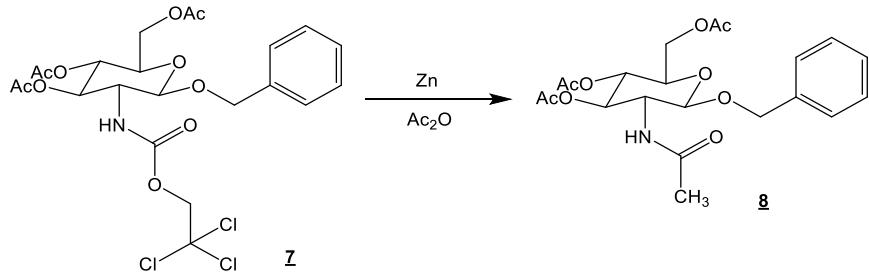
Mr=570,80

Izgled: Beli kristali

η =47,4% (0,065 g)

T_{tal}=151-155°C

4.2.2 Sinteza 1-benzil-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-acetamido- β -D-glukopiranoze REAKCIJA:



Spojino **7** smo raztopili v 5 ml acetanhidrida in dodali 0,5 g sveže aktiviranega Zn. Reakcijo smo pri sobni temperaturi pustili teči čez noč. Nato smo odfiltrirali Zn, sprali z metanolom in uparili topilo. Izvedli smo ločbo s kolonsko kromatografijo, pri čemer so najprej uporabili mobilno fazo toluen:EtOAc=7:3, nato pa DKM:MeOH=9:1.

Postopek aktivacije Zn: Zn prah smo najprej dispergirali v 10 ml 4M HCl, nato sprali z 20 ml vode, 20 ml absolutnega EtOH in 20 ml dietiletra.

Kemijska formula: C₂₁H₂₇NO₉

Izgled: Rdečasta smola

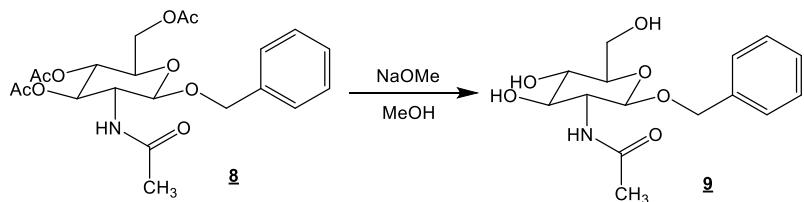
Mr=437,45

η =53,4% (0,131 g)

R_f=0,10 (Toluen:EtOAc=7:3)

4.2.3 Poskus sinteze 1-benzil-2-deoksi-2-acetamido- β -D-glukopiranoze

REAKCIJA:

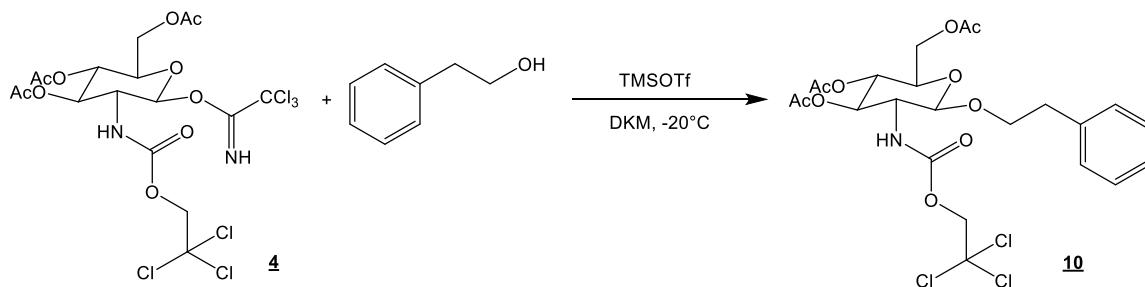


Spojino **8** smo pod argonovo atmosfero raztopili v 10 ml brezvodnega metanola in pri sobni temperaturi dodali NaOMe. Reakcijo smo pustili teči čez noč pri sobni temperaturi. Nato smo reakcijo ustavili z dodatkom ionskoizmenjevalne smole Amberlite® IR120. TLC je pokazal, da je pri reakciji nastalo precej različnih spojin, vendar pa nobena od njih ni bila želena spojina.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 8	0,110 g	0,251	1
NaOMe (30%)	0,0094 ml	0,050	0,2

4.2.4 Sinteza 1-feniletil-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- β -D-glukopiranoze

REAKCIJA:



Spojino **4** smo pod argonovo atmosfero raztopili v 10 ml brezvodnega diklorometana in dodali 2-fenyletanol. Reakcijsko zmes smo ohladili na -20°C, nato pa smo dodali TMSOTf. Reakcijo smo pustili teči pri -20°C čez noč. Reakcijo smo ustavili z dodatkom Et3N in uparili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo toluen:EtOAc=7:3.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 4	0,400 g	0,640	1,5
2-feniletanol	0,051 ml	0,427	1
TMSOTf	0,039 ml	0,213	0,5

Kemijska formula: C₂₃H₂₈Cl₃NO₁₀

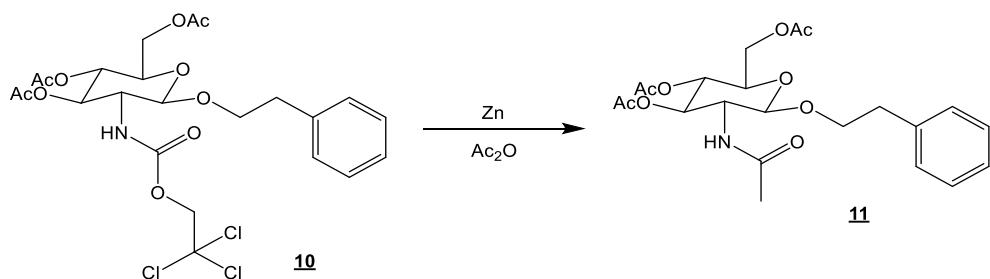
Rf=0,44 (Toluen:EtOAc=7:3)

Mr=584,82

Izgled: Prozorna smola

$\eta=72,1\%$ (0,270 g)

4.2.5 Sinteza 1-feniletil-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-acetamido- β -D-glukopiranoze REAKCIJA:



Spojino smo raztopili v 5 ml acetanhidrida in dodali 0,5 g sveže aktiviranega Zn. Reakcijo smo pri sobni temperaturi pustili teči čez noč. Nato smo odfiltrirali Zn, sprali z metanolom in uparili topilo. Izvedli smo ločbo s kolonsko kromatografijo, pri čemer so najprej uporabili mobilno fazo toluen:EtOAc=7:3, nato pa DKM:MeOH=9:1.

Kemijska formula: C₂₂H₂₉NO₉

Mr=451,47

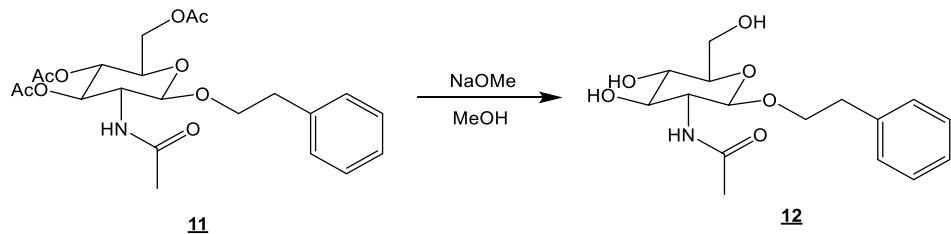
$\eta=65,2\%$ (0,136 g)

Rf=0,1 (toluen:EtOAc=7:3)

Izgled: Rjavkasta smola

4.2.6 Sinteza 1-feniletil-2-deoksi-2-acetamido- β -D-glukopiranoze

REAKCIJA:



Spojino **11** smo pod argonovo atmosfero raztopili v 10 ml brezvodnega metanola in pri sobni temperaturi dodali NaOMe. Reakcijo smo pustili teči čez noč pri sobni temperaturi. Nato smo reakcijo ustavili z dodatkom ionskoizmenjevalne smole Amberlite® IR120. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo kloroform:MeOH=5:1.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 11	0,136 g	0,301	1
NaOMe	0,011 ml	0,060	0,2

Kemijska formula: C₁₆H₂₃NO₆

Rf=0,51 (kloforom:MeOH=5:1)

Mr=325,36

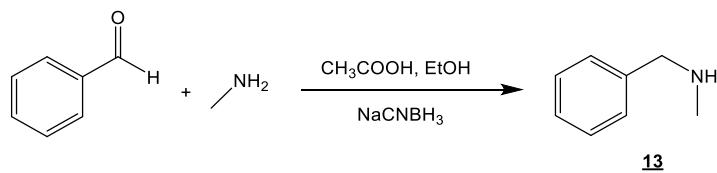
Izgled: Rjavo-rdeča smola

η =9,2% (0,009 g)

4.3 SERIJA 2: GLIKOZIL AKCEPTORJI: TERCIARNI AMINSKI DERIVATI

4.3.1 Poskus sinteze N-metil-1-fenilmelanamina z reduktivnim aminiranjem

REAKCIJA:



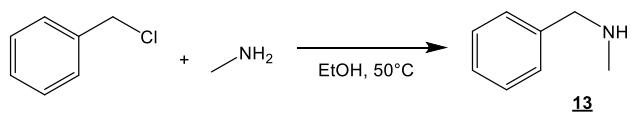
Benzaldehid smo raztopili v 10 ml absolutnega etanola, nato smo pri sobni temperaturi dodali metilamin in pustili mešati. Po 10 minutah smo dodali brezvodno ocetno kislino. Po

30 minutah smo dodali NaBH_3CN . Po 1 uri smo odnučali izpadlo oborino. Oborino smo raztopili v 20 ml nasičene raztopine NaHCO_3 . Nato smo jo prenesli v lij ločnik in ekstrahirali z 2×10 ml diklorometana. Organsko fazo smo nato ekstrahirali z 20 ml 0,1 M HCl , vodno fazo naalkalili s 3 ml 1 M NaOH in ponovno ekstrahirali z diklorometanom. Topilo smo uparili. Pri reakciji je nastal pretežno trisubstituirani amin.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Benzaldehid	1,00 ml	9,894	1
Metilamin	1,84 ml	14,842	1,5
Ocetna kislina	0,96 ml	16,820	1,7
NaBH_3CN	1,243 g	19,788	2

4.3.2 Sinteza N-metil-1-fenilmelanamina iz benzilklorida

REAKCIJA:



Benzilklorid smo raztopili v 5 ml absolutnega etanola in dodali metilamin. Reakcijo smo pustili pri 50°C teči čez noč. Nato smo uparili topilo, raztopili v 50 ml 0,1 M HCl in ekstrahirali z 2×50 ml diklorometana. Vodno fazo smo naalkalili z 10 ml 1 M NaOH in jo ponovno ekstrahirali z 2×50 ml diklorometana. Topilo smo uparili.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Benzilklorid	1,00 ml	8,674	1
Metilamin (33%)	5,40 ml	43,37	5

Kemijska formula: $\text{C}_8\text{H}_{11}\text{N}$

$\text{Rf}=0,38$ (DKM:MeOH: $\text{Et}_3\text{N}=9:1:0,1$)

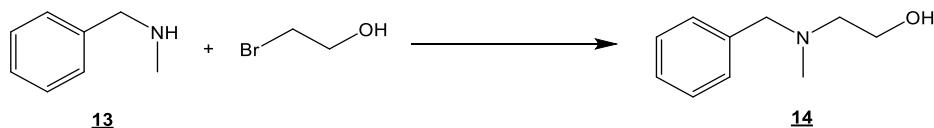
$\text{Mr}=121,18$

Izgled: Brezbarvna tekočina

$\eta=27,5\%$ (0,289 g)

4.3.3 Sinteza 2-(benzil(metil)amino)etan-1-ola

REAKCIJA:



Spojino 13 smo raztopili v 4 ml acetonitrila in dodali 2-bromoetanol, K-karbonat in benzilbutilamonijev klorid. Reakcijo smo pustili pri 50°C teči 2 dni. Nato smo najprej odfiltrirali K-karbonat, uparili acetonitril in raztopili v diklorometanu. Ekstrahirali smo z 2x10 ml 0,1 M HCl, vodno fazo naalkalili z 2 ml 10 M NaOH in ponovno ekstrahirali z 2x20 ml diklorometana. Organsko fazo smo posušili z Na₂SO₄ in uparili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri tem smo uporabili mobilno fazo DKM:MeOH:TEA=9:1:0,1.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina <u>13</u>	0,200 g	1,650	1
2-bromoetanol	0,175 ml	2,476	1,5
K-karbonat	0,228 g	1,650	1
Benzibutirlamonijev klorid	0,038 g	0,165	0,1

Kemijska formula: C₁₀H₁₅NO

Mr=165,24

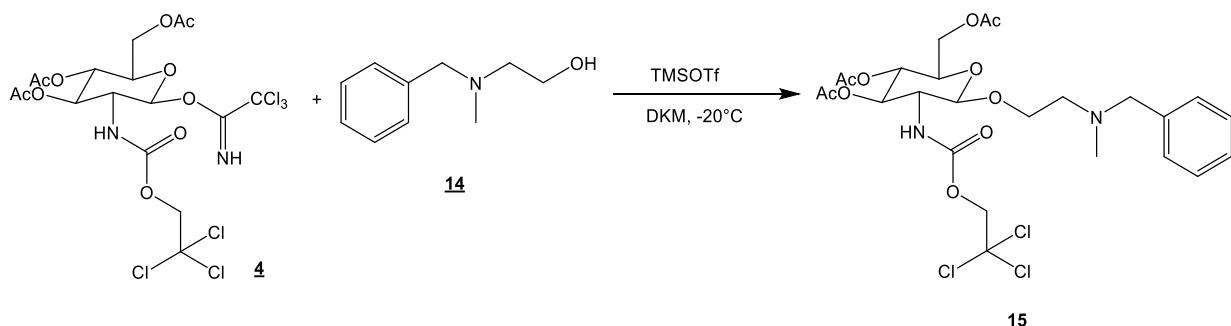
η=95,6% (0,261 g)

Rf=0,49 (DKM:MeOH:Et₃N=9:1:0,1)

Izgled: Rumenkasta tekočina

4.3.4 Poskus sinteze 1-(2-(benzil(metil)amino)etoksi)-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)- β -D-glukopiranoze

REAKCIJA:



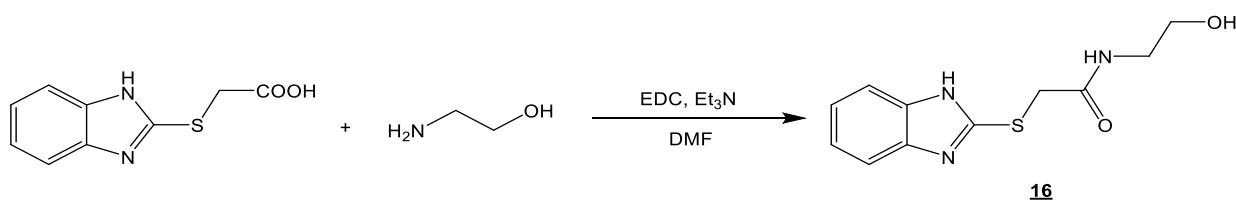
Spojino **4** smo pod argonovo atmosfero raztopili v 10 ml brezvodnega diklorometana in dodali spojino **14**. Ohladili smo na -20°C, nato dodali TMSOTf. Reakcijo smo pustili teči pri -20°C čez noč in nato še 2 uri pri sobni temperaturi. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 2,6 eq Et₃N in uparili topilo. Za ločevanje spojin iz reakcijske zmesi smo uporabili kolonsko kromatografijo, mobilna faza toluen:EtOAc=7:3. Reakcija ni potekla, nastal je predvsem stranski produkt trikloroacetamid.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 4	0,133 g	0,213	1,5
Spojina 14	0,023 g	0,142	1
TMSOTf	0,52 ml	0,284	0,5

4.4 SERIJA 3: GLIKOZIL AKCEPTORJI: BENZIMIDAZOLNI DERIVATI

4.4.1 Sinteza 2-((1H-benzoimidazol-2-il)tio)-N-(2-hidroksietil)acetamida

REAKCIJA:



2-((benzoimidazol-2-il)tio)ocetno kislino in aminoetanol smo pod argonovo atmosfero raztopili v 10 ml brezvodnega DMF in dodali Et₃N. Čez 10 min smo dodali EDC in pustili

reakcijo teči čez noč. Nato smo ekstrahirali z 2x20 ml DKM ter uparili vodno fazo. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo DKM:MeOH=9:1.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
2-((benzoimidazol-2-il)tio)ocetna kislina	0,300 g	1,441	1
Aminoetanol	0,11 ml	1,729	1,2
Et ₃ N	0,40 ml	2,882	2
EDC	0,291 g	1,873	1,3

Kemijska formula: C₁₁H₁₃N₃O₂S

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

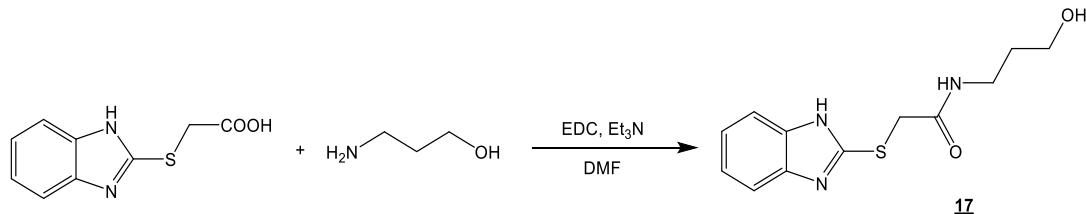
Mr=251,30

Izgled: Rumenkasta tekočina

η =19,1% (0,069 g)

4.4.2 Sinteza 2-((1H-benzoimidazol-2-il)tio)-N-(3-hidroksipropil)acetamida

REAKCIJA:



2-((benzoimidazol-2-il)tio)ocetno kislino in 3-amino-1-propanol smo pod argonovo atmosfero raztopili v 10 ml brezvodnega DMF in dodali Et₃N. Čez 10 min smo dodali še EDC in pustili reakcijo teči čez noč. Nato smo ekstrahirali z 2x20 ml DKM ter uparili vodno fazo. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo DKM:MeOH=9:1.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
2-((benzoimidazol-2-il)tio)ocetna kislina	0,500 g	2,401	1
3-amino-1-propanol	0,24 ml	2,881	1,2
Et ₃ N	0,67 ml	4,802	2
EDC	0,485 g	3,121	1,3

Kemijska formula: C₁₂H₁₅N₃O₂S

Rf=0,20 (DKM:MeOH=9:1)

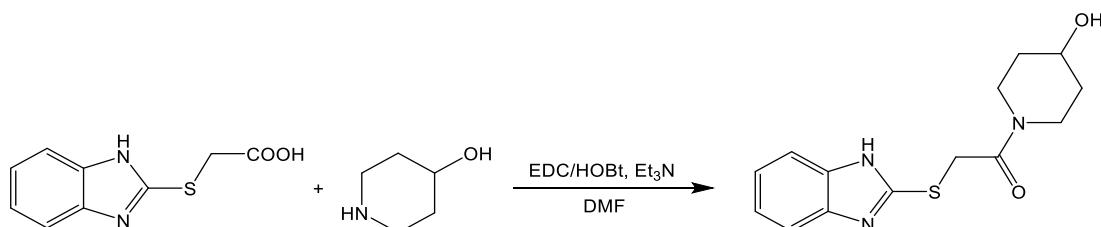
Mr=265,33

Izgled: Prozorna tekočina

η =8,3% (0,053 g)

4.4.3 Sinteza 2-((1H-benzoimidazol-2-il)tio)-1-(4-hidroksipiperidin-1-il)etan-1-ona

REAKCIJA:



18

2-((benzoimidazol-2-il)tio)acetna kislino in 4-aminocikloheksanol smo pod argonovo atmosfero raztopili v 10 ml brezvodnega DMF in dodali Et₃N. Čez 10 min smo dodali še EDC in HOBt ter pustili reakcijo teči čez noč. Naslednji dan smo odfiltrirali oborino, ki je nastala pri reakciji, prelili z vodo in odfiltrirali oborino, ki je nastala. Nato smo izvedli ekstrakcijo tako, da smo produkt raztopili v diklorometanu in ekstrahirali z 2x20 ml vode ter očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo DKM:MeOH=9:1.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
2-((benzoimidazol-2-il)tio)acetna kislina	0,500 g	2,401	1
4-aminocikloheksanol	0,364 g	2,401	1
Et ₃ N	1,34 ml	9,604	4
EDC	0,441 g	3,121	1,3
HOBt	0,485 g	2,881	1,2

Kemijska formula: C₁₄H₁₇N₃O₂S

Rf=0,26 (DKM:MeOH=9:1)

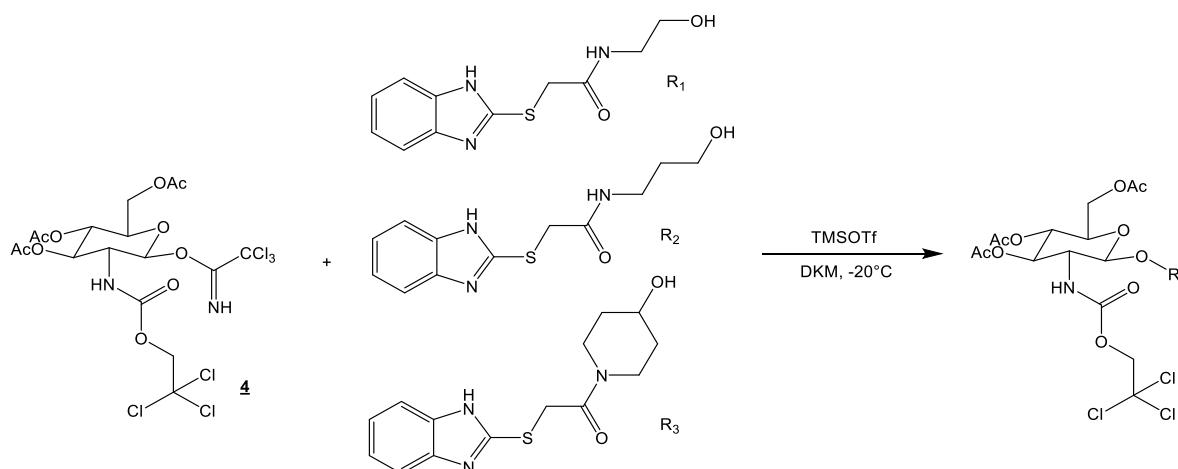
Mr=291,37

Izgled: Rjavo-rdeča tekočina

η =14,7% (0,103 g)

4.4.4 Poskus glikozilacije z benzimidazolnimi glikozil akceptorji

REAKCIJA



Spojino **4** smo pod argonovo atmosfero raztopili v brezvodnem diklorometanu in dodali spojino **16**, **17** ali **18**. Ohladili smo na -20°C, nato dodali TMSOTf. Reakcijo smo pustili teči pri -20°C čez noč in nato še 3 ure pri sobni temperaturi. Reakcijo smo ustavili z dodatkom Et₃N in uparili topilo. Spojine iz reakcijske zmesi smo ločili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo toluen:EtOAc=7:3. Reakcije niso potekle, nastal je predvsem stranski produkt trikloroacetamid.

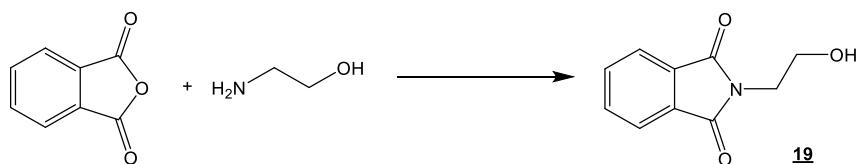
Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 4	0,257 g	0,412	1,5
Spojina R1	0,069 g	0,275	1
TMSOTf	0,025 ml	0,138	0,5

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 4	0,187 g	0,300	1,5
Spojina R2	0,053 g	0,200	1
TMSOTf	0,018 ml	0,100	0,5

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 4	0,316 g	0,510	1,5
Spojina R3	0,103 g	0,337	1
TMSOTf	0,031 ml	0,170	0,5

4.5 SERIJA 4: GLIKOZIL AKCEPTORJI: FTALIMIDNI DERIVATI

4.5.1 Sinteza 2-(2-hidroksiethyl)isoindolin-1,3-diona REAKCIJA:



V bučko smo natehtali ftalanhidrid in dodali aminoetanol. Nato smo segrevali 5 min na 120°C. Ko se je reakcijska zmes ohladila, smo odnučali izpadlo oborino in sprali z vodo. Produkt smo prekristalizirali iz petroleter:kloroform=1:1.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Ftalanhidrid	0,500 g	3,376	1
Aminoetanol	0,286 ml	3,376	1

Kemijska formula: C₁₀H₉NO₃

Rf=0,51 (DKM:MeOH=9:1)

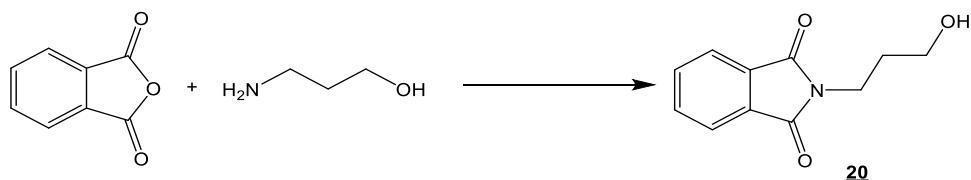
Mr=191,19

Izgled: Beli kristali

η=46,5% (0,300 g)

T_{tal}=110-112°C

4.5.2 Sinteza 2-(3-hidroksipropil)isoindolin-1,3-diona REAKCIJA:



V bučko smo natehtali ftalanhidrid in dodali 3-amino-1-propanol. Nato smo segrevali 5 min na 120°C. Ko se je reakcijska zmes ohladila, smo odnučali izpadlo oborino in sprali z vodo. Produkt smo prekristalizirali iz petroleter:etilacetat=2:1.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Ftalanhidrid	0,500 g	3,376	1
3-amino-1-propanol	0,204 ml	3,376	1

Kemijska formula: C₁₁H₁₁NO₃

Rf=0,52 (DKM:MeOH=9:1)

Mr=205,21

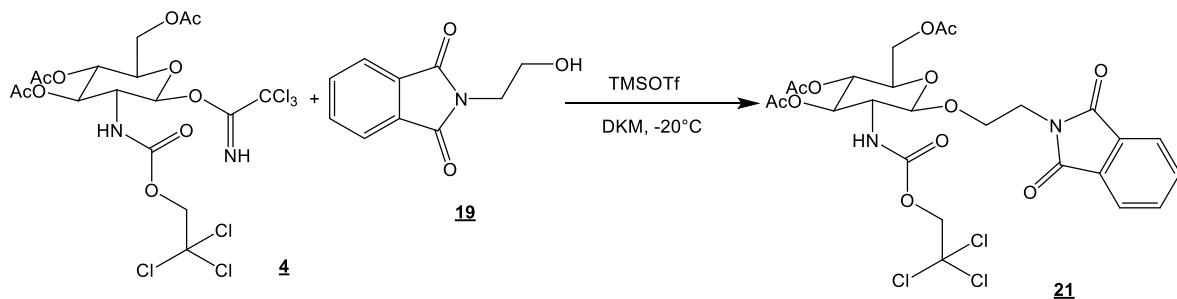
Izgled: Beli kristali

η =54,9% (0,380 g)

T_{tal}=59-61°C

4.5.3 Sinteza 1-(2-(1,3-dioksoisoindolin-2-il)etoksi)-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)-β-D-glukopiranoze

REAKCIJA:



Spojino **4** smo pod argonovo atmosfero raztopili v 5 ml brezvodnega diklorometana in dodali spojino **19**. Ohladili smo na -20°C, nato dodali TMSOTf. Reakcijo smo pustili teči pri -20°C čez noč. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 2,6 eq Et₃N in uparili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo DKM:MeOH=9:1.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 4	0,294 g	0,471	1,5
Spojina 19	0,060 g	0,314	1
TMSOTf	0,017 ml	0,094	0,3

Kemijska formula: C₂₅H₂₇Cl₃N₂O₁₂

Rf=0,73 (DKM:MeOH=9:1)

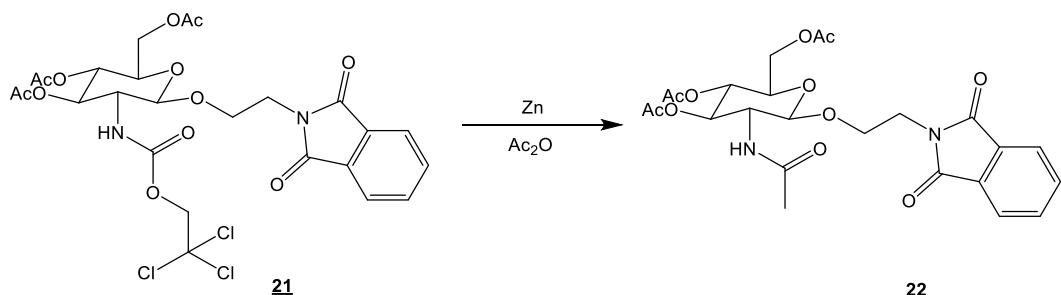
Mr=653,84

Izgled: Prozorna smola

η =90,3% (0,185 g)

4.5.4 Sinteza 1-(2-(1,3-dioksoisoindolin-2-il)etoksi)-3,4,6-tri-O-acetyl-2-deoksi-2-acetamido- β -D-glukopiranoze

REAKCIJA:



Spojino **21** smo raztopili v 5 ml acetanhidrida in dodali 0,5 g sveže aktiviranega Zn. Reakcijo smo pri sobni temperaturi pustili teči čez noč. Nato smo odfiltrirali Zn, sprali z metanolom in uparili topilo. Izvedli smo ločbo s kolonsko kromatografijo, pri čemer so uporabili mobilno fazo DKM:MeOH=9:1.

Kemijska formula: C₂₄H₂₈N₂O₁₁

Rf=0,31 (DKM:MeOH=9:1)

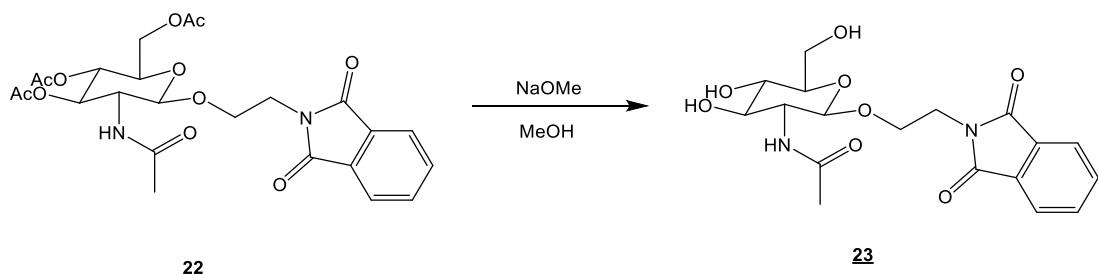
Mr=520,49

Izgled: Prozorna smola

η =69,1% (0,153 g)

4.5.5 Sinteza 1-(2-(1,3-dioksoisoindolin-2-il)etoksi)-2-deoksi-2-acetamido- β -D-glukopiranoze

REAKCIJA:



Spojino **22** smo pod argonovo atmosfero raztopili v 10 ml brezvodnega metanola in pri sobni temperaturi dodali NaOMe. Reakcijo smo pustili teči čez noč pri sobni temperaturi. Nato smo reakcijo ustavili z dodatkom ionskoizmenjevalne smole Amberlite® IR120. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo kloroform:MeOH=5:1.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 22	0,153 g	0,296	1
NaOMe	0,011 ml	0,059	0,2

Kemijska formula: C₁₈H₂₂N₂O₈

$\eta=59,7\%$ (0,070 g)

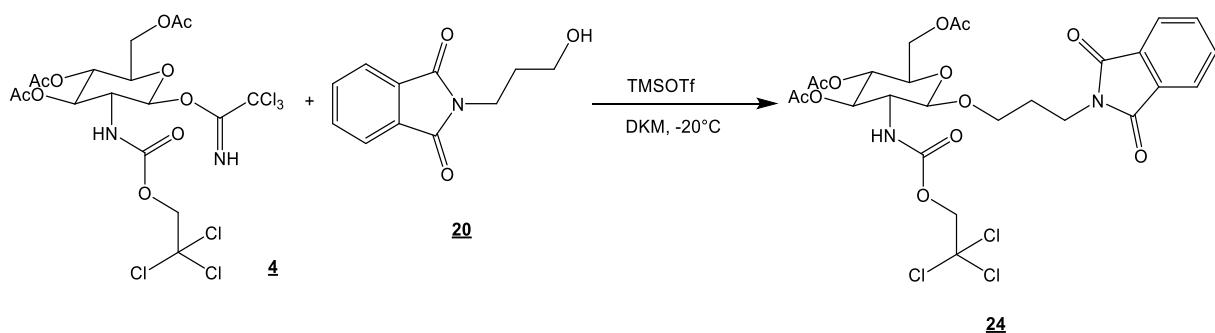
Mr=394,38

Rf=0,38 (kloroform:MeOH=5:1)

Izgled: Prozorna smola

4.5.6 Sinteza 1- (3-(1,3-dioxoisoindolin-2-il)propoksi) -3,4,6-tri-O-acetil-2-deoksi-2-(2,2,2-trikloroetoksikarbonilamino)-β-D-glukopiranoze

REAKCIJA:



Spojino **4** smo pod argonovo atmosfero raztopili v 5 ml brezvodnega diklorometana in dodali spojino **20**. Ohladili smo na -20°C, nato dodali TMSOTf. Reakcijo smo pustili teči pri -20°C čez noč. Reakcijo smo ustavili z dodatkom 2,6 eq Et₃N in uparili topilo. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo DKM:MeOH=9:1.

Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 4	0,274 g	0,439	1,5
Spojina 20	0,060 g	0,292	1
TMSOTf	0,016 ml	0,088	0,3

Kemijska formula: C₂₆H₂₉Cl₃N₂O₁₂

Rf=0,76 (DKM:MeOH=9:1)

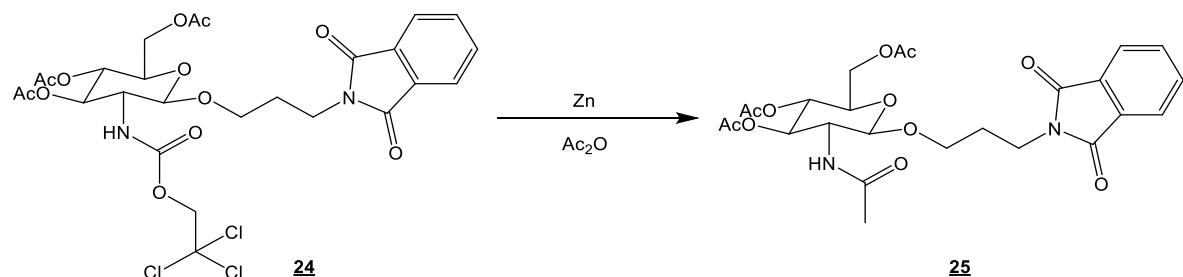
Mr=667,87

Izgled: Prozorna smola

$\eta=88,7\%$ (0,173 g)

4.5.7 Sinteza 1- (3-(1,3-dioksoisoindolin-2-il)propoksi) -3,4,6-tri-O-acetil-2-deoksi-2-acetamido- β -D-glukopiranoze

REAKCIJA:



Spojino **24** smo raztopili v 5 ml acetanhidrida in dodali 0,5 g sveže aktiviranega Zn. Reakcijo smo pri sobni temperaturi pustili teči čez noč. Nato smo odfiltrirali Zn, sprali z metanolom in uparili topilo. Izvedli smo ločbo s kolonsko kromatografijo, pri čemer so najprej uporabili mobilno fazo DKM:MeOH=9:1.

Kemijska formula: C₂₅H₃₀N₂O₁₁

Rf=0,29 (DKM:MeOH=9:1)

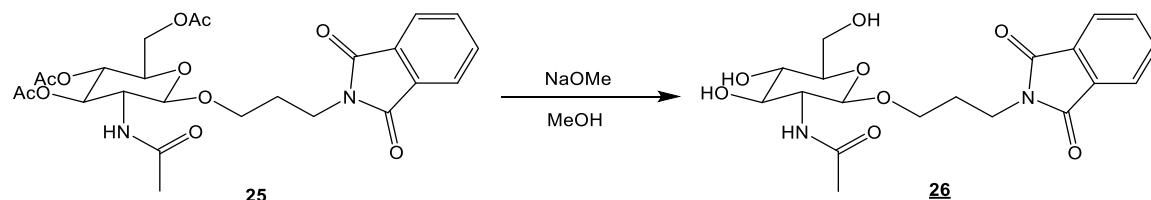
Mr=534,52

Izgled: Prozorna smola

η =76,6% (0,106 g)

4.5.8 Sinteza 1-(3-(1,3-dioksoisoindolin-2-il)propoksi)-2-deoksi-2-acetamido- β -D-glukopiranoze

REAKCIJA:



Reagent	Masa/volumen	n (mmol)	Eq
Spojina 25	0,106 g	0,197	1
NaOMe	0,007 ml	0,040	0,2

Spojino **25** smo pod argonovo atmosfero raztopili v 10 ml brezvodnega MeOH in pri sobni temperaturi dodali NaOMe. Reakcijo smo pustili teči čez noč pri sobni temperaturi. Nato smo reakcijo ustavili z dodatkom ionskoizmenjevalne smole Amberlite® IR120. Spojino

smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri čemer smo uporabili mobilno fazo kloroform:MeOH=5:1.

Kemijska formula: C₁₉H₂₄N₂O₈

Rf=0,24 (kloroform:MeOH=5:1)

Mr=408,41

Izgled: Prozorna smola

η =69,6% (0,056 g)

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 RAZPRAVA K UVEDBI N-ZAŠČITNE SKUPINE

Sinteza β -glikozidov 2-acetamido-2-deoksi sladkorjev običajno zahteva uporabo zaščitne skupine na amino skupini glikozil donorja. Namreč četudi je *N*-acetil-D-glukozamin dostopen iz naravnih virov, se v takšni obliki pri glikozilaciji praktično ne more uporabljati, saj se tvori 1,2-O,N-oksazolinski intermediat, ki je precej stabilen in močno zmanjša hitrost in izkoristek glikozilacije, zlasti če je glikozil akceptor šibek nukleofil ali pa je sterično oviran, mehanizem je prikazan na sliki 15. (29) Ena od možnosti, kako rešiti ta problem, je uporaba disubstituiranega 2-amino-2-deoxsiglikozilnega donorja. V tem primeru se tvori nestabilni oksazolinski derivat. (29)



Slika 15: Glikozilacija z *N*-acetilglukozaminom. Povzeto po (29).

Druga opcija pa je uporaba specifičnih zaščitnih skupin. Možnosti za izbiro zaščitne skupine je kar precej, izbira zaščitne skupine pa lahko odločilno vpliva na nadaljnji potek sinteze. Med najpogosteje uporabljenimi zaščitnimi skupinami so *N*-ftalimidi, *N*-trikloroetoksikarbonilna skupina, *N*-trikloroacetilna skupina, *N*-alliloksikarbonilna skupina in *N*-karboksibenzilna skupina. Za enak namen se lahko uporabljam tudi azidi, ki sicer niso zaščitna, temveč maskirna skupina. (29, 30)

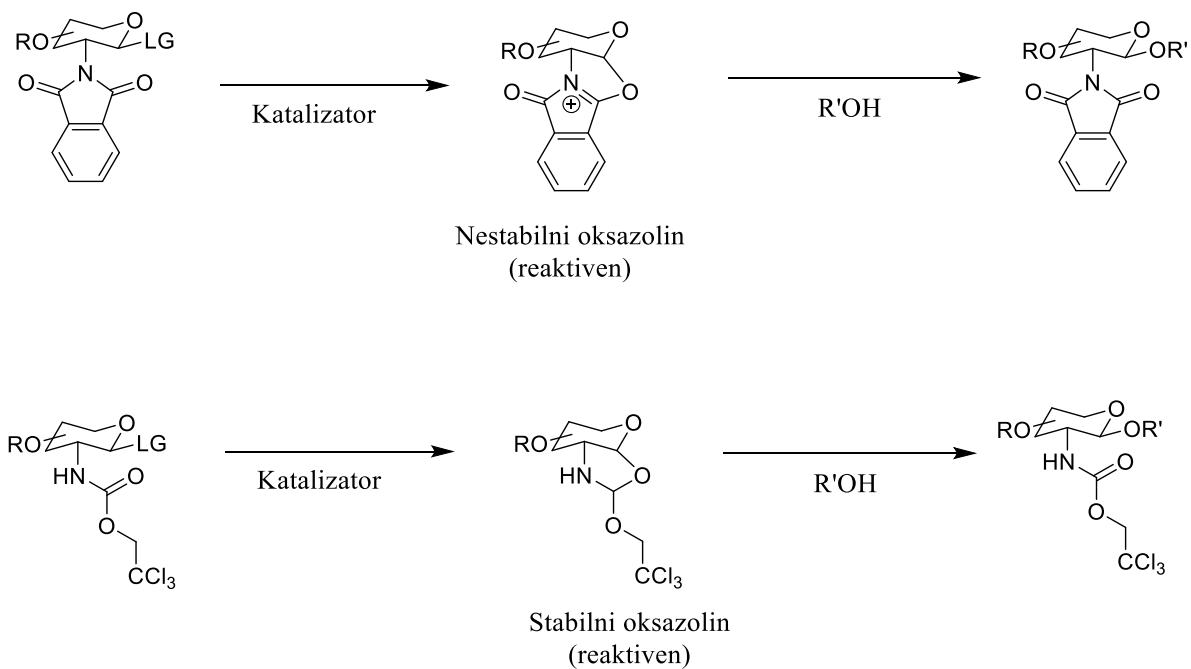
Vsaka od naštetih zaščitnih skupin ima svoje prednosti in slabosti. Tako je *N*-ftalimidna zaščita na primer zelo primerna za sintezo 1,2-trans- β -glikozidov, uvede se jo dokaj enostavno (glukozamin zreagira s ftalanhidridom pod bazičnimi pogoji), težave pa lahko nastanejo pri odščiti ftalimida, za katero so potrebni precej ostri pogoji, poteka namreč v močno bazičnih pogojih pri visoki temperaturi (29) ali s hidrazinom (močnim nukleofilom), zato za našo sintezo ni bila primerna. Azidi so kot maskirna skupina zelo primerni za reakcije glikozidov, enostavno jih tudi reduciramo do amino skupine s katalitičnim hidrogeniranjem.

(29) Težava pa je, da kadar so prisotne CC dvojne vezi ali benzilne skupine, bodo le-te prav tako podvržene redukciji, zato je prav tako nismo mogli izbrati.

Poleg pogojev zaščite in odščite, se zaščitne skupine med seboj razlikujejo tudi glede na to koliko povečajo nukleofilnost glikozil donorja. Pri tem velja vrstni red azidi>N-Troc>N-ftalimidi>N-acetil. (29, 31)

Mi smo se odločili uporabiti trikloroetyl kloroformatno (N-Troc) zaščitno skupino. Ta zaščitna skupina poveča učinkovitost glikozilacije, in sicer je glukozamin, ki je zaščiten z N-Troc zaščitno skupino kar 33,7x bolj reaktiv v nasprotju z glukozamino, ki je zaščiten z N-ftalimidno skupino. N-Troc zaščitna skupina ima namreč močne elektron-akceptorske lastnosti in zato poveča učinkovitost tvorbe 1,2-trans-glikozidov. (33)

Kot prikazuje slika 16, N-Troc zaščitna skupina sicer v nasprotju z na primer N-ftalimidi, azidi ali diacetiliranim aminom ne preprečuje tvorbe stabilnega oksazolina, vendar pa je ta reaktiv. (34)



Slika 16: Nastanek stabilnega in nestabilnega oksazolina pri glikozilaciji. Povzeto po (34).

Uvedba N-Troc zaščitne skupine je precej enostavna, poteče po mehanizmu adicije s sledečo eliminacijo. Reakcijo izvajamo v bazičnem mediju (dodamo NaHCO_3), da zagotovimo, da je aminska skupina v neprotonirani obliki in ima zato dobre nukleofilne lastnosti. Baza mora biti v prebitku, saj pri reakciji nastaja HCl , ki delno nevtralizira NaHCO_3 . Pri reakciji

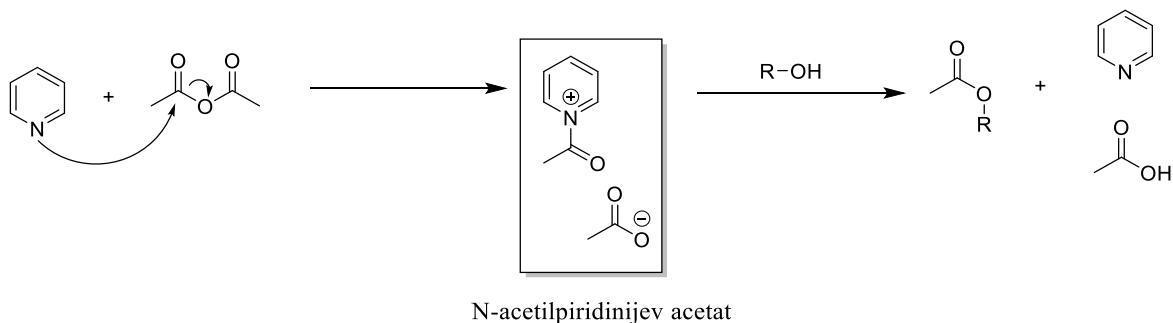
nevtralizacije nastaja CO_2 , zato smo morali biti pozorni, da smo reakcijo izvajali v dovolj veliki bučki, saj se je reakcijska zmes zelo penila. Prebitek NaHCO_3 nevtraliziramo s HCl , na ta način tudi ustavimo reakcijo. Ker produkt ni topen v vodi, smo ga po končani reakciji preprosto odnučali. Kot dodatno čiščenje smo izvedli še prekristalizacijo iz etanola, četudi v literaturi večinoma ni navedena. Po prekristalizaciji sicer nismo opazili bistvenih sprememb v NMR spektru, zato sklepamo, da za nadaljnji potek sinteze ni nujna.

Uvedba Troc zaščitne skupine na aminsko skupino je zelo selektivna tudi v prisotnosti hidroksilnih skupin, saj je aminska skupina močnejši nukleofil. Prav tako je specifična tudi odščita N-Troc začite, odstrani se jo namreč s specifičnimi pogoji Zn/AcOH , pri uporabi $\text{Zn}/\text{Ac}_2\text{O}$, pa se aminska skupina tudi direktno acetilira. N-Troc zaščitna skupina je sicer stabilna je v široki množici različnih pogojev, ki se uporablajo pri sintezi ogljikovih hidratov, kot so pogoji Sarett in Jonesove oksidacije, dioksan/ HCl ali trifluoroacetna kislina pri sobni temperaturi. N-Troc zaščitna skupina pa ni stabilna pri pogojih katalitične hidrogenolize. (35)

5.2 RAZPRAVA K UVEDBI O-ZAŠČITNE SKUPINE

Z zaščito hidroksilnih skupin smo želeli doseči regioselektivnost glikozilacije. Odločili smo se za uporabo acetatnih estrov kot zaščitne skupine, ki se jih načeloma enostavno uvede in se jih prav tako enostavno odstrani v bazičnem mediju.

Mehanizem acetiliranja poteka tako, da najprej dušik iz piridina napade karbonilno skupino acetanhidrida, tvori se N-acetylpiridinijev klorid, ki nadalje dejansko deluje kot reagent za acetiliranje OH skupin sladkorja, kot to prikazuje slika 17. (30) Reakcija mora teči pri brezvodnih pogojih, sicer bi iz acetanhidrida nastala ocetna kislina, ki pa ne more acetilirati OH skupin. Zato je zelo pomembno, da produkt po reakciji začite s Troc, ki jo izvajamo v vodi, dobro posušimo.



Slika 17: Mehanizem acetiliranja. Povzeto po (30).

Slošni postopek uvedbe acetatov načeloma poteka tako, da se pri sobni temperaturi sladkor raztopi v brezvodnem piridinu (10 ml na 1 g sladkorja) in se doda acetanhidrid (2 ekvivalenta na OH skupino). (30) Četudi je reakcija opisana v literaturi (28), smo pri izvajanju te stopnje sinteze naleteli na nemalo težav, saj so se tako v ^1H kot tudi ^{13}C NMR spektru spojin pojavljali signali za dodatne acetate, nadalje takšne spojine tudi niso tvorile želenega trikloroacetimidatnega produkta.

Preizkušali smo različne pogoje: manj ekvivalentov acetanhidrida, počasno dodajanje acetanhidrida, znižanje temperature. Najprej smo ugotovili, da moramo dodati vsaj 5 ekvivalentov acetanhidrida, da reakcija sploh poteka, vendar število acetatnih vrhov v NMR spektru še vedno ni ustrezalo. Prav tako na to ne vplivata temperatura, pri kateri poteka reakcija, in spremembe v hitrosti dodajanja acetanhidrida. Nazadnje smo ugotovili, da reakcija poteče, kot smo želeli, če jo izvajamo v brezvodnem polarnem topilu, kot je DMF, in dodamo 5 ekvivalentov acetanhidrida in 3 ekvivalente piridina. Ob dodatku manjše količine acetanhidrida in piridina reakcija ni potekla do konca. Reakcija poteka precej počasi (3 dni pri sobni temperaturi), vendar je izkoristek reakcije dober in produkt po ekstrakciji precej čist.

Ker je reakcija potekla do konca in nismo več zaznali izhodne spojine v reakcijski zmesi in ker ni prihajalo do tvorbe stranskih produktov, smo produkt očistili zgolj z ekstrakcijo, kolonska kromatografija ni bila potrebna. Glavni nečistoti, ki smo ju želeli ločiti od našega produkta sta bili piridin in acetanhidrid oziroma ocetna kislina, ki je nastala iz njega. Piridina iz reakcijske zmesi smo se znebili pri čiščenju tako, da smo reakcijsko zmes ekstrahirali z 0,1 M HCl, pri tem se je tvorila sol piridinijev klorid, ki je prešel v organsko fazo, zaradi morebitnih zaostankov pa smo še koevaporirali s toluenom, le-ta namreč s piridinom tvori azeotrop. Acetanhidrid in ocetna kislina pa sta prešla v vodno fazo pri ekstrakciji z vodo oziroma z raztopino NaHCO_3 .

V procesu sinteze glikozil donorja smo poskusili tudi z uvedbo benzoatov kot zaščitne skupine. Mehanizem poteka reakcije temelji na enakem principu kot pri acetiliranju. Vendar pa nato reakcija selektivne odščite anomerne skupine ni želela poteči. V splošnem velja, da je benzoate težje odščititi kot acetate, zato smo tudi zaradi morebitnih težav pri nadaljnji sintezi to sintezno pot opustili.

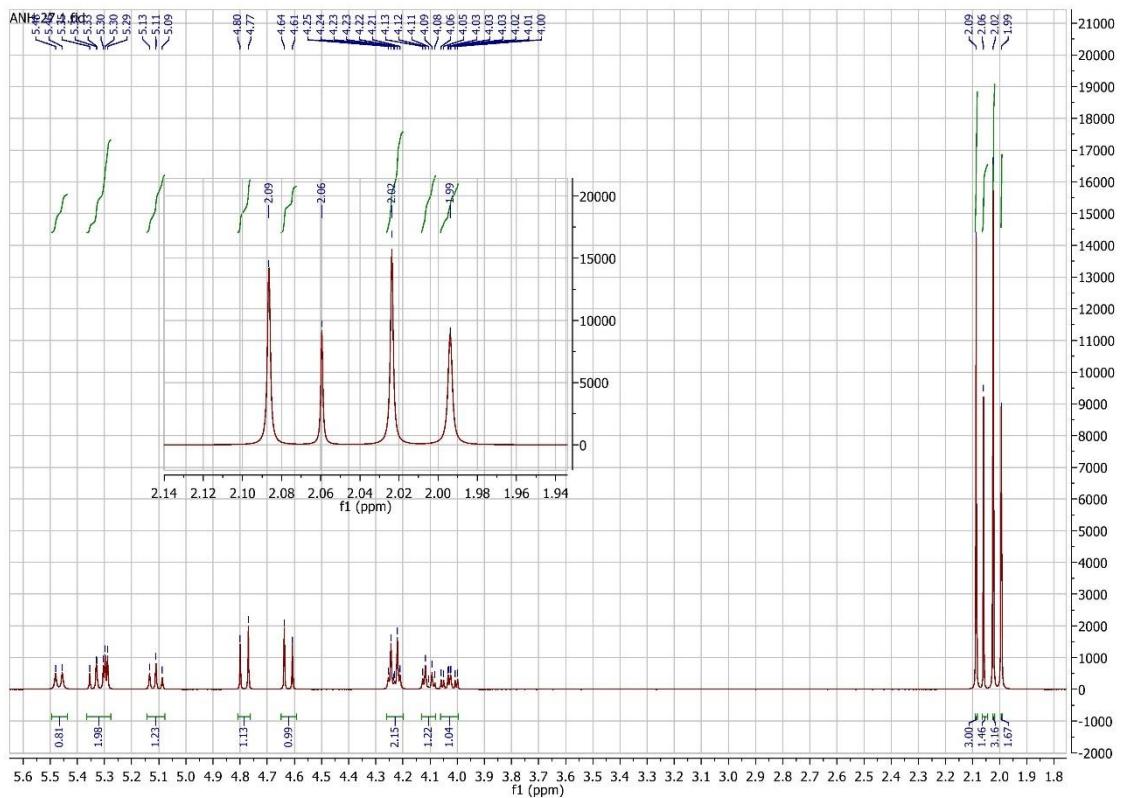
5.3 RAZPRAVA K ODŠČITI ANOMERNE SKUPINE

Deacetiliranje anomerne OH skupine je stopnja, ki sledi zaščiti hidroksilnih skupin v sladkorju in ki omogoča regioselektivnost glikozilacije, oziroma še pred tem tvorbo trikloroacetimidatnega glikozil donorja. Reducirajoči sladkorji, ki nastanejo, so pomembni intermediati v sintezi glikozil donorjev, zlasti pri pripravi glikozil trikloroacetimidata.

Uporabi se lahko 1 ekvivalent hidrazin acetata ali hidrazin hidrata v DMF. Možna je tudi zamenjava hidrazina s piperidinom ali aminoetanolom ali pa uporaba mešanice etilendiamina in ocetne kisline v THF. (30)

Težava pri anomernem deacetiliranju je lahko, da le-to ne poteče selektivno, zlasti če uporabimo sam hidrazin hidrat. Ker je reakcija s hidrazin acetatom potekala kar dolgo časa, smo zato preizkusili tudi postopek s samim hidrazin hidratom, ki se je izkazal tudi za primernejšega s stališča naslednje reakcije, to je tvorbe glikozil trikloroacetimidata. V tej stopnji namreč uporabimo kot katalizator DBU, ki je baza, ostanki ocetne kisline v reakcijski zmesi pa bi ga nevtralizirali.

V NMR spektru smo opazili zanimiv pojav, eden od signalov za acetate se je razcepil, kar je razvidno iz slike 18.



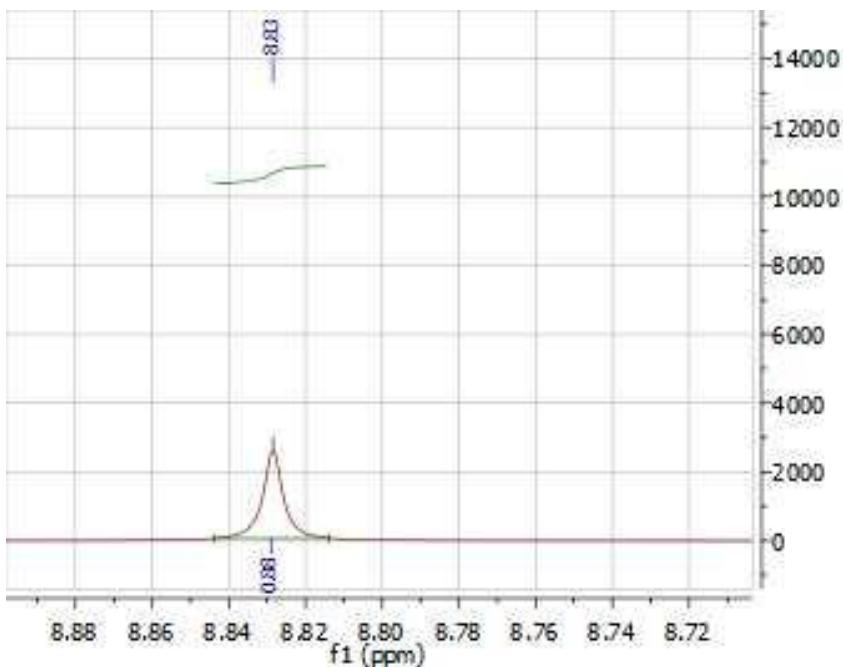
Slika 18: NMR spekter na anomernem ogljiku deacetiliranega produkta

5.4 RAZPRAVA K SINTEZI GLIKOZIL TRIKLOROACETIMIDATA

Namen te reakcije je tvoriti reaktivni glikozil donor. Trikloroacetimidatna skupina je dobra izstopajoča skupina, s pomočjo katere lahko tvorimo glikozil donor, ki ga aktiviramo z Lewisovo kislino (npr. $\text{BF}_3 \times \text{Et}_2\text{O}$ ali TMSOTf).

Uvedba trikloroacetimidatne skupine na prosto anomerno OH skupino poteka z dodatkom baze (uporabimo lahko K_2CO_3 , NaH ali DBU). Ob dodatku baze nastane anomerni oksianion, ki se veže na trojno vez trikloroacetonitrila. (30)

Trikloroacetatni produkt v NMR spektru zelo jasno prepoznamo po signalu NH skupine trikloroacetimidata pri 8,8 ppm, kar je prikazano na sliki 19.



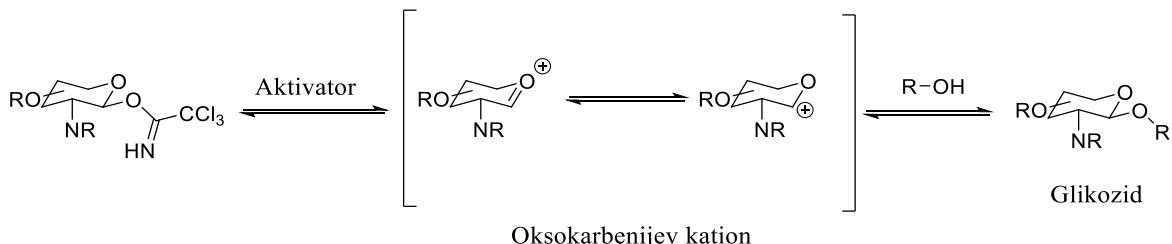
Slika 19: Signal za trikloroacetimidat v NMR spektru

Pomembno je, da trikloroacetimidatni produkt shranjujemo pri nizki temperaturi, saj lahko sicer pride do dekompozicije produkta.

5.5 RAZPRAVA H GLIKOZILACIJI

Odločili smo se za glikozilacijo s trikloroacetimidatno metodo. Prednost te metode je, da O-glikozilni trikloroacetimidati delujejo kot močni glikozil donorji ob relativno milih pogojih katalize. Običajen potek reakcije glikozilacije po tej metodi je, da glikozil donor in glikozil akceptor raztopimo v inertnem topilu (običajno diklorometan ali acetonitril), nato pa se doda katalitično količino Lewisove kisline. (30)

Mehanizem reakcije poteka tako, da glikozil donor najprej reagira z aktivatorjem, Lewisovo kislino. Mi smo kot Lewisovo kislino uporabili TMSOTf, možno pa bi bilo uporabiti tudi na primer $\text{BF}_3\text{xEt}_2\text{O}$, $\text{Sn}(\text{OTf})_2$, AgOTf ali $\text{ZnCl}_2\text{xEt}_2\text{O}$. (36) Pri reakciji glikozil donorja in Lewisove kisline se tvori aktivirana zvrst-oksokarbonijev ion, čemur sledi disociacija izstopajoče skupine in zamenjava le-te z glikozil akceptorjem. Lewisova kislina se tekom reakcije regenerira, glikozil donor se ob reakciji z Lewisovo kislino namreč poveže z dušikom izstopajoče imidoilne skupine, kar vodi v tvorbo trikloroacetamida, katerega bazičnost je manjša kot tista od imidata, zato se Lewisova kislina sprosti in je na voljo za naslednji cikel katalize. (37) Mehanizem glikozilacije je prikazan na sliki 20.



Slika 20: Mehanizem glikozilacije. Povzeto po (37).

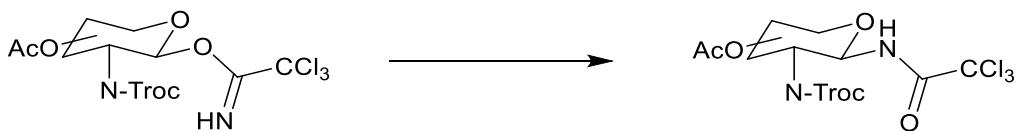
Pri reakciji glikozilacije smo naleteli na kar nekaj težav, zaradi česar smo morali nekajkrat spremeniti sintezni načrt. Najprej smo izvedli modelno reakcijo z benzilnim alkoholom, da smo določili pogoje reakcije. Ugotovili smo, da je potrebno reakcijo izvajati pri zelo nizki temperaturi (-20°C), saj je sicer prihajalo do fragmentacije. Prav tako smo titrirali potrebno količino Lewisove kisline, ugotovili smo, da je pri benzilnem alkoholu to 0,5 eq. Pri večji količini Lewisove kisline je namreč nastalo preveč stranskega produkta. Ugotovili smo tudi, da je bolje uporabiti glikozil donor v prebitku glede na glikozil akceptor in glede na literaturne podatke smo uporabili 1,5-kratni prebitek. Različni pogoji, pri katerih smo izvajali reakcijo glikozilacije, so navedeni v tabeli II.

Tabela II: Poskusi glikozilacije

Razmerje glikozil donor : glikozil akceptor	Eq TMSOTf	Temperatura
1:1,2	1,3	0°C → RT
1:1	0,1 → 0,5	RT
1,5:1	0,3 do 0,5	-20°C

Težava pri reakciji glikozilacije so lahko preveč reaktivni glikozil donorji, pri katerih lahko pride do stranskih reakcij ali pa razpada glikozil donorja preden le-ta reagira z glikozil akceptorjem, kar znatno zmanjša izkoristek reakcije. Kadar je glikozil akceptor zelo nereaktiv, pa se lahko glikozil donor preuredi iz trikloroacetimida v trikloroacetamid, ki pa ni dobra izstopajoča skupina. Nastanek tega produkta je prikazan na sliki 21. S takšno težavo smo se srečali tudi pri naših reakcijah, pri glikozilaciji je namreč nastalo precej stranskega produkta. To težavo smo nekoliko omejili z uporabo manjših količin TMSOTf. Pri glikozilaciji s ftalimidnimi glikozil akceptorji smo zato uporabili le 0,3 eq TMSOTf. Pri

benzilnem alkoholu smo morali uporabiti nekoliko večjo količino, ker je reakcija zaradi steričnih ovir težje potekala.



Slika 21: Nastanek stranskega produkta, nereaktivnega trikloroacetamida

S prvotno zamišljenimi glikozil akceptorji, ki bi bili sestavljeni iz distančnika, kationskega centra in lipofilnega dela, glikozilacija ni potekala. Predvidevamo, da je vzrok za to kationski center v obliki terciarnega amina, le-ta namreč zaustavlja reakcijo na enak način kot Et₃N, ki ga uporabimo po končni reakciji za nevraliziranje Lewisove kisline. Nadalje smo si zamislili benzimidazolne glikozil akceptorje, s katerimi pa reakcija glikozilacije prav tako ni uspešno potekla. Tudi tu predvidevamo, da je vzrok bazičnost glikozil akceptorja, saj je benzimidazol rahlo bazičen.

5.5.1 RAZMISLEK K DRUGAČNEMU PRISTOPU H GLIKOZILACIJI

Glede na to, da smo ugotovili, da glikozilacija z glikozil akceptorji, ki v svoji strukturi vsebujejo kakšen bazični center, ne poteka, bi bilo smiselno razmisiliti tudi o drugačnem pristopu h glikozilaciji. Ena možnost je, da najprej izvedemo glikozilacijo z aminoalkoholom (distančnik), ki ima ustrezno zaščiteno amino skupino, nato pa odščitimo amino skupino in pripnemo preostali aglikonski del s »coupling« reakcijo npr. po EDC/HOBt metodi. Najbolj kritična točka tega pristopa je izbira ustrezne N-zaščitne skupine, pozorni moramo namreč biti, da je ta zaščitna skupina stabilna pri pogojih glikozilacije-t.j. v prisotnosti kisline in da obenem pogoji odščite takšne zaščitne skupine ne vplivajo na N-Troc zaščitno skupino. Tako npr. ne moremo uporabiti Boc zaščitne skupine, ker le-ta ni stabilna v prisotnosti Lewisove kisline med glikozilacijo, ali pa Cbz zaščitne skupine, ker le-to odstranimo s katalitskim hidrogeniranjem, ki bi odščitilo tudi N-Troc zaščitno skupino.

Ena od možnosti za zaščitno skupino je uporaba trifluoroacetamidne zaščitne skupine, ki se jo lahko odščiti s K₂CO₃ v MeOH. Težava, ki jo sicer gre pričakovati pri tovrstnem pristopu, je intermolekularni napad proste amino skupine na acetatno skupino vezano na C-6 atom, zato bi bilo pomembno sintezo po odščiti amino skupine čim hitreje nadaljevati s coupling reakcijo, pričakovati pa bi bilo tudi nekoliko manjši izkoristek reakcije.

5.6 RAZPRAVA K SINTEZI GLIKOZIL AKCEPTORJEV, KI VSEBUJEJO TERCIARNI AMIN

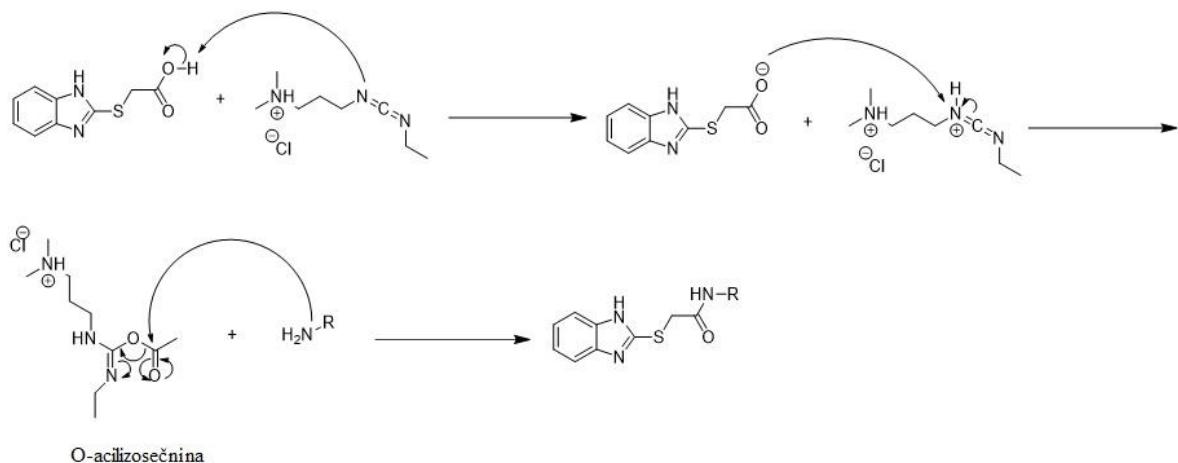
Glikozil akceptorje, ki vsebujejo terciarni amin, smo najprej skušali sintetizirati z metodo reduktivnega aminiranja iz benzaldehida in metilamina. Vendar pa se je pri tej reakciji pretežno tvoril N-benzil-N-metil-1-fenilmetanamin. Zato smo se raje odločili za sintezno pot iz benzilklorida in metilamina, pri tej reakciji nato nismo imeli težav, pomembno je predvsem, da dodamo vsaj 5x prebitek metilamina, na ta način zmanjšamo verjetnost, da bi se tvoril *N*-benzil-*N*-metil-1-fenilmetanamin. Čiščenje produkta smo izvedli tako, da smo ga najprej raztopili v kislem mediju (0,1 M HCl), s tem smo naš produkt pretvorili v obliko soli in je zato ostal v vodni fazi, medtem ko je morebitni nezreagirani benzilklorid prešel v organsko fazo. Nadalje pa smo vodno fazo naalkalili, s tem smo zmanjšali topnost produkta v vodni fazi in smo ga tako lahko ekstrahirali v organsko fazo. Prebitnega metilamina smo se znebili pri uparevanju topila, saj ima zelo nizko vrelische.

Končno strukturo glikozilakceptorja smo nato sintetizirali tako, da smo na spojino **13** pripeli bromoetanol. Pri tem smo morali za potek reakcije uporabiti benzilbutilamonijev klorid, ki je katalizator faznega prenosa. K-karbonat namreč ni topen v organskem topilu, kot je acetonitril, katalizator faznega prenosa pa omogoči prehajanje ionov tudi v organsko fazo. Pri reakciji je pomembno tudi, da uporabimo čim manj topila. Pri čiščenju smo uporabili podoben pristop, kot v prejšnji stopnji, pri čemer smo se zanašali na različno topnost aminov v kislem in bazičnem mediju. Ker pa produkt ni bil povsem čist, smo ga očistili še s kolonsko kromatografijo, pri tem smo morali v mobilno fazo dodati 0,1% Et₃N, saj sicer bazična spojina ne bi potovala po potovala po stacionarni fazi.

5.7 RAZPRAVA K SINTEZI BENZIMIDAZOLNIH GLIKOZIL AKCEPTORJEV

Za sintezo benzimidazolnih glikozil akceptorjev smo se odločili po neuspelem poskusu glikozilacije s spojinami, ki so v svoji strukturi vsebovale terciarni amin. Takšne strukture bi bile namreč prav tako kot prvotno načrtovani aglikonski del molekul sestavljene iz lipofilnega dela, ki bi tvoril potencialno interakcijo s tirozinskim aminokislinskim ostankom in pa omogočale tudi tvorbo vodikovih vezi s karboksilati v katalitičnem mestu encima AtLE. Benzimidazolne glikozil akceptorje smo najprej skušali tvoriti s standardno EDC/HOBt

metodo, vendar smo naleteli na težave pri čiščenju. Običajni postopek namreč vključuje ekstrakcijo nastalega produkta v organsko fazo, naše spojine pa so se izkazale za preveč hidrofilne in so ostajale v vodni fazi skupaj s HOBr, ki ga nismo uspeli ločiti od spojine niti s kolonsko kromatografijo. Produkt smo uspeli izolirati le pri spojni **18**, ki je nekoliko bolj lipofilna, vendar je bila izolacija zelo zapletena. Najprej smo odnudčali oborino, ki je nastala pri reakciji in je najverjetneje bila 3-(3-etylureido)-N,N-dimetilpropan-1-amonijev klorid, nato pa smo preostanek v bučki prelili z vodo in izpadla je oborina, naš produkt s primesmi, oborino smo nadalje raztopili v diklorometanu in ekstrahirali z vodo, nato pa izvedli še kolonsko kromatografijo, da smo dobili čist produkt.



Slika 22: Mehanizem skloplitvene reakcije z EDC

Poskusili smo z reakcijo s TBTU, vendar TBTU generira HOBr, zato smo naleteli na enake težave pri čiščenju. Reakcijo smo nato izvedli samo z EDC, mehanizem reakcije je prikazan na sliki 22. Čiščenje produkta je bilo zaradi nastanka stranskih produktov vseeno precej zapleteno, izkoristek pa zaradi izgub pri čiščenju manjši. Produkte smo namreč očistili tako, da smo najprej izvedli ekstrakcijo, nato pa vodno fazo očistili še s kolonsko kromatografijo. Pri ekstrakciji je kar nekaj produkta prešlo tudi v organsko fazo, nekaj pa je bilo tudi izgub med kolonsko kromatografijo, saj se posamezne spojine iz zmesi niso dobro ločevale.

5.8 RAZPRAVA K SINTEZI FTALIMIDNIH GLIKOZIL AKCEPTORJEV

Za sintezo ftalimidnih glikozil akceptorjev smo se odločili, ker smo ugotovili, da glikozilacija z bazičnimi glikozil akceptorji ni mogoča. Struktura ftalimidov nam omogoča, da kljub vsemu ciljamo na interakcije, ki smo jih želeli doseči z aglikonskim delom spojine,

obenem pa ne vsebujejo bazičnih centrov, zato je glikozilacija potekla brez težav. Pri sintezi ftalimidnih glikozil akceptorjev smo uporabili reakcijo, ki se sicer lahko uporablja za uvajanje ftalimidne zaščitne skupine na aminske funkcionalne skupine. Načinov kako lahko izvedemo to reakcijo je več, mi smo izbrali reakcijo med ftalanhidridom in aminom zaradi njene hitrosti, preprostosti in dobrega izkoristka. Posebnost te reakcije je, da smo jo izvajali brez topila, zgolj ob povišani temperaturi in poteče zelo hitro. Možnost za izvedbo je tudi s segrevanjem z mikrovalovi, vendar ker je reakcija dobro potekla že pri klasičnem segrevanju, se nam to ni zdelo potrebno. Pomembno pri poteku te reakcije pa je, da sta ftalanhidrid in amin v ekvimolarnem razmerju, sicer lahko nastane tudi N1,N2-bisubstituiran ftalamid.

5.9 RAZPRAVA K ODŠČITI TROC IN ACETILIRANJU AMINSKE SKUPINE

Troc zaščitno skupino smo odstranili s Zn v acetanhidridu, pri tem se je aminska skupina glukozamina tudi acetilirala. Druga možnost je sicer izvedba te reakcije s Zn v ocetni kislini in nato acetiliranje aminske skupine z acetanhidridom ob prisotnosti priridina, vendar pa je s stališča porabe reagentov in pa tudi časovno ta pot manj smiselna. Pomembno je, da pri reakciji uporabimo sveže aktiviran Zn, torej odstranimo plast ZnO. Zato smo Zn prah najprej dispergirali v HCl, nato pa sprali še s H₂O, absolutnim EtOH in dietiletrom. Pri tem smo morali biti pozorni, da smo postopek izvedli hitro in aktivirani Zn takoj uporabili, da je bil čim manj izpostavljen kisiku iz zraka. Po končani reakciji smo najprej odfiltrirali Zn in belo oborino, ki je nastala in je bila najverjetneje cinkov acetat. Ker ima acetanhidrid visoko vrelišče, smo pred uparevanjem dodali MeOH, ki je z acetanhidridom tvoril ester z nižjim vreliščem. Spojine smo dodatno očistili še s kolonsko kromatografijo. Pri tem smo v primerih spojin **8** in **11** najprej uporabili mobilno fazo toluen:EtOAc=7:3, v kateri naša spojina ni potovala po koloni, na ta način smo se znebili nezreagirane izhodne spojine, nato pa smo uporabili mobilno fazo DKM:MeOH=9:1, s katero smo sprali spojino s kolone.

5.10 RAZPRAVA K ODŠČITI ACETATOV PO ZEMPLENOVEM POSTOPKU

Reakcija odščite acetatnih estrov po Zemplenovem postopku je bila zadnja stopnja sinteze glikomimetikov. Pri spojini **9** smo na TLC zaznali, da je prišlo do tvorbe večih produktov, nismo pa uspeli dobiti želenega produkta kljub temu, da smo reakcijo dvakrat ponovili. V splošnem velja, da mehanizem odščite po Zemplenu poteka tako, da metoksidni anion kot nukleofil napade karbonil, pri tem se tvori metilni ester. Nato alkoholatni anion odtegne proton iz metanola, na ta način se metoksidni anion regenerira. Nukleofilni napad pa je lahko otežen zaradi steričnih ovir. V literaturi pa je navedenih tudi nekaj primerov, ko so pri odščiti po Zemplenu opazili anomalije. (38) Zato se predvideva, da obstaja še drugi mehanizem po katerem lahko poteka tovrstna reakcija. In sicer se nukleofilni napad zgodi najprej na sterično najmanj zasenečenem karbonilu, nato pa alkoholatni anion lahko z intramolekularnim nukleofilnim napadom na sosednji karbonil povzroči migracijo acetilov. (38) Sklepamo, da je v primeru spojine **9** prišlo do težav pri odščiti acetatnih estrov, ker je sama molekula precej sterično ovirana in je bil zato nukleofilni napad otežen, več lis, ki smo jih opazili na TLC pa lahko indicira, da je prihajalo do nepopolne odščite in acilnih migracij. V literaturi je naveden primer, kjer so raziskovali potek reakcije po Zemplenovem postopku pri α - in β -manozidnih derivatih, pri čemer so ugotovili, da so β -manozidi bolj stabilni pod pogoji, ki se uporablajo pri tej reakciji. To razlagajo s tem, da so β -spojine bolj sterično ovirane. (36) Tudi naše spojine so β derivati, signifikantna razlika med spojino **9** in ostalimi pa je v tem, da je pri spojini **9** diastančnik zelo kratek, samo 1 ogljikov atom, zato benzilna skupina še dodatno pripomore k steričnemu oviranju karbonilnih skupin, ki so že sicer sterično ovirane zaradi prostih elektronskih parov kisikovih atomov, vključno z obročnim kisikom.

Pri spojinah **12**, **23** in **26** pri reakcijah odščite po Zemplenovem postopku nismo imeli težav, je pa bil pri spojini **12** izkoristek reakcije zelo majhen, sklepamo, da je najverjetnejše prišlo do vezave spojine na ionsko-izmenjevalno smolo Amberlite® IR120, ki smo jo dodali, da smo nanjo vezali NaOMe, zato smo je pri ostalih reakcijah uporabili manj in obenem tudi izdatno spirali smolo z metanolom.

5.11 RAZPRAVA K REZULTATOM TESTIRANJA Z METODO SPR

Spojine smo ovrednotili z uporabo metode SPR, pri čemer smo ugotavljali ali pride do vezave spojine na encim AtlE. Odločili smo se, da za testiranje uporabimo širši nabor spojin, kot zgolj glikomimetične spojine, ki smo jih uspeli sintetizirati. V tabeli III so prikazani rezultati testiranja z metodo SPR. Slike senzogramov se nahajajo v prilogi 2. Rezultati so del še neobjavljenih rezultatov doktorskega dela Tjaše Tibaut.

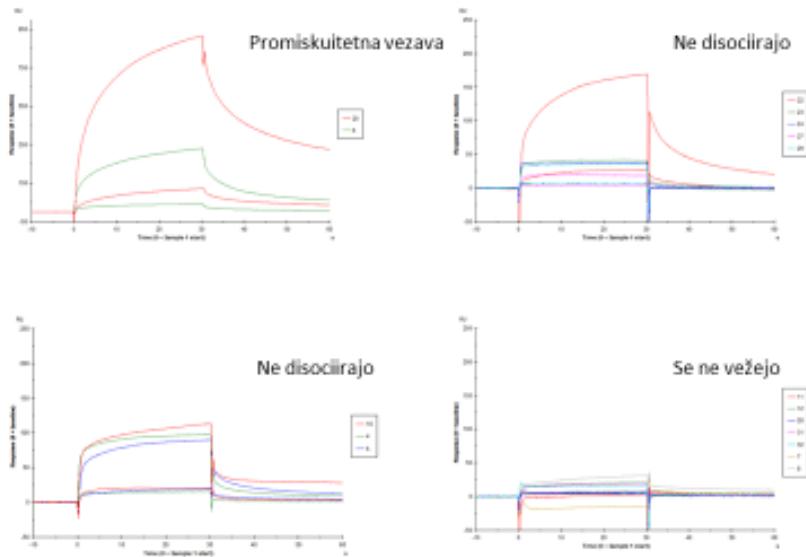
Tabela III: Rezultati testiranja z SPR

Spojina	Rezultat
<u>12</u>	Ne disociira
<u>23</u>	Ne disociira
<u>26</u>	Ni vezave
<u>17</u>	Ne disociira
<u>16</u>	Vezava
<u>18</u>	Ni vezave
<u>19</u>	Ni vezave
<u>20</u>	Vezava
2-((benzoimidazol-2-il)tio)ocetna kislina	Vezava

Spojini 16 in 20 ter 2-((benzoimidazol-2-il)tio)ocetna kislina so pokazale afiniteto do encima AtlE, presenetljivo pa nobena od glikomimetičnih spojin ni pokazala afinitete do encima. To je še zlasti presenetljivo, ker se je spojina 20 sama vezala na encim, medtem ko se v obliki glikomimetika (spojina 26) ni.

SPR eksperiment je sestavljen iz faze asociacije, med katero se analit veže na ligand, ko so vsa vezavna mesta zasedena pa pride do zasičenja, takrat krivulja doseže plato. Nato sledi faza disociacije, tekom katere analit izplavlja iz liganda. Disociacija je lahko zelo počasna, če se analit zelo močno veže na ligand, da ligand ne disociira pa lahko pomeni zelo močno vezavo z ligandom ali pa, da analit tvori nespecifične interakcije z matriksom. Promiskuitetna vezava analita z ligandom pomeni nespecifično vezavo po principu tvorbe

agregatov. Oblike senzogramov, ki jih dobimo pri opisanih situacijah, so prikazane na sliki 23.



Slika 23: Senzogrami, ki smo jih dobili z različnimi spojinami.

Kot najbolj obetavne so se izkazale spojine **16**, **17**, **20**, **23** in 2-((benzoimidazol-2-il)thiocetna kislina, vendar so bile afinitete prešibke, da bi lahko izračunali konstanto afinitete K_D . Za ustrezeno določitev afinitete bi morali titrirati spojine še pri višjih koncentracijah, kar pa ni bilo mogoče zaradi omejitev s količino spojin ali pa s slabo topnostjo spojin v višjih koncentracijah.

Prednosti uporabe metode SPR so: enostavna uporaba, za eksperiment so potrebne majhne količine vzorca, čipi se lahko ponovno uporabijo in spremljamo lahko interakcije v realnem času. Interakcij ne moremo meriti, če spojine niso topne v pufrskih sistemih, ali pa če so afinitete prešibke. Za zanesljivost rezultatov bi bilo testiranje dobro opraviti še s kakšno drugo komplementarno metodo, kot so recimo mikrotermoforeza (MST), STD-NMR in pa z encimskim testom.

MST (microscale thermophoresis) je tehnika, s katero lahko kvantitativno ovrednotimo biomolekularne interakcije. Temelji na termoforezi, to je premikanju molekul v temperaturnem gradientu, ki je odvisno od lastnosti molekul, kot so velikost, naboj, hidratacijski ovoj in konformacija. MST eksperiment poteka tako, da se temperaturni

gradient proizvede z laserjem infrardeče svetlobe, spremlja in meri pa se usmerjeno premikanje fluorescenčno označenih molekul. Metoda daje zelo točne in zanesljive rezultate.
(39)

Z STD (saturation transfer difference) metodo lahko identificiramo epitope na ligandu, ki so odgovorni za vezavo na receptorski protein. Protoni liganda, ki so v tesnem kontaktu z receptorskim proteinom, namreč oddajajo močnejše STD-NMR signale, medtem ko protoni, ki niso v kontaktu, ne oddajajo nobenega signala. (40) S to metodo bi torej poleg same vezave na protein lahko določili tudi kako ligandi interagirajo s proteinom.

6. SKLEP IN ZAKLJUČEK

Med izdelavo magistrske naloge smo se soočili s kar nekaj izzivi tako pri sintezi kot tudi pri čiščenju spojin, zaradi česar smo morali kar nekajkrat spremeniti sintezni načrt. Vseeno smo uspeli sintetizirati tri glikomimetične spojine, ki so se sicer po strukturi razlikovale od prvotno načrtovanih, vendar so ohranjale bistvene karakteristike, s katerimi smo želeli doseči vezavo v protein AtlE.

Najprej smo optimizirali postopek priprave *N*-acetilglukozaminskega glikozil donorja, ki je sicer opisan v literaturi (26), vendar smo imeli pri sintezi po tem postopku nemalo težav, zlasti pri O-acetiliranju. S poskušanjem smo določili potrebne količine ekvivalentov piridina in acetanhidrida, da smo dobili želeni produkt, obenem pa je takšen postopek sinteze tudi ugodnejši s strani čiščenja produkta in porabe reagentov, saj uporabimo bistveno manj piridina, ki je po eni strani težaven z vidika čiščenja, po drugi strani pa je tudi nevaren za zdravje (pri vdihavanju in v primeru, da pride do stika s kožo ali sluznicami).

Nadalje smo optimizirali tudi postopek glikozilacije. Pri pregledu literature smo naleteli na zelo različne postopke za glikozilacijo, saj so potek te reakcije in pogoji za reakcijo zelo odvisni od glikozil donorja in glikozil akceptorja. Bistvene tri spremenljivke, ki jih moramo upoštevati, so temperatura, količina katalizatorja (Lewisove kisline) ter razmerje med glikozil donorjem in glikozil akceptorjem. Ugotovili smo, da glikozilacija ne poteka niti s šibko bazičnimi glikozil akceptorji, medtem ko smo za druge glikozil akceptorje določili pogoje zgoraj navedenih treh spremenljivk.

Tekom sinteze smo uspešno razrešili tudi druge težave pri sintezi in čiščenju produktov in uspeli sintetizirati tudi nekaj končnih spojin, zato lahko rečemo, da smo uspešno zastavili pot sinteze *N*-acetilglukozaminskih glikomimetikov, ki je splošno uporabna za nadaljnjo sintezo spojin z delovanjem na N-acetilglukozaminidaze, tako bakterijske kot človeške.

Rezultati testiranja z metodo SPR sicer presenetljivo niso pokazali vezave glikomimetičnih spojin na encim, smo pa vezavo na encim zasledili pri spojinah, ki smo jih tekom magistrske naloge sintetizirali kot možne glikozil akceptorje. Vsekakor pa bi bilo dobro spojine ovrednotiti še s kakšno drugo metodo, kot je na primer MST ali STD-NMR in pa z encimskim testom.

Z magistrsko nalogu smo tako prispevali delček v mozaik nadaljnega raziskovanja še precej neznanega področja zaviralcev bakterijskih N-acetilglukozaminidaz. Glede na to, da postaja bakterijska rezistenca čedalje pogostejši in tudi čedalje bolj problematičen pojav, lahko pričakujemo, da bo odkrivanje te nove potencialne možnosti za protibakterijsko delovanje, deležno še kar nekaj pozornosti. Ker pa tudi glikomimetične spojine počasi dosegajo svoj razcvet, bi lahko bila uporabnost ugotovitev te magistrske naloge širša od zgolj osredotočenosti na specifično tarčo (bakterijske N-acetilglukozaminidaze).

7. LITERATURA

1. GBD 2013 Mortality and Causes of Death, Collaborators: Global, regional, and national age-sex specific all-cause and cause-specific mortality for 240 causes of death, 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. Lancet, 2014; 385 (9963): 117–71
2. WHO: Antibiotic resistance. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/antibiotic-resistance/en/>, datum dostopa: 19.6.2017
3. Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 139-145.
4. Kayser F. H, Bienz K. A, Eckert J, Zinkernagel R. M: Medical Microbiology, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005: 229-233
5. Rayner C, Munckhoff W. J: Antibiotics currently used in the treatment of infections caused by *Staphylococcus aureus*. Internal Medicine Journal, 2005; 35: 3-16
6. Jevons M. P, “Celbenin”-resistant staphylococci. BMJ, 1961; 1: 124–25
7. Chambers H. F, The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*. Emerging Infectious Diseases journal, 2001; 7: 178–82
8. UpToDate: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). <https://www.uptodate.com/contents/methicillin-resistant-staphylococcus-aureus-mrsa-beyond-the-basics>, datum dostopa: 23.6.2017
9. Pinho G. M, Kjos M, Veening J: How to get (a)round: mechanisms controlling growth and division of coccoid bacteria. Nature Reviews Microbiology, 2013; 11: 601–614
10. Hiramatsu K: Vancomycin-resistant *Staphylococcus aureus*: a new model of antibiotic resistance. Infectious Diseases, 2001; 1: 147-55
11. Gubina M, Ihan A: Medicinska bakteriologija z imunologijo in mikologijo, Medicinski razgledi, Ljubljana, 2002: 7-12
12. Kayser F.H, Bienz K.A, Eckert J, Zinkernagel R.M: Medical Microbiology, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 2005: 152-156
13. Kuhn H, Gutelius D, Black E, Nadolny C, Basu A, Reid C: Anti-bacterial glycosyl triazoles-Identification o fan N-acetylglucosamine derivative with bacteriostatic activity against Bacillus. Medicinal Chemical Communications, 2014; 5: 2013-2017

14. Vollmer W, Blanot D, de Pedro M. A: Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008; 32: 149–167
15. Reith J, Mayer C. Peptidoglycan turnover and recycling in Gram-positive bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2011; 92: 1–11
16. Höltje J. V: Growth of the stress-bearing and shape-maintaining murein sacculus of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 1998; 62: 181–203
17. Park J. T: Turnover and recycling of the murein sacculus in oligopeptide permease-negative strains of *Escherichia coli*: indirect evidence for an alternative permease system and for a monolayered sacculus. *Journal of Bacteriology*; 1993, 175: 7–11
18. Cheng Q, Park JT: Substrate specificity of the AmpG permease required for recycling of cell wall anhydro-muropeptides. *J Bacteriol*; 2002, 184: 6434–6436
19. Jarrod W. J, Jed F. F, and Shahriar M: Bacterial cell-wall recycling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2013; 1277: 54–75
20. van Heijenoort J: Peptidoglycan hydrolases of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2011; 75: 636–663
21. Mihelic M, Vlahovicek-Kahlina K, Renko, M, Mesnage S, Dobersek A, Taler-Vercic A, Jakas A, Turk D: The mechanism behind the selection of two different cleavage sites in NAG-NAM polymers. *International Union of Crystallography journal*, 2017; 4: 185-198
22. Beat E, John L. M: From carbohydrate leads to glycomimetic drugs. *Nature reviews*, 2009; 8: 661-677
23. Sara S, Anna B: Design and synthesis of glycomimetics. *Carbohydrate Chemistry*, 2015; 41: 1-25
24. Asgarali A, Stubbs K. A, Oliver A, Vocadlo D. J, Mark B. L: Inactivation of the Glycoside Hydrolase NagZ Attenuates Antipseudomonal β -Lactam Resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009; 53: 2274–2282
25. Yamaguchi T, Blázquez B, Hesek D, Lee M, Llarrull L. I, Boggess B, Oliver A. G, Fisher J. F, Mobashery S: Inhibitors for Bacterial Cell-Wall Recycling. *ACS Medicinal Chemistry Letters*, 2012; 3: 238–242
26. J. A. Marquart: SPR Theory. <https://www.sprpages.nl/spr-overview/spr-theory>, datum dostopa: 11.8.2017

27. SPR strani: Površinska plazmonska resonanca. <http://web.bf.uni-lj.si/bi/sprcenter/Tehnologija.html>, datum dostopa: 10.8.2017
28. Dullenkopf W, Castro-Palomino J. C, Manzoni L, Schmidt R. R: N-Trichloroethoxycarbonyl-glucosamine derivatives as glycosyl donors. Carbohydrate research, 1996; 296: 135-147
29. Enugala R, Carvalho L, Dias Pieres M, Marques M: Stereoselective glycosylation of glucosamine: The role of the N-protecting group, Chemistry – An Asian Journal, 2012; 7: 2482-501
30. Lindhorst T. K: Essentials of carbohydrate chemistry and biochemistry. Wiley-VCH Verlag GmbH, 2003
31. Crich D, Dudkin V: Why Are the Hydroxy Groups of Partially Protected N-Acetylglucosamine Derivatives Such Poor Glycosyl Acceptors, and What Can Be Done about It? A Comparative Study of the Reactivity of N-Acetyl-, N-Phthalimido-, and 2-Azido-2-deoxy-glucosamine Derivatives in Glycosylation. 2-Picolinyl Ethers as Reactivity-Enhancing Replacements for Benzyl Ethers. Journal of the American Chemical Society, 2001;123: 6819-6825
32. RCSB PDB - 4PI7: Crystal structure of S. Aureus Autolysin E in complex with disaccharide NAM-NAG Structure Summary Page. <http://www.rcsb.org/pdb/explore.do?structureId=4pi7>, dostop: 13.7.2017
33. Zhang Z, Ollmann I. R, Ye X, Wischnat R, Baasov T, Wong C: Programmable One-Pot Oligosaccharide Synthesis. Journal of the American Chemical Society, 1999; 121: 734-753
34. Marsqvorsen m, Pedersen M, Rasmussen M, Kristensen S, Dahl-Lassen R, Jensen H: Why is direct glycosylation with N-acetylglucosamine donors such a poor reaction and what can be done about it?. Journal of Organic Chemistry, 2016; 82: 143-156
35. Windholz T, Johnston D: Trichloroethoxycarbonyl: a generally applicable protecting group. Tetrahedron Letters, 1967; 27: 2555-2557
36. Ellervik U, Magnusson G: Glycosylation with N-Troc protected glycosyl donors. Carbohydrate research, 1996; 280: 251-260
37. Ranade S, Demchenko A: Mechanism of Chemical Glycosylation: Focus on the Mode of Activation and Departure of Anomeric Leaving Groups. Journal of Carbohydrate Chemistry, 2013; 32: 1-43

38. Agoston K, Dobo A, Rako J, Kerekgyarto J, Szurmai Z: Anomalous Zemplen deacylation reactions of a- and b-D-mannopyranoside derivatives. Carbohydrate Research, 2001; 330: 183–190
39. Jerabek-Willemsena M, Wanner R Andréa T, Roth M, Duhr S, Baaske P, Breitsprecher D: MicroScale Thermophoresis: Interaction analysis and beyond. Journal of Molecular Structure, 1077; 2014: 101-113
40. Venkitakrishnan R, Benard O, Max M, and Markley J: Use of NMR Saturation Transfer Difference Spectroscopy to Study Ligand Binding to Membrane Proteins. Methods in Molecular Biology, 2012; 914: 47–63
41. Riphah College of Veterinary Sciences: Bacterial Cell Wall. <http://www.rcvets.com/2014/03/bacterial-cell-wall-is-composed-of.html>, datum dostopa: 6.10.2017
42. Microbeonline: Peptidoglycan (Murein/Mucopeptide): Structure and Medical Significance. <http://microbeonline.com/peptidoglycan-mureinmucopeptide-structure-and-medical-significance/>, datum dostopa: 6.10.2017

8. PRILOGE

Priloga 1: Analizni izvidi spektroskopskih tehnik

Spojina 2

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.26 (d, *J* = 3.7 Hz, 1H, H-1), 5.31 (dd, *J* = 10.8, 9.5 Hz, 1H, H-3), 5.24 (d, *J* = 9.8 Hz, 1H, H-4), 5.21 – 5.17 (m, 1H, NH), 4.84 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, Troc), 4.64 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, Troc), 4.30 (dd, *J* = 12.5, 4.1 Hz, 1H, H-6), 4.26 – 4.19 (m, 1H, H-6), 4.09 (dd, *J* = 12.4, 2.4 Hz, 1H, H-2), 4.04 (ddd, *J* = 9.9, 4.0, 2.3 Hz, 1H, H-5), 2.23 (s, 3H, Ac), 2.11 (s, 3H, Ac), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.07 (s, 3H, Ac).

Spojina 3

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.47 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-1), 5.36 – 5.32 (m, 1H, H-3), 5.31 – 5.29 (m, 1H, H-4), 5.11 (t, *J* = 9.5 Hz, 1H, NH), 4.78 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, Troc), 4.62 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, Troc), 4.26 – 4.20 (m, 2H, H-6), 4.13 – 4.08 (m, 1H, H-2), 4.03 (ddd, *J* = 10.8, 9.9, 3.6 Hz, 1H, H-5), 2.09 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 1H, Ac), 2.02 (s, 3H, Ac), 1.99 (s, 3H, Ac).

Spojina 4

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.80 (s, 1H, NH), 6.42 (d, *J* = 3.6 Hz, 1H, H-1), 5.35 (dd, *J* = 10.8, 9.5 Hz, 1H, H-3), 5.26 (d, *J* = 10.0 Hz, 1H, H-4), 5.24 – 5.20 (m, 1H, NH), 4.76 – 4.67 (m, 2H, Troc), 4.31 – 4.28 (m, 1H, H-2), 4.27 – 4.24 (m, 1H, H-6), 4.16 – 4.13 (m, 1H, H-6), 4.12 – 4.08 (m, 1H, H-5), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.06 (s, 6H, 2x Ac).

Spojina 7

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.38 – 7.31 (m, 5H, C₆H₅), 5.30 – 5.22 (m, 1H, H-3), 5.12 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-4), 5.04 (d, *J* = 9.0 Hz, 1H, H-1), 4.94 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, NH), 4.75 (d, *J* = 8.5 Hz, 2H, Troc), 4.66 – 4.62 (m, 2H, CH₂), 4.32 (dd, *J* = 12.4, 4.8 Hz, 1H, H-6), 4.19 (dd, *J* = 12.4, 2.4 Hz, 1H, H-6), 3.80 – 3.72 (m, 1H, H-2), 3.72 – 3.67 (m, 1H, H-5), 2.14 (s, 3H, Ac), 2.05 (d, *J* = 1.0 Hz, 6H, 2xAc).

Spojina 8

¹H NMR (400 MHz, Metanol-d4) δ 7.36 – 7.24 (m, 5H, C₆H₅), 5.22 (dd, *J* = 10.5, 9.3 Hz, 1H, H-3), 5.00 (dd, *J* = 10.1, 9.3 Hz, 1H, H-4), 4.87 – 4.83 (m, 1H, H-1), 4.71 (d, *J* = 8.4 Hz, 1H, Troc), 4.60 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, Troc), 4.31 (dd, *J* = 12.3, 4.6 Hz, 1H, H-6), 4.16 (dd, *J* = 12.3, 2.5 Hz, 1H, H-6), 3.91 (dd, *J* = 10.5, 8.4 Hz, 1H, H-2), 3.80 (ddd, *J* = 10.1, 4.6, 2.5 Hz, 1H, H-5), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.00 (s, 3H, Ac), 1.97 (s, 3H, Ac), 1.88 (s, 3H, Ac).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.82, 169.44, 136.72, 128.57, 128.19, 99.29, 72.36, 71.86, 70.88, 68.47, 62.09, 54.71, 50.96, 37.77, 23.37, 20.82, 20.77, 20.65.

Spojina 10

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.31 – 7.26 (m, 2H, Ar), 7.23 – 7.18 (m, 3H, Ar), 5.25 (dd, *J* = 10.7, 9.3 Hz, 1H, H-3), 5.06 (dd, *J* = 10.0, 9.2 Hz, 1H, H-4), 4.78 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, Troc), 4.63 (d, *J* = 12.0 Hz, 1H, Troc), 4.58 (d, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-6), 4.27 (dd, *J* = 4.8, 12.3

Hz, 1H, H-6), 4.15 – 4.12 (m, 1H, H-2), 4.12 – 4.08 (m, 1H, H-5), 3.73 – 3.58 (m, 2H, CH₂), 2.90 (t, *J* = 7.0 Hz, 2H, CH₂), 2.08 (s, 3H, Ac), 2.02 (d, *J* = 0.8 Hz, 6H, Ac).

¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.95, 170.80, 170.26, 169.53, 169.45, 138.62, 129.01, 128.95, 128.35, 126.36, 126.33, 100.72, 72.34, 71.83, 71.75, 70.35, 68.58, 62.12, 54.68, 36.03, 35.93, 23.31, 20.80, 20.72, 20.66.

Spojina **11**

¹H NMR (400 MHz, Methanol-*d*₄) δ 7.26 – 7.23 (m, 5H, Ar), 5.20 (dd, *J* = 10.6, 9.3 Hz, 1H, H-3), 5.03 – 4.95 (m, 1H, H-4), 4.63 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, NH), 4.30 (ddd, *J* = 12.3, 4.6, 1.4 Hz, 1H, Troc), 4.14 (dt, *J* = 12.3, 2.7 Hz, 1H, Troc), 4.11 – 4.03 (m, 2H, H-6), 3.86 (dd, *J* = 10.6, 8.4 Hz, 1H), 3.82 – 3.75 (m, 2H), 3.74 – 3.67 (m, 1H, H-2), 3.62 (s, 2H), 3.57 (dd, *J* = 10.6, 8.4 Hz, 1H; H-5), 2.96 – 2.85 (m, 4H, CH₂CH₂), 2.07 (s, 3H, Ac), 2.02 (s, 3H, Ac), 1.98 (s, 3H, Ac), 1.82 (s, 3H, Ac).

Spojina **12**

Spojina identificirana z MS: (M+K⁺) 364,1

Spojina **13**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.35 – 7.27 (m, 5H, Ar), 3.80 – 3.75 (m, 2H, CH₂), 2.67 – 2.62 (m, 2H, CH₂), 2.24 (s, 3H, CH₃).

Spojina **14**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.34 – 7.28 (m, 5H, Ar), 3.64 – 3.61 (m, 2H, CH₂), 3.57 (s, 2H, CH₂), 2.62 – 2.58 (m, 2H, CH₂), 2.23 (s, 3H, CH₃).

Spojina **16**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 8.11 (t, *J* = 5.8 Hz, 1H, NH), 8.06 – 8.03 (m, 1H, NH), 7.53 (dd, *J* = 5.8, 3.0 Hz, 2H, Ar), 7.26 – 7.21 (m, 2H, Ar), 3.80 – 3.75 (m, 4H, CH₂CH₂), 3.50 (td, *J* = 5.7, 4.4 Hz, 2H, CH₂).

MS: (M+Na⁺) 274,02

Spojina **17**

Spojina identificirana z MS: (M+Na⁺) 287,95

Spojina **18**

Spojina identificirana z MS: (M+Na⁺) 328,09

Spojina **19**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.91 – 7.86 (m, 2H, Ar), 7.78 – 7.73 (m, 2H, Ar), 3.93 (tq, *J* = 5.9, 3.4, 2.7 Hz, 4H, CH₂-CH₂), 2.27 (s, 1H, OH).

Spojina **20**

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.88 (tt, *J* = 5.8, 2.7 Hz, 2H, Ar), 7.80 – 7.72 (m, 2H, Ar), 3.93 – 3.84 (m, 2H, CH₂), 3.68 – 3.59 (m, 2H, CH₂), 1.90 (p, *J* = 6.7, 6.0 Hz, 2H, CH₂).

Spojina 21

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.88 (dd, *J* = 5.4, 3.1 Hz, 2H, Ar), 7.77 – 7.72 (m, 2H, Ar), 5.39 – 5.33 (m, 1H, H-3), 5.32 – 5.24 (m, 2H), 5.18 – 5.09 (m, 1H, H-4), 5.04 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, NH), 4.81 – 4.72 (m, 2H), 4.26 (dd, *J* = 10.6, 5.2 Hz, 2H, Troc), 4.19 (dd, *J* = 12.3, 4.8 Hz, 1H, H-6), 4.07 (dd, *J* = 12.2, 2.4 Hz, 1H, H-6), 4.04 – 3.92 (m, 2H, CH₂), 3.87 – 3.80 (m, 2H, CH₂), 3.72 (d, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-5), 3.65 (q, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-2), 2.10 (s, 3H, Ac), 2.03 (d, *J* = 1.4 Hz, 3H, Ac), 2.01 (s, 3H, Ac).

Spojina 23

Spojina identificirana z MS: (M+H⁺) 411,2

Spojina 24

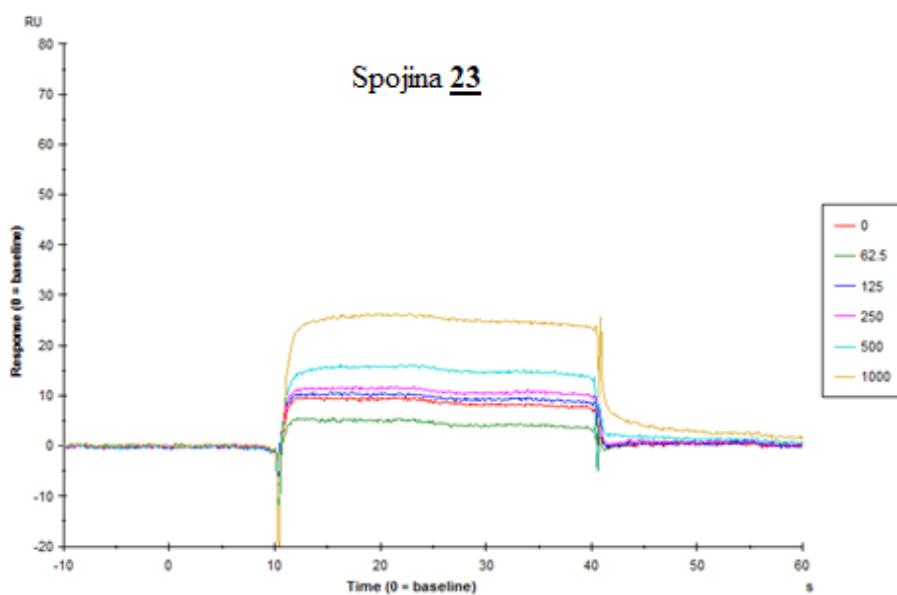
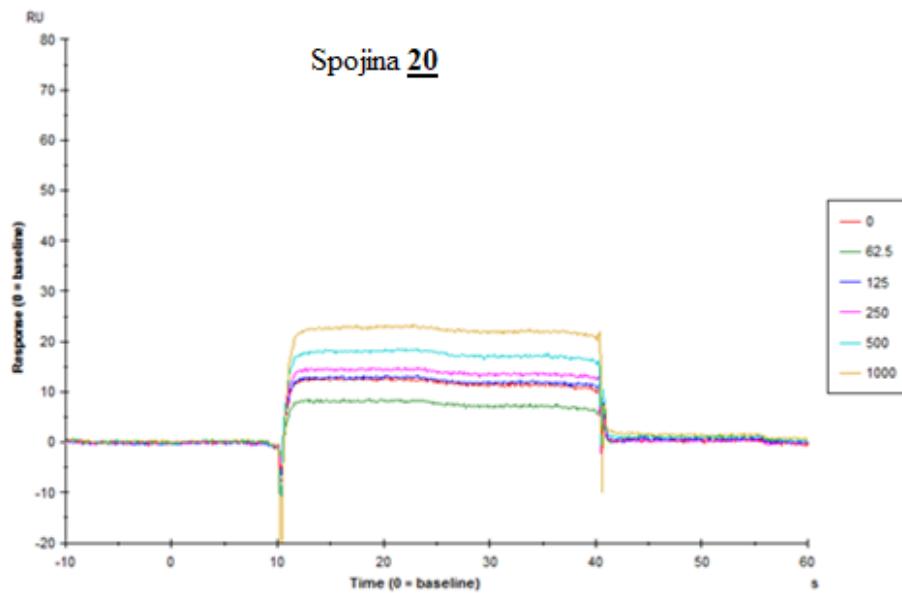
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.84 (dd, *J* = 5.4, 3.1 Hz, 2H, Ar), 7.73 (dd, *J* = 5.5, 3.1 Hz, 2H, Ar), 6.05 (d, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-1), 5.26 (t, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-3), 5.07 (t, *J* = 9.6 Hz, 1H, H-4), 4.74 (s, 1H), 4.68 (d, *J* = 12.1 Hz, 1H, Troc), 4.54 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H, Troc), 4.24 (dd, *J* = 12.3, 4.7 Hz, 1H, H-6), 4.09 (dd, *J* = 12.3, 2.4 Hz, 1H, H-6), 4.00 (dt, *J* = 9.9, 4.7 Hz, 1H, H-2), 3.88 (ddt, *J* = 11.4, 8.9, 4.4 Hz, 1H, H-5), 3.83 – 3.74 (m, 2H, CH₂), 3.72 – 3.64 (m, 2H, CH₂), 3.47 (d, *J* = 0.9 Hz, 2H), 2.06 (s, 3H, Ac), 2.03 (s, 3H, Ac), 2.01 (s, 3H, Ac).

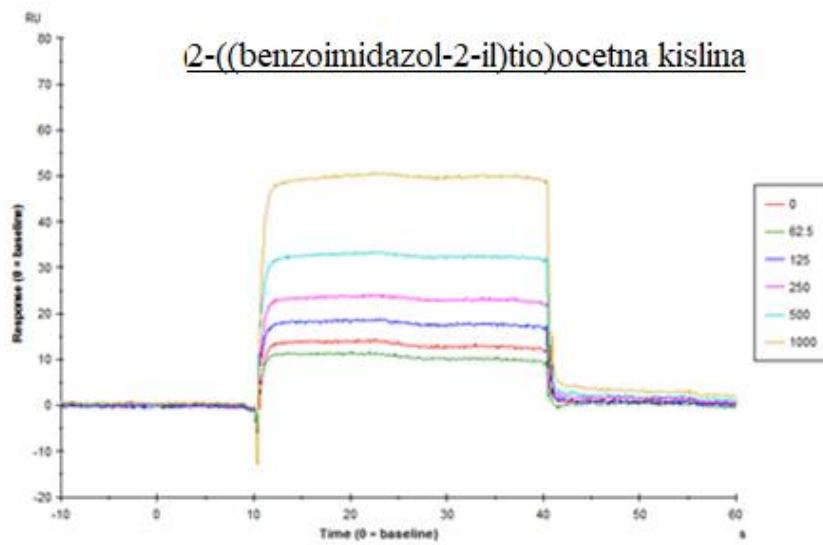
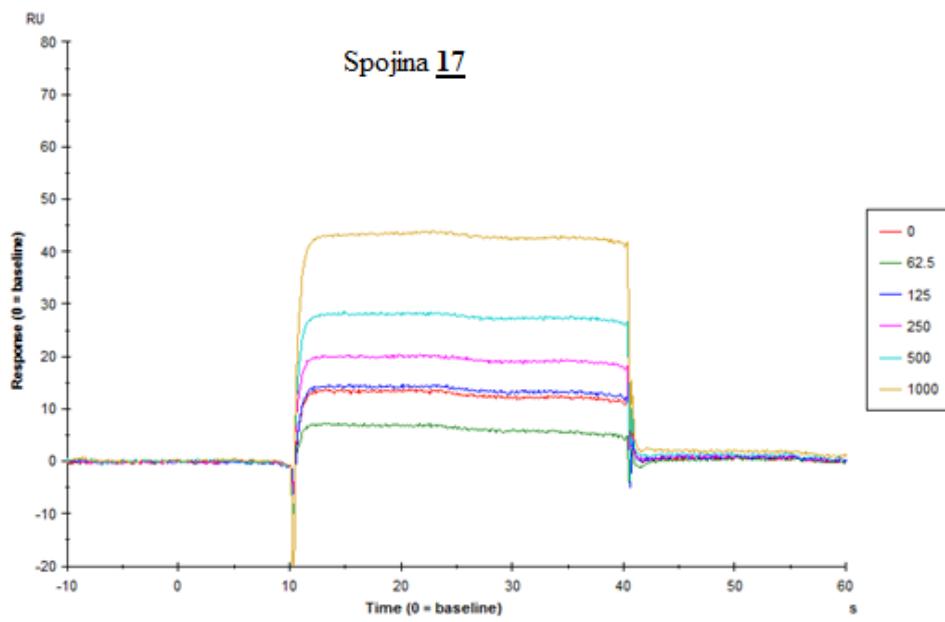
¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 170.79, 170.68, 169.50, 168.68, 154.62, 134.19, 131.97, 123.40, 101.17, 95.59, 74.42, 72.82, 71.85, 68.68, 67.01, 62.04, 56.23, 50.85, 34.44, 28.46, 20.78, 20.74, 20.65.

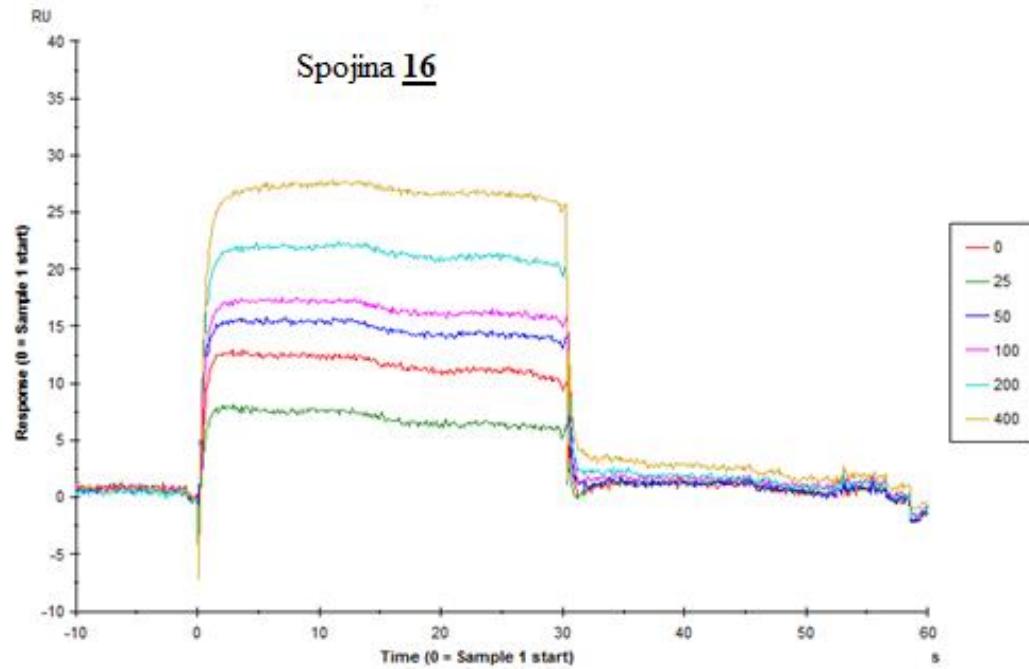
Spojina 26

Spojina identificirana z MS: (M+H⁺) 409,2

Priloga 2: Senzorgrami







Priloga 3: Testiranje z metodo SPR

Struktura	Vendor/ Oznaka	Mol weight (g/mol)	Masa (mg) 0,1M v 100% DMSO (uL)	Testiranje	Komentar/SPR
	12	325	1,3 40,00	2. test pri 2 konc (1mM, 100 uM) 2. test pri 2 konc (1mM*, 100 uM)	ne disociira priprava 1 mM ter 0,1 mM raztoplne spojine (v 5% DMSO)
	23	394	1,32 33,50	2. test pri 2 konc (1mM*, 100 uM) 3. 5 konc (1mM navzdol)	ne disociira priprava 1 mM ter 0,1 mM raztoplne spojine (v 5% DMSO)
	26	408	1,38 33,82	2 - test pri 2 konc (1mM, 100 uM) 2. test pri 2 konc (1mM, 100 uM)	ni vezave priprava 1 mM ter 0,1 mM raztoplne spojine (v 5% DMSO)
	17	265	1,27 47,92	2. test pri 2 konc (1mM, 100 uM) 3. 5 konc (1mM navzdol)	ne disociira priprava 1 mM ter 0,1 mM raztoplne spojine (v 5% DMSO)
	16	251	1,5 59,76	2. test pri 2 konc (1mM, 100 uM) 3. 5 konc (1mM navzdol)	vezava priprava 1 mM ter 0,1 mM raztoplne spojine (v 5% DMSO)
	18	305	1,18 38,69	2. test pri 2 konc (1mM, 100 uM) 3. 5 konc (1mM navzdol)	ni vezave priprava 1 mM ter 0,1 mM raztoplne spojine (v 5% DMSO)
	19	191	1,36 71,20	2. test pri 2 konc (1mM, 100 uM) 2. test pri 2 konc (1mM, 100 uM)	ni vezave priprava 1 mM ter 0,1 mM raztoplne spojine (v 5% DMSO)
	20	205	1,18 57,56	2. test pri 2 konc (1mM, 100 uM) 3. 5 konc (1mM navzdol)	vezava priprava 1 mM ter 0,1 mM raztoplne spojine (v 5% DMSO)
	208	1,32 63,46	2. test pri 2 konc (1mM, 100 uM) 3. 5 konc (1mM navzdol)	vezava	