

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA ČEŠAREK

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

URŠKA ČEŠAREK

**RAZVOJ SINTEZNE METODE ZA PRIPRAVO AMINOKISLINSKIH
DERIVATOV MONOBAKTAMOV**

**DEVELOPMENT OF SYNTHETIC METHOD FOR THE
PREPARATION OF AMINO ACID MONOACTAM DERIVATIVES**

UNIFORM MASTER'S STUDY PROGRAMME PHARMACY

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljala na Univerzi v Ljubljani, Fakulteti za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Roka Frlana, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in v Centru za masno spektrometrijo na Institutu Jožef Stefan.

Zahvala

Zahvaljujem se mentorju doc. dr. Roku Frlanu, mag. farm. za trud, vso strokovno pomoč in nasvete pri izdelavi magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelala pod mentorstvom doc. dr. Roka Frlana, mag. farm.

Urška Češarek

Predsednik komisije: prof. dr. Darko Černe, mag. farm., spec. med. biokem.

Član komisije: asist. dr. Matjaž Ravnikar, mag. farm.

Vsebina

Povzetek	III
Abstract.....	IV
Seznam okrajšav	V
1 Uvod.....	1
1.1 Sinteza bakterijske celične stene.....	1
1.2 Ligaza MurF	3
1.2.1 Znani zaviralci ligaze MurF	5
1.3 Penicilin vezoči proteini	6
1.3.1 Zaviralci PBP.....	10
1.4 V. generacija cefalosporinov	11
1.4.1 Vežava ceftobiprola v aktivno mesto PBP2a MRSA	12
1.5 Monobaktam	13
2 Namen in načrt dela	15
3 Materiali in metode	18
3.1 Materiali.....	18
3.2 Metode	18
4 Eksperimentalni del.....	20
4.1 Splošna sintezna pot.....	20
4.2 Sinteza metil <i>N</i> -((benziloksi)karbonil)- <i>D</i> -tirozinata (3).....	21
4.2.1 Prva sintezna pot.....	21
4.2.2 Druga sintezna pot	21
4.2.3 Identifikacija metil <i>N</i> -((benziloksi)karbonil)- <i>D</i> -tirozinata (3)	22
4.3 Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-2-((4-((<i>R</i>)-2-(((benziloksi)karbonil)amino)-3-metoksi-3-oksopropil)fenoksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (5).....	22
4.3.1 Mitsunobujeva reakcija.....	22
4.3.2 Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-2-((4-((<i>R</i>)-2-(((benziloksi)karbonil)amino)-3-metoksi-3-oksopropil)fenoksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (5) s pomočjo tozilata	23
4.3.2.1 Sinteza <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-2-((toziloksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (6).....	23
4.3.2.2 Poskus sinteze <i>terc</i> -butil (<i>S</i>)-2-((4-((<i>R</i>)-2-(((benziloksi)karbonil)amino)-3-metoksi-3-oksopropil)fenoksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (5).....	24

4.3.3	Sinteza <i>terc</i> -butil (S)-2-((4-((R)-2-((benziloksi)karbonil)amino)-3-metoksi-3-oksopropil)fenoksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (5) s pomočjo mezilata.....	26
4.3.3.1	Sinteza <i>terc</i> -butil (S)-2-(((metilsulfonil)oksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (7)	26
4.3.3.2	Poskus sinteze <i>terc</i> -butil (S)-2-((4-((R)-2-((benziloksi)karbonil)amino)-3-metoksi-3-oksopropil)fenoksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (5).....	26
4.3.4	Izolacija <i>terc</i> -butil (S)-2-((4-((R)-2-((benziloksi)karbonil)amino)-3-metoksi-3-oksopropil)fenoksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (5).....	27
4.4	Sinteza metil (R)-2-((benziloksi)karbonil)amino)-3-(4-(2-((<i>terc</i> -butoksikarbonil)(metil)amino)etoksi)fenil)propanoata (9).....	28
4.5	Sinteza metil (R)-2-((benziloksi)karbonil)amino)-3-(4-(piridin-2-iloksi)fenil)propanoata (10)	29
4.6	Sinteza metil (R)-2-((benziloksi)karbonil)amino)-3-(4-(piridin-3-iloksi)fenil)propanoata (11)	30
4.7	Sinteza metil (R)-2-((S)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)-3-(4-(piridin-2-iloksi)fenil)propanoata (14).....	31
4.8	Sinteza metil (R)-2-((S)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)-3-(4-(piridin-3-iloksi)fenil)propanoata (16).....	33
4.9	Sinteza <i>metil</i> (R)-2-((S)-4-(dibenzilamino)-3-oksoizoksazolidin-2-il)-3-(4-(piridin-2-iloksi)fenil)propanoata (17)	34
4.10	Sinteza metil (R)-2-((S)-4-(dibenzilamino)-3-oksoizoksazolidin-2-il)-3-(4-(piridin-3-iloksi)fenil)propanoata (18)	36
5	Razprava.....	39
5.1	Sinteza stranske verige na mestu N1 β -laktamskega obroča	39
5.1.1	<i>O</i> -alkiliranje.....	39
5.1.1.1	Mitsunobujeva reakcija.....	39
5.1.1.2	Uvedba dobro izstopajoče skupine	40
5.1.2	<i>O</i> -ariliranje z uporabo Ullmannove reakcije	42
5.2	Sinteza β -laktamskega obroča	43
5.3	Izguba konformacije na stereogenem centru	45
5.4	Sinteza končnih spojin.....	50
6	Sklep.....	51
7	Literatura.....	52

Povzetek

Pojav bakterijske odpornosti in pomanjkanje novih učinkovin na trgu predstavlja velik zdravstveni problem, zato so novi antibiotiki nujno potrebni. Peptidoglikan je esencialen strukturni element celične stene, ki omogoča reverzibilno prilagajanje oblike in prosto difuzijo velikih molekul. V njegovi biosintezi so udeleženi številni encimi, kot so PBP in MurF, ki jih najdemo le v bakterijah. PBP in MurF so za bakterije esencialni encimi, ki so sicer udeleženi v različnih stopnjah biosinteze, vendar vsi prepoznajo D-Ala-D-Ala aminokislinsko zaporedje. Na trgu imamo različne skupine β -laktamskih antibiotikov, ki zavirajo delovanje PBP, nimamo pa učinkovin z delovanjem na MurF. Razvoj slednjih gre v smeri delovanja na UDP in ATP vezavni mesti. Na Fakulteti za farmacijo načrtujejo monobaktame kot strukturne analoge ceftobiprola, cefalosporinskega antibiotika V. generacije z izkazano aktivnostjo proti bakteriji MRSA. Za sintetizirane spojine pričakujejo delovanje na oba encima, torej da zavirajo PBP in hkrati predstavljajo lažni substrat za MurF, kar je nov način delovanja β -laktamskih antibiotikov.

V okviru magistrske naloge smo poskušali razviti sintezno metodo s katero bi lahko iz preprostih aminokislin sintetizirali analoge monobaktamskih antibiotikov. Njihova struktura je sestavljena iz stranske verige z bazičnim centrom na mestu N1 β -laktamskega obroča in iz stranske verige na mestu C3, ki vsebuje prosto amino skupino ali derivatizirano z aminotiazolimetoksiimino skupino. Za tvorbo β -laktamskega obroča smo uporabili aminokislino serin, na mestu N1 pa aminokislino tirozin. Največji izziv je predstavljalo *O*-alkiliranje tirozina, saj smo ugotovili, da Mitsunobujeva reakcija ni učinkovit način za alkiliranje OH skupine z izbranimi alkoholi, medtem ko je bilo *O*-ariliranje z bromiranimi piridini in uporabo Ullmannove reakcije uspešno. Predstavljena sintezna metoda predstavlja, skupaj z izzivi, s katerimi smo se srečali tekom dela in predlaganimi rešitvami, izhodišče za nadaljnjo optimizacijo in strukturne modifikacije spojin. Ugotovitve o reaktivnosti tirozina in serina bodo v pomoč pri nadaljnjem načrtovanju analogov ceftobiprola.

Ključne besede

Monobaktam, D-Ala-D-Ala, PBP, MurF, aminokislina, Mitsunobujeva reakcija, Ullmannova reakcija

Abstract

As the emergence of bacterial resistance and the lack of new drugs on the market represent a major health problem, new antibiotics are needed. Peptidoglycan is an essential structure element of the bacterial cell wall allowing reversible shaping and free diffusion of large molecules. Its biosynthesis involves numerous enzymes, such as PBP and MurF, which are found only in bacteria. PBP and MurF are essential bacterial enzymes, and although they are involved in different stages of biosynthesis, both recognize the D-Ala-D-Ala amino acid sequence. On the market there are various groups of β -lactam antibiotics inhibiting PBP activity, but there are no compounds acting on MurF. The development of the latter is directed to acting on the UDP and ATP binding sites. At the Faculty of Pharmacy, they have been designing monobactams as structural analogues of ceftobiprole, a fifth generation of cephalosporin antibiotics with activity against MRSA. For synthesized compounds it is expected to have activity against both enzymes; they need to inhibit PBPs and at the same time be false substrate for MurF, as a new mode of action of β -lactam antibiotics.

In the master's thesis, we tried to develop a method for synthesis of monobactam antibiotic analogues, starting from simple amino acids. Their structure consists of the side chain with the base center at N1 and of the side chain at C3 of the β -lactam ring, which contains either free amino group or is derivatized with aminothiazolylmetoxyimino group. The amino acid serine was used to form the β -lactam ring and the amino acid tyrosine to form the side chain at N1. The greatest challenge was *O*-alkylation of tyrosine, as we have found out that the Mitsunobu reaction is not an efficient approach for alkylation of the OH group with the selected alcohols. On the other hand, *O*-arylation with brominated pyridines and the use of the Ullmann reaction was successful. Together with the challenges, that we were facing during work and proposed solutions, the presented synthesis method is the starting point for further optimizations and structural modifications of compounds. The findings on the reactivity of tyrosine and serine will be helpful in the further planning of ceftobiprole analogs.

Key words

Monobactam, D-Ala-D-Ala, PBP, MurF, amino acids, Mitsunobu reaction, Ullmann reaction

Seznam okrajšav

$(CD_3)_2CO$	devteriran aceton
AcOH	etanojska kislina
ADDP	1,1'-(azodikarbonil)dipiperidin
ADP	adenozil-5'-difosfat
Ala	alanin
ATP	adenozil-5'-trifosfat
Bn	benzil
Boc	<i>tert</i> -butil karbamat
C ₅₅ -P	undekaprenil-fosfat
Cbz	karboksibenzil
CDCl ₃	devteriran kloroform
d	dublet
D-Ala ₁	predzadni D-Ala
D-Ala ₂	izstopajoči D-Ala
DCC	<i>N,N'</i> -dicikloheksilkarbodiimid
DD-peptidaze	D-alanil-D-alanin-peptidaze
dd	dublet dubleta
DEAD	dietil azodikarboksilat
DIAD	diizopropil azodikarboksilat
DMF	dimetilformamid
DMG	dimetilglicin
DMSO-d ₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNK	deoksiribonukleinska kislina
<i>dr</i>	diastereoizomerno razmerje
dt	dublet tripleta
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDC	3-(((etilimino)metilen)amino)- <i>N,N</i> -dimetilpropan-1-amin
ekv.	ekvivalent
<i>er</i>	enatiomerno razmerje
EtOAc	etil acetat
FT-IR	infrardeča spektroskopija s Fourierjevo transformacijo
FtsW	integralni membranski protein
G-	gramnegativne bakterije

G, Gly	glicin
G+	grampozitivne bakterije
Glu	glutaminska kislina
HOBt	hidroksibenzotriazol
HPLC	visokotlačna tekočinska kromatografija
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti
IR	infrardeča spektroskopija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
K, Lys	lizin
m	multiplet
<i>mezo</i> -Dap	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
mezil	metansulfonil
MF	mobilna faza
MraY	fosfo- <i>N</i> -acetilmuramoil-pentapeptid transferaza
MRSA	na meticilin odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	masna spektrometrija
MsCl	mezil klorid
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruvil transferaza
MurB	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvilglukozomin reduktaza
MurC-F	muramil ligaze C-F
MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat- <i>mezo</i> -diaminopimelat-D- -alanin-D-alanin ligaza
MurG	<i>N</i> -acetilglukozaminil transferaza
MurJ	integralni membranski protein
N, Asn	asparagin
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfat
NMM	4-metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
PASTA	penicilin vezoči proteini in domene povezane s Ser/Thr kinazami
PB domena	penicilin vezoča domena
PBP	penicilin vezoči proteini
PBP HMM	penicilin vezoči proteini z visoko molekulsko maso
PBP LMM	penicilin vezoči proteini z nizko molekulsko maso

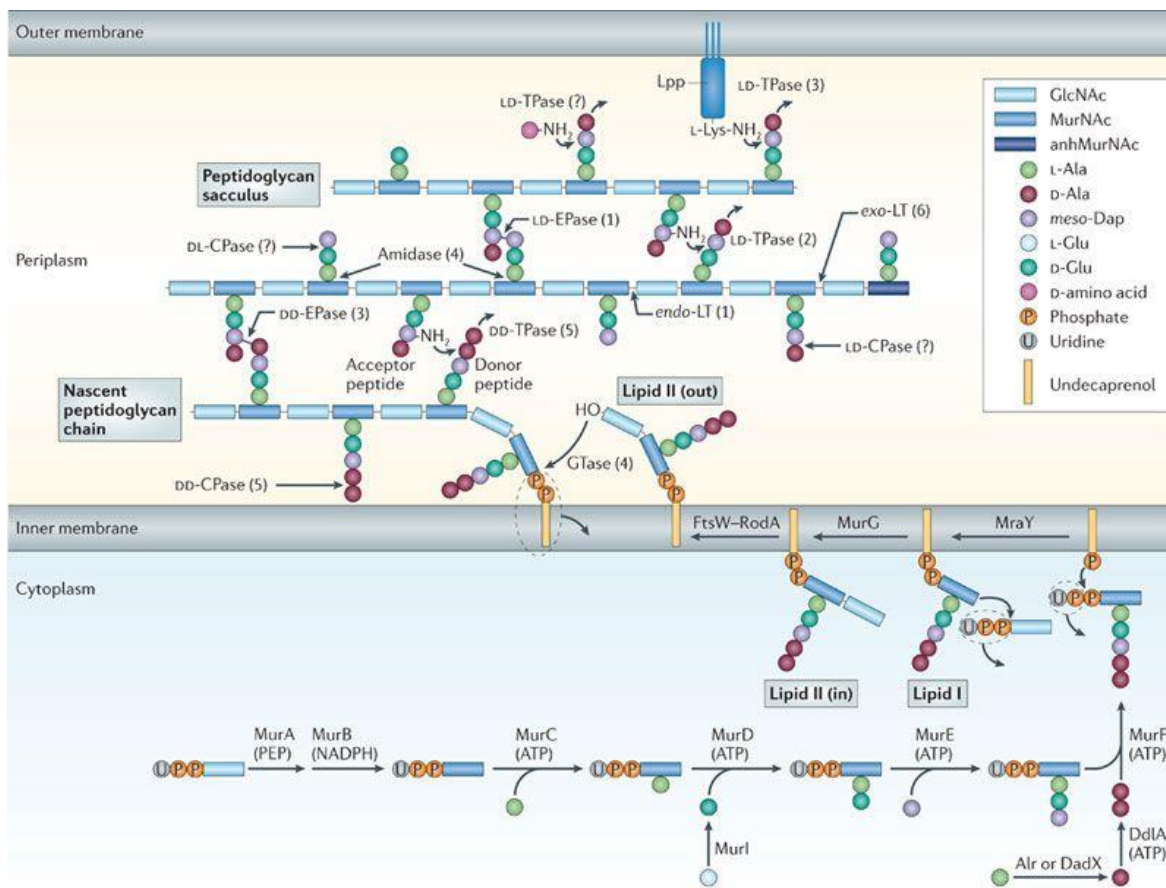
Pd/C	paladij na ogljiku
PEP	fosfoenolpiruvat
P _i	fosfat
PPh ₃	trifenilfosfin
Pro	prolin
Pyr	piridin
R _f	retencijski faktor
RNK	ribonukleinska kislina
s	singlet
S*, Ser1	katalitsko aktiven serin
S, Ser	serin
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
SAR	razmerje med strukturo in delovanjem
SDS-PAGE	poliakrilamidna gelska elektroforeza v prisotnosti natrijevega lavrilsulfata
S _N Ar	nukleofilna aromatska substitucija
T, Thr	treonin
TBP	tri-butilfosfin
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija
tozil	4-toluensulfonil
TsCl	tozil klorid
Tyr	tirozin
UDP	uridin difosfat
UDP-GlcNAc	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin
UDP-MurNAc	UDP- <i>N</i> -acetilmuramina
UDP-prekurzor	UDP-MurNAc-tripeptid

1 Uvod

Boj proti infekcijskim boleznim sega daleč v antični čas. Kljub temu se je veliki preboj na tem področju začel šele leta 1928 s Flemingovim odkritjem penicilina. Od takrat naprej so antibiotiki rešili na milijone življenj in so pomembno vplivali na podaljšanje življenjske dobe. Kmalu po začetku množične uporabe v klinični praksi, se je pojavila bakterijska odpornost na peniciline, na katero je Alexander Fleming opozarjal že leta 1945 in svaril pred preveliko uporabo antibiotikov (1). Sedaj, v 21. stoletju predstavlja odpornost na antibiotike eno izmed največjih groženj za človeštvo. Obstaja namreč možnost, da postanejo običajne okužbe in manjše poškodbe spet življenjsko ogrožujoče (2). V zadnjih desetletjih namreč upada število vseh na trg sproščenih antibiotikov. V ZDA je v letih 1983–1987 prišlo na trg 16 antibiotikov, medtem ko v letih 2008–2012 le 3. Kljub slabemu trendu, se je stanje v zadnjih letih izboljšalo, saj število novih antibiotikov na trgu narašča, že samo v letu 2014 so bili odobreni 4 novi antibiotiki za sistemsko uporabo (1, 3, 4). Antibiotiki delujejo na ključne dele bakterijskega metabolizma. Njihove tarče so sinteza celične stene, DNK giraza, RNK polimeraza, sinteza proteinov, metabolizem folne kisline, topoizomeraza IV, sinteza maščobnih kislin in celična membrana (4, 5).

1.1 Sinteza bakterijske celične stene

Peptidoglikan (murein) je esencialen strukturni element celične stene večine bakterij. Nahaja se na zunanji strani citoplazemske membrane in tvori vreči podobno obliko (sakulus). Peptidoglikan je odporen na zunanji pritisk, vendar ni tog, saj omogoča reverzibilno prilagajanje oblike, in hkrati zaradi relativno širokih por zagotavlja prosto difuzijo velikih molekul (proteinov). Zgrajen je iz linearnih glikanskih verig, ki so med seboj navzkrižno povezane preko kratkih peptidnih verig in vsebujejo izmenjujoče se zaporedje sladkorjev N-acetilglukozamina in N-acetilmuraminske kisline. Sestava in zaporedje gradnikov v peptidnih verigah se med različnimi vrstami razlikujeta (6). Odvisna sta od specifičnosti encimov (ligaz Mur), ki sodelujejo pri izgradnji peptidne verige in od kasnejših stopenj v sintezi peptidoglikana (modifikacije pri strukturi lipida II (7), navzkrižno povezovanje) (6).



Slika 1: Shematski prikaz sinteze peptidoglikana (8).

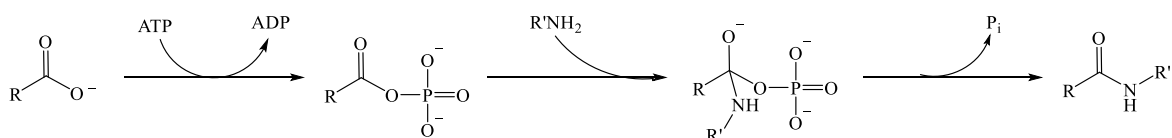
Sinteza peptidoglikana poteke v treh stopnjah (slika 1). Najprej v citoplazmi nastanejo topni nukleotidni prekursorji (UDP-*N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc), UDP-*N*-acetilmuramil pentapeptid), ki se v naslednji stopnji vežejo na lipidni nosilec. Nastali na lipid vezan disaharid-pentapeptidni monomer, t. i. lipid II, se nato prenese preko membrane. V zadnji stopnji poteče polimerizacija monomerov v glikansko verigo in vstavitev v sakulus (8).

V sintezo nukleotidnih prekursorjev so vključeni encimi GlmS, GlmM in GlmU, ki so odgovorni za nastanek UDP-GlcNAc iz fruktoze-6-fosfata ter encimi družine Mur, ki so odgovorni za nastanek UDP-MurNAc-pentapeptida. MurA in MurB katalizirata pretvorbo UDP-GlcNAc v UDP-*N*-acetilmuramin (UDP-MurNAc), medtem ko ligaze Mur C-F katalizirajo nastanek UDP-MurNAc-pentapeptida s pripenjanjem aminokislin (L-Ala, D-Glu) oz. diaminokislin (*mezo*-Dap ali L-Liz) in dipeptida (D-Ala-D-Ala) (9). Za nastanek monomerne enote disaharid-pentapeptid sta odgovorni membranski translokazi MraY in MurG. MraY katalizira prenos fosfo-MurNAc-pentapeptida iz citoplazemskega nukleotidnega prekursorja na membranski lipidni nosilec undekaprenil-fosfat (C₅₅-P), ob

tem nastane intermediat, ki ga imenujemo lipid I. Prenos GlcNAc iz UDP-GlcNAc na lipid I in nastanek lipida II katalizira MurG (7). Za prenos na zunanjo stran membrane je odgovoren transportni protein, imenovan flipaza, vendar si o njegovi identifikaciji niso enotni, saj sta znana vsaj 2 kandidata MurJ (10) in FtsW (11). Ko je lipid II na zunanji strani membrane se disaharid-pentapeptid odcepi od C₅₅-P in poteče polimerizacija monomernih enot v glikansko verigo ter navzkrižno povezovanje verig, za kar so odgovorni penicilin vezoči proteini (PBP) (12).

1.2 Ligaza MurF

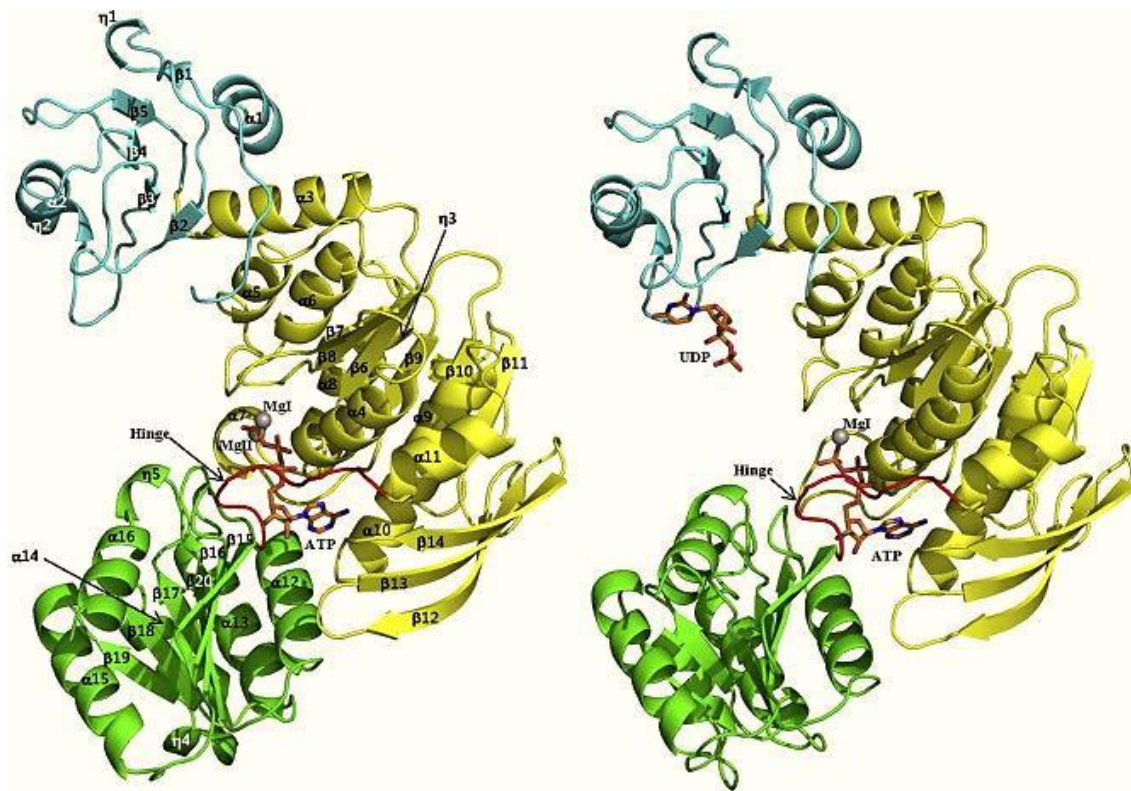
Serijsko od ATP odvisnih aminokislinskih ligaz (MurC–F) katalizira stopenjsko nastajanje pentapeptidne stranske verige na reducirano D-laktilno skupino UDP-MurNAc. Sočasno s tvorbo amidne ali peptidne vezi poteče tudi hidroliza ATP v ADP in anorganski fosfat (P_i) ob prisotnosti Mg²⁺ (slika 2) (13). MurF katalizira dodajanje D-Ala-D-Ala na UDP-MurNAc-tripeptid (UDP-prekurzor), kar je zadnji korak sinteze citoplazemskega prekurzorja peptidoglikana (14). V prvi stopnji poteče fosforilacija terminalne karboksilne skupine UDP-prekurzorja z γ -fosfatom ATP. Prosta amino skupina vstopajočega dipeptida (nukleofil) nato napade acilfosfatni intermediat, čemur sledi razpad nastalega tetraedričnega intermediota na UDP-MurNAc-pentapeptid in fosfat (9, 14).



Slika 2: Reakcijski mehanizem ligaz Mur. Povzeto po (9).

Ligaze Mur so sestavljene iz treh globularnih domen (slika 3). Njihova topologija spominja na nukleotid-vezoč vzorec zvitja, ki ga najdemo v mnogih ATP-vezočih proteinih. N- in C-terminalna domena sta skladni z znanim dinukleotid-vezočim vzorcem zvitja ATP-vezočih proteinov, medtem ko je osrednja domena skladna s klasičnim mononukleotid-vezočim zvitjem (13). Poleg tega je velika zanka med $\beta 8$ in $\alpha 5$ v centralni domeni udeležena v vezavo ATP in je najbolj ohranjeno zaporedje med ligazami Mur različnih bakterij (14). N-terminalna domena je udeležena pri vezavi UDP-prekurzorja, centralna domena v vezavo ATP in C-terminalna domena v vezavo aminokislina ali dipeptida (9). C-terminalna domena ima ključno vlogo pri omejevanju vezavnega mesta za ATP in pri ustvarjanju zanke za usmerjanje aminokislina v aktivno mesto (15). Ligaze Mur imajo med seboj

podobno topologijo osrednje in C-terminalne domene, medtem ko so pri N-terminalni domeni razlike predvsem zaradi dolžine UDP-prekurzorja. Za vse ligaze Mur je značilno, da se nahajajo v odprti in zaprti konformaciji (9).



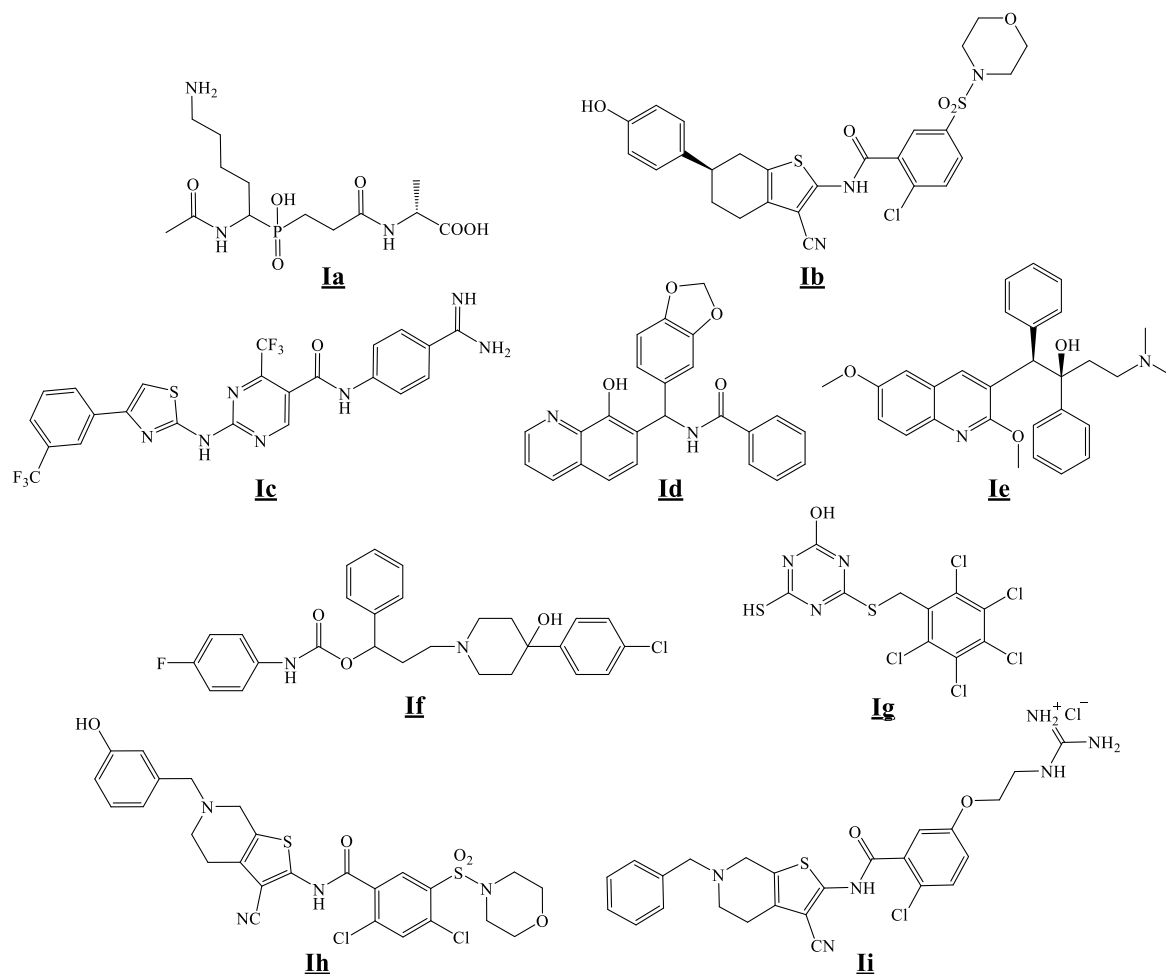
Slika 3: 3D struktura MurF z vezanim ATP (levo) in z vezanima UDP in ATP (desno). N-terminalna domena je obarvana v modri, centralna domena v rumeni in C-terminalna domena v zeleni barvi. Substrata ATP in UDP sta prikazana v obliki paličastega modela. Prirejeno po (16).

MurF se nahaja v odprti konformaciji in kot tak ni dovzeten za njegovo vezavo. Glede na to, da se ATP veže prvi, je ta odgovoren za konformacijsko spremembo encima, kar omogoči vezavo drugega in tretjega substrata (slika 3) (14). ATP se nahaja na površini med centralno in C-terminalno domeno in skupaj z aminokislinskimi ostanki v centralni domeni koordinira Mg^{2+} iona ter tako povzroči rotacijo C-terminalne domene proti centralni domeni, ki jo omogoča tečajna zanka med obema domenama (16). Ta konformacijska sprememba zagotovi pravilno vezavo drugega substrata (UDP-prekurzor), nato sledi še končna rotacija C-terminalne domene. Ko je encim v svoji zaprti konformaciji, sta oba vezana substrata skupaj in pravilno usmerjena za tvorbo acilfosfatnega intermediata. Ligaza veže in usmeri peptidni substrat (D-Ala-D-Ala) za nukleofilni napad, stabilizira nastali tetraedrični intermediat in z znižanjem aktivacijske bariere pospeši katalizo, ki jo olajšata tudi Mg^{2+} iona (15).

MurF nima človeških analogov, je edinstven in ohranjen med različnimi bakterijskimi vrstami, zato predstavlja obetajočo terapevtsko tarčo. Poleg tega uporablja za substrat le D-Ala-D-Ala, ki se metabolizira le v prokariontih in ima ključno vlogo pri premreženju celične stene (17), zato se pričakuje, da bodo MurF zaviralci širokospektralno in baktericidno delujoči antibiotiki in kemoterapevtiki (18).

1.2.1 Znani zaviralci ligaze MurF

Zaviralci ligaze MurF so a) psevdo-tri-/tetrapeptidni aminoalkilfosfoni, ki posnemajo prehodno stanje (**Ia**, slika 4) (19), b) sulfonamidi, ki se vežejo v UDP-MurNAc-tripeptid vezavno mesto (**Ib**, slika 4) (20), c) tiazolilaminopirimidini (**Ic**, slika 4) (21), d) kinolini (8-hidroksikinoloni (**Id**, slika 4) (22), diarilkinolini (**Ie**, slika 4) (23)) e) 4-fenilpiperidinski (**If**, slika 4) (22) in f) triazinski derivati (**Ig**, slika 4) (24). Na osnovi objavljenih struktur sulfonamidov so načrtovali dve generaciji zaviralcev MurF, ki temeljijo na cianotifenskem skeletu (**Ih** in **Ii**, slika 4) (25, 26). V zadnjih letih poskušajo razviti zaviralce, ki bi delovali na več ligaz Mur hkrati, saj imajo te ohranjena zaporedja aminokislin v aktivnem mestu, delujejo po enakem katalitskem mehanizmu in si delijo ključne strukturne značilnosti (15).



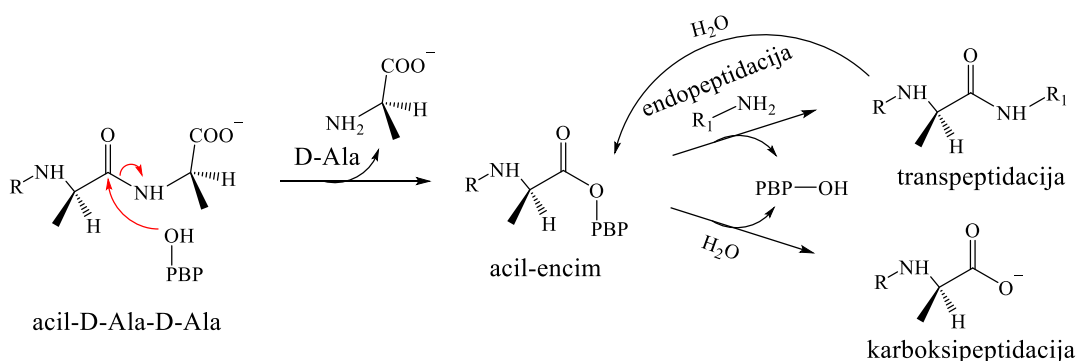
Slika 4: Znani zaviralci ligaze MurF. **Ia** predstavnik pseudo-tetrapeptidnih aminoalkilfosfinov, **Ib** predstavnik sulfonamidov, **Ic** predstavnik tiazolilaminopirimidinov, **Id** predstavnik 8-hidroksikinolonov, **Ie** predstavnik diarilkinolinov, **If** predstavnik 4-fenilpiperidinov, **Ig** predstavnik triazinskih derivatov, **Ih** predstavnik prve in **Ii** predstavnik druge generacije cianotifenov.

1.3 Penicilin vezoči proteini

PBP so D-alanil-D-alanin-peptidaze (DD-peptidaze) in katalizirajo končno transpeptidacijo v biosintezi bakterijske celične stene (27). PBP delimo glede na molekularno maso na dve glavni skupini, na PBP z visoko molekularno maso (HMM) in PBP z nizko molekularno maso (LMM). HMM so multimodularni PBP, odgovorni za polimerizacijo peptidoglikana in vstavitve v že obstoječo celično steno. Glede na strukturo in katalitično aktivnost N-terminalne domene jih delimo na A in B razred. V razredu A je N-terminalna domena odgovorna za glikoziltransferazno aktivnost (transglikozilacija) in katalizira podaljševanje glikanske verige (28). V razredu B ima N-terminalna domena po predvidevanjih vlogo pri morfogenezi celice, kjer interagira z drugimi proteini, ki so vpleteni v celični cikel (28) oz. ima vlogo veznega elementa, ki omogoča PBP primerno razdaljo do peptidoglikana (12).

C-terminalna domena ima v obeh razredih transpeptidazno aktivnost in katalizira navzkrižno povezovanje med dvema sosednjima glikanskima verigama (28). Pravimo, da so PBP HMMA bifunkcionalni in PBP HMMB monofunkcionalni encimi (12). PBP LMM so karboksipeptidaze in endopeptidaze, udeleženi so pri celični delitvi, zorenju ali obnavljanju peptidoglikana. Karboksipeptidaze cepijo terminalno vez med D-Ala-D-Ala in onemogočajo navzkrižno povezovanje, medtem ko endopeptidaze cepijo peptidne mostove med glikanskima verigama. PBP LMM se delijo na podrazrede A, B in C, nekateri jih delijo glede na podobnost z PBP LMM v *E. coli* (tip-4, tip-5, tip-7). Številčenje PBP zgodovinsko temelji na njihovem potovanju v SDS-PAGE za posamezno bakterijo, zato enako imenovanje dveh PBP le-te ne uvršča nujno v isti podrazred (28).

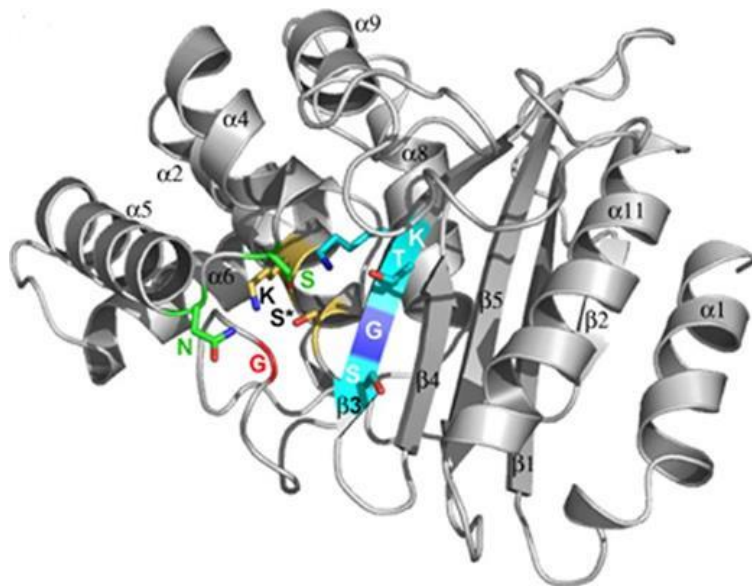
Karboksipeptidacija in transpeptidacija (slika 5) potekata po tristopenjskem mehanizmu. Prva stopnja je hitra in reverzibilna tvorba Henri-Michaelisovega kompleksa med encimom in pentapeptidno verigo, imenovano tudi donor peptidnega mostu. Sledi napad katalitsko aktivnega Ser (S*, Ser1) na karbonilni ogljikov atom na C-terminalni D-Ala-D-Ala peptidni vezi, sprosti se C-terminalni D-Ala (aciliranje) in pri tem nastane intermediat acil-encim. V zadnjem koraku (deaciliranje) poteče bodisi hidroliza in sprostitvev skrajšanega peptida (karboksipeptidacija), bodisi navzkrižno povezovanje z drugo peptidno verigo – imenovano akceptor peptidnega mostu (transpeptidacija). Pri endopeptidaciji pa pride do hidrolize prečnega mostu, ki je rezultat transpeptidacije (28).



Slika 5: Shematski prikaz reakciji, ki jih katalizirajo PBP. Povzeto po (29).

Kot že omenjeno je PBP skupna DD-peptidazna aktivnost, za katero je odgovorna penicilin vezoča (PB) domena. Sestavljena je iz dveh poddomen, prva vsebuje β -ploskev iz petih β -trakov, obdano s tremi α -vijačnicami, druga pa je sestavljena iz α -vijačnic. Med obema poddomenama leži aktivno mesto. Vsi PBP imajo ohranjenih devet aminokislinskih ostankov v aktivnem mestu (slika 6). S* se nahaja na začetku α 2-vijačnice, kjer se nahaja

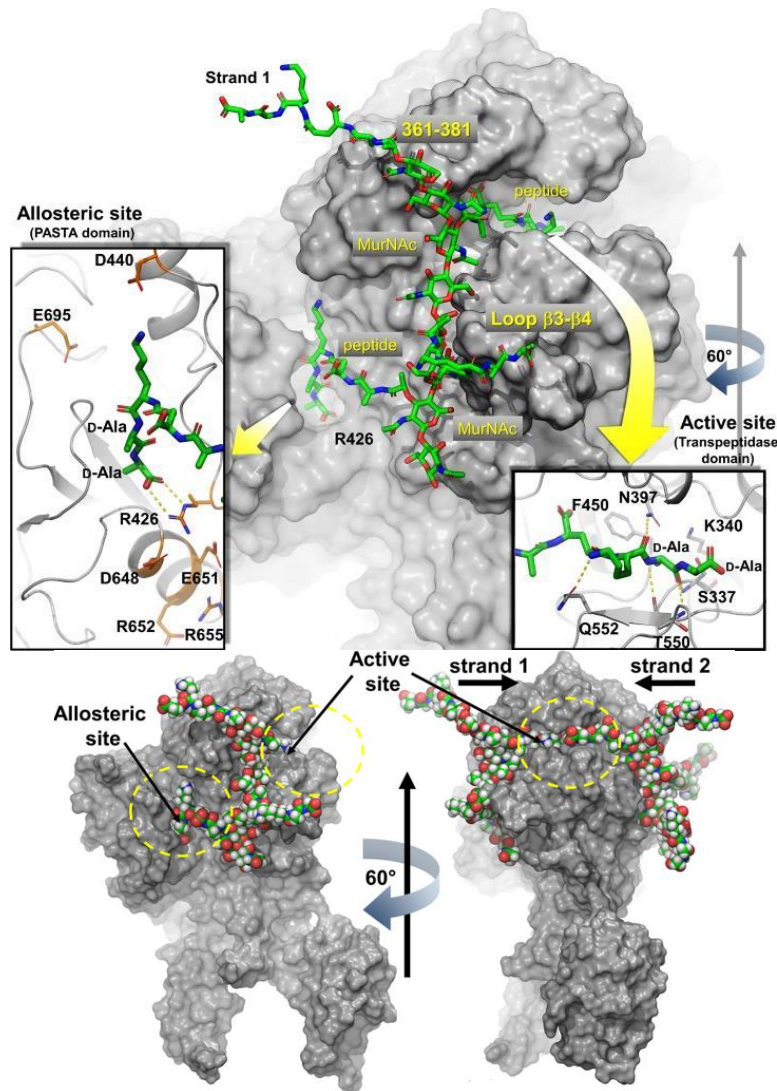
prvi ohranjeni motiv S*xxK (28). V zanki med $\alpha 4$ - in $\alpha 5$ -vijačnico se nahaja drugi motiv SxN in na koncu aktivnega mesta ($\beta 3$ -trak) je tretji ohranjeni motiv K(T/S)G(T/S) (27, 28). Deveti ohranjeni aminokislinski ostanek Gly, se nahaja na zadnji strani aktivnega mesta. Predzadnji D-Ala (D-Ala₁), donor peptidnega mostu, se tesno prilega aktivnemu mestu. Amidna skupina se nahaja med stransko verigo Asn iz SxN in ogrodjem $\beta 3$ -traku. Karbonilni kisik D-Ala₁ leži v oksianionski luknji, ki jo določata Ser1 in zadnja aminokislina tretjega motiva (T/S), medtem ko metilna skupina leži v hidrofobnem žepu (28). Vezava substrata v aktivno mesto inducira ugodno geometrijo za katalizo (27). Karboksilat izstopajočega D-Ala (D-Ala₂) je usmerjen proti OH skupinama tretjega motiva (T/S, S/T). Med devetimi ohranjenimi ostanki so Asn in obe OH skupini iz tretjega motiva odgovorni za pravilen položaj substrata v aktivnem mestu, Gly iz tretjega motiva omogoča neoviran vstop substrata v aktivno mesto (vsak večji ostanke bi sterično oviral vstop), medtem ko je Gly iz zadnje strani aktivnega mesta odgovoren za specifično vezavo D-Ala₁ (28). Sladkorno ogrodje akceptorja peptidne verige interagira z $\alpha 9$ - $\beta 3$ zanko (30).



Slika 6: Struktura aktivnega mesta PB domene. Prvi motiv S*xxK je obravan rumeno in označen s črnimi črkami. Drugi motiv SxN je obarvan zeleno in označen z zelenimi črkami. Tretji motiv je obarvan modro in označen z belimi črkami. Gly je obarvan rdeče in onznačen z rdečo črko. Prirejeno po (28).

Pri PBP HMM najdemo dodatno C-terminalno domeno na PB domeni. Sestavljena je iz ene ali dveh ponavljajočih se enot imenovanih PASTA (penicilin-vezavni proteini in domene povezane s Ser/Thr kinazami) (12, 28). Za PBP2x (*S. pneumoniae*) so ugotovili, da je PASTA alosterično mesto pri vezavi nastajajočega peptidoglikana, ki usmerja donorja peptidne verige v aktivno mesto (slika 7) (30). Pri PBP LMM tipa-4 sta v PB

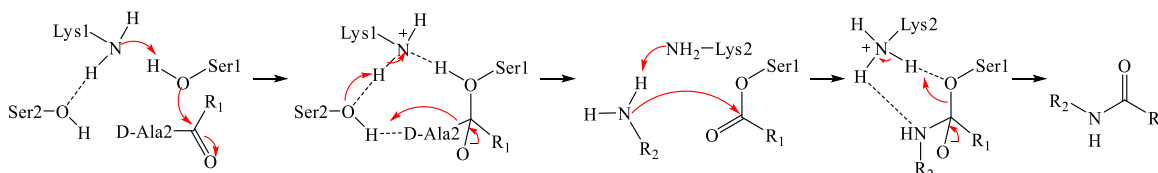
domeno vstavljene še dve domeni II in III (nista na N- oz. C-terminalnem koncu). Na koncu domene II so ostanki sedmih Lys, ki tvorijo pozitivni naboj površine domene. Tip-5 je biglobularen, njegova PB domena ne vsebuje N-terminalne zanke. Tip-7 se od tipa-5 razlikuje v odsotnosti C-terminalne domene (28).



Slika 7: Prepoznavanje pentapeptidne verige v alosteričnem in aktivnem mestu (zgoraj) ter vezava peptidoglikanske verige, ki je donor (strand 1) in peptidoglikanske verige, ki je akceptor peptidnega mostu (strand 2) v PBP2x (spodaj). Z rumenim krogom (spodaj levo) je označeno mesto navzkrižnega povezovanja med dvema pentapeptidnima verigama. Prirejeno po (30).

Aciliranje encima z D-Ala₁ poteka v oksianionski luknji. Za nukleofilni napad Ser1 je potreben odcep protona, za kar je odgovoren Lys iz S*xxK (Lys1) (slika 8). Proton se prenese na D-Ala₂ preko Ser iz SxN (Ser2). Za deaciliranje je potreben odcep protona iz akceptorja peptidne verige (amino skupina druge peptidne verige pri transpeptidaciji, voda pri karboksipeptidaciji), s čimer je omogočen napad na karbonylni C-atom estrske vezi intermediata acil-encim. Za odvzem protona je odgovoren Lys iz KTG(T/S) (Lys2), ta

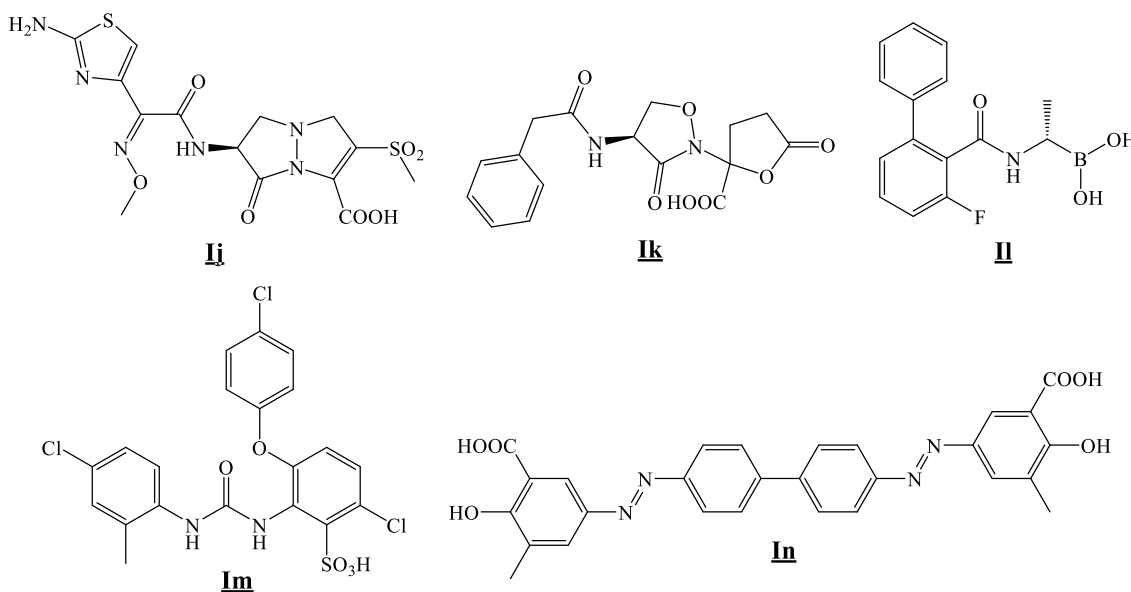
mora biti v deprotonirani obliki, ali Ser2 ob pomoči Lys2. Odvzeti proton se lahko vrne nazaj na Ser1. V aktivnem mestu se tako nahaja dvojni Lys–Ser sistem, eden odgovoren za aciliranje in drugi za deaciliranje encima, ki sta odvisna eden od drugega (27, 28).



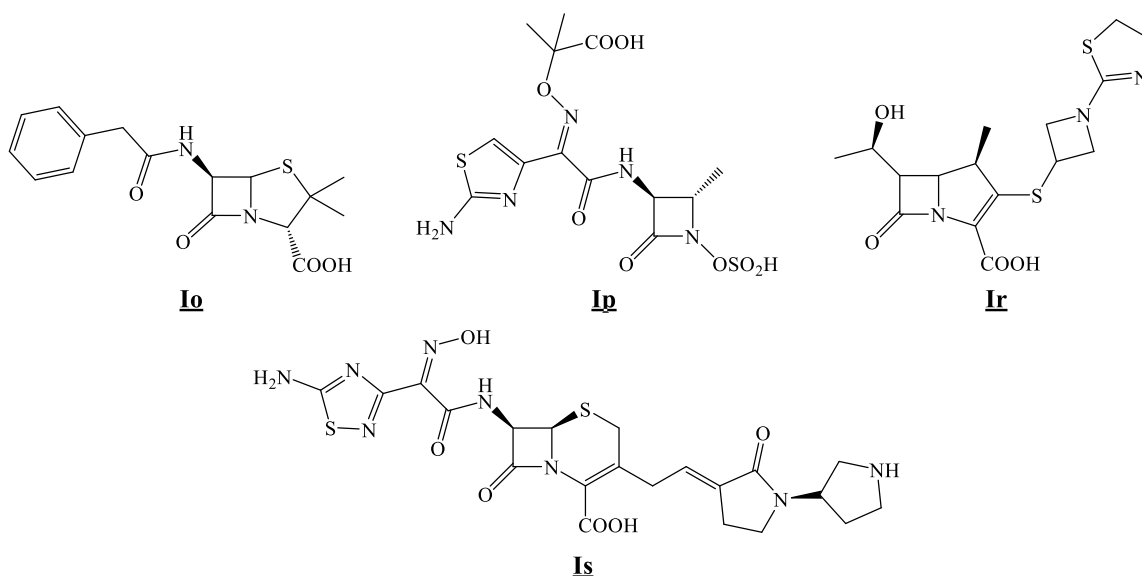
Slika 8: Mehanizem aciliranja in deaciliranja v aktivnem mestu. Povzeto po (27, 30).

1.3.1 Zaviralci PBP

Najbolj znani zaviralci PBP so β -laktamski antibiotiki, ki posnemajo terminalni del peptidne verige peptidoglikana D-Ala-D-Ala in se kovalentno vežejo na Ser1 v aktivnem mestu. Poznani so tudi drugi zaviralci PBP, ki ne vsebujejo β -laktamskega obroča in tvorijo kovalentno ali nekovalentne vezi z aktivnim mestom encima (slika 9) (31). Od vseh skupin antibiotikov so trenutno najbolj uporabljeni β -laktamski antibiotiki (slika 10), od katerih so najbolj predpisovana skupina cefalosporini. Ostale skupine so še penicilini, karbapenemi in monociklični β -laktamski antibiotiki (32).

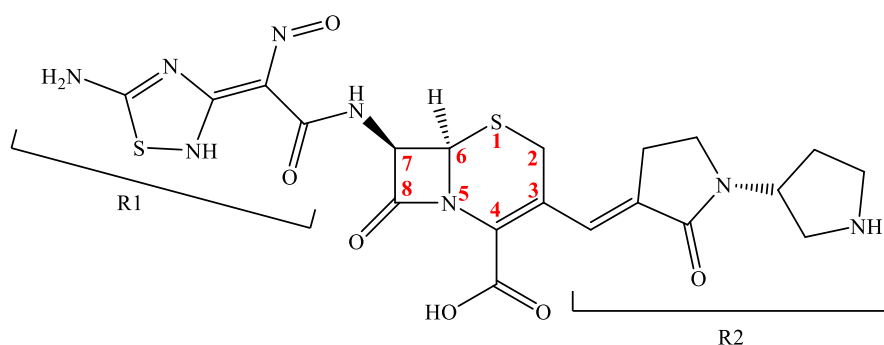


Slika 9: Predstavniki kovalentnih (**Ij**, **Ik**, **Il**) in nekovalentnih (**Im**, **In**) ne- β -laktamskih zaviralcev PBP. Povzeto po (5).



Slika 10: β -laktamski antibiotiki. **I_o** penicilin G (penicilin), **I_p** aztreonam (monociklični β -laktamski antibiotik), **I_r** tebipenem (karbapenem) in **I_s** ceftobiprol (cefalosporin). Povzeto po (12, 33).

1.4 V. generacija cefalosporinov



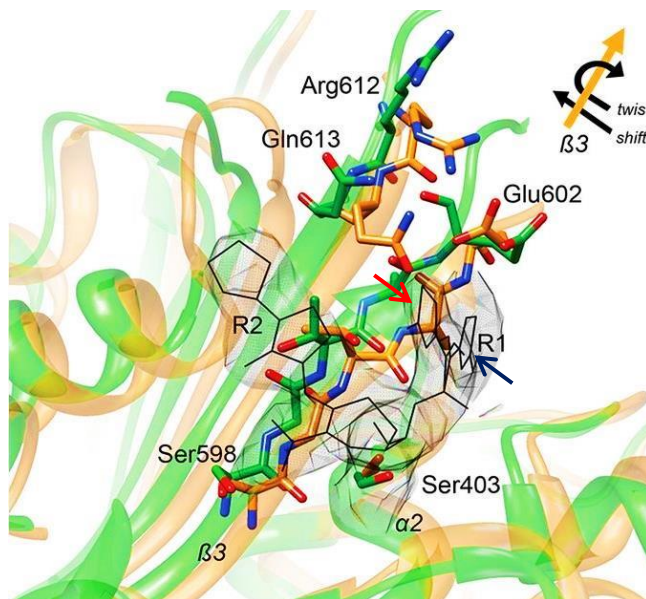
Slika 11: Struktura ceftobiprola.

Ceftobiprol (slika 11) je cefalosporinski antibiotik V. generacije. Pomemben je predvsem zato, ker ima širok spekter delovanja proti različnim vrstam G⁻ in G⁺ bakterij, med drugim izkazuje delovanje na na meticilin odporen *Staphylococcus aureus* (MRSA). Njegov širok spekter delovanja je posledica odličnega prileganja z aktivnimi mesti različnih PBP (HMM, LMM) G⁺ in G⁻ bakterij (34, 35) in hkrati nizke afinitete do aktivnih mest večine β -laktamaz (34). Je potencialni zaviralec vseh tipov PBP, a ne ustreza pravilu Lipinskega, kar je sicer lastnost večine antibiotikov. Ker je njegova molekulska masa nad 500 g/mol, sta njegova permeabilnost in biološka uporabnost zaradi tega zmanjšani (35). Njegovo učinkovitost pripisujejo hitremu aciliranju encima, visoki intrinzični afiniteti in počasnemu deaciliranju (36). Stanska veriga 7-aminotriazolimidroksiimin (R1) je stabilna na hidrolizo z nekaterimi β -laktamazami (*S. aureus*, β -laktamaze razredov A in C, ki jih proizvajajo G⁻ bakterije) (36, 37). Poleg tega je vinilpiperolidinonska skupina (R2) na mestu

C3 odgovorna za interakcije z ozkim režnjem encima (v katerem se nahaja aktivno mesto) in favorizira njegovo aciliranje (36), hkrati pa pozitivni naboj na pirolidinskem N prispeva k aktivnosti proti rodu *Pseudomonas* (37).

1.4.1 Vezava ceftobiprola v aktivno mesto PBP2a MRSA

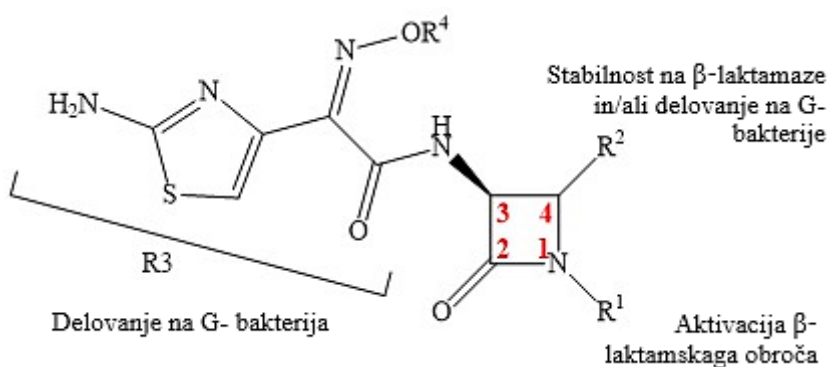
Zdi se, da tvori ceftobiprool dve konformaciji v aktivnem mestu. Konformacija A (rdeča puščica, slika 12) je bolj značilna za PBP LMM, aminotiadiazolni substituent na mestu R1 je usmerjen proti vinilpirolidinonskemu substituentu na mestu R2 in Thr600 (tretji motiv). Pri konformaciji B (modra puščica, slika 12) je substituent R1 orientiran stran od R2, proti S*, kar je značilna predvsem za PBP HMM. Planarnost in hidrofobnost R2 sta bistveni lastnosti, omogočata dostop do ozkega aktivnega mesta in tesno prileganje s Tyr446, Met641 in Thr600 ter posnemata značilnost pentaglicinskega mostu (značilni medpeptidni most v strukturi peptidoglikana pri *S. aureus* (6)). Met641, Thr600 in Tyr446 tvorijo z obročem R2 II-II interakcije, dodatne van der Waalsove vezi z R2 (ki jih ni pri penicilinu in metaciklinu) pa povečajo vezavno afiniteto in zato tudi hitrost aciliranja. CO in NH skupini R2 nista udeleženi v tvorbi vodikovih vezi. Ob vezavi pride do obračanja centralne β -ploskve, β 3-trak spremeni položaj in orientacijo aminokislinskih ostankov Ser598, Gly599 in Thr600 (KSGT) in zato ne pride do steričnega prekrivanja z β -laktamom. Konformacijska sprememba (slika 12) vključuje tudi premikanje N-terminalnega dela α 2-vijačnice, tako da Ser403 (S*) postane bolj izpostavljen in zato bolj dovzeten za aciliranje. Odpiranje β -laktamskega obroča prisili R1 in R2 skupini v neposredno medsebojno interakcijo, ki je omogočena v konformaciji A (36).



Slika 12: Vezava ceftobiprola v PBP2a. Slika prikazuje konformacijske spremembe (v zelenem) v strukturi PBP2a ob vezavi ceftobiprola. Prost PBP2a je obarvan oranžno. Struktura ceftobiprola (v črnem) je prikazana v obeh možnih konformacijah, ki sta označeni s puščicama (A – rdeča puščica, B – modra puščica). Prirejeno po (36).

1.5 Monobaktam

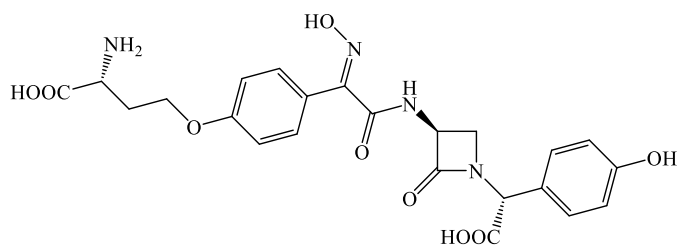
Naravni monobaktami ne izražajo znatne protibakterijske aktivnosti. Njihov spekter delovanja je omejen na G⁻ bakterije, vendar se s sintezno modifikacijo stranskih verig njihov spekter delovanja razširi. Prvi in edini sintezni monociklični β -laktam v klinični uporabi je aztreonam (**Ip**, slika 10).



Slika 13: Splošen SAR monobaktamov. Prirejeno po (33).

Biološko aktivnost je odvisna predvsem od substituentov na mestih N1, C3 in C4 β -laktamskega obroča (slika 13). Elektron-privlačna skupina na mestu N1 (sulfonska skupina, SO_3^-) je odgovorna za aktivacijo β -laktamskega obroča, kar olajša aciliranje S^* v aktivnem mestu. Stranska veriga na mestu C3 je povezana s protibakterijsko aktivnostjo in jakostjo, medtem ko je za odpornost na β -laktamaze v glavnem odgovoren substituent na

mestu C4. Dobro poznan strukturni element aminotiazoloksim poveča specifično aktivnost proti G⁻ bakterijam. Naravni antibiotik nokardicin A (**It**, slika 14) in njegovi sintezni analogi (nokardicini) imajo v stranski verigi R¹ karboksilno kislino na α -mestu v (*R*) konformaciji, kar izboljša stik s tarčo. Aromatski ali heterociklični substituenti v stranski verigi R¹ širijo spekter delovanja proti G⁻ in/ali G⁺ bakterijam (33).

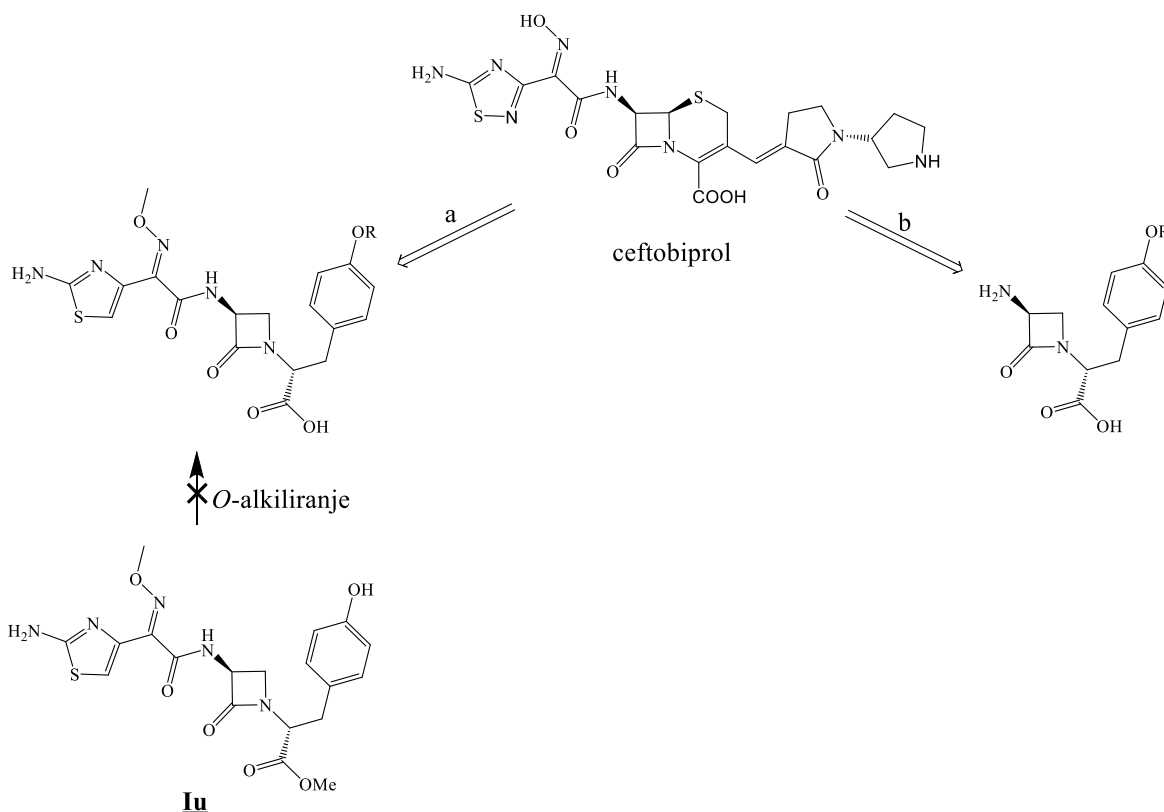


It

Slika 14: Struktura nokardicina A.

2 Namen in načrt dela

Na Fakulteti za farmacijo, Univerze v Ljubljani, pripravljajo monobaktamske antibiotike kot sintezne mimetike ceftobiprola, cefalosporinskega antibiotika V. generacije (slika 15). Poleg zaviranja PBP se predvideva, da bi sintetizirani D-Ala-D-Ala mimetiki brez aminotiazolnega substituenta predstavljali lažni substrat za MurF in se tako že v zgodnji fazi sinteze vgradili v nastajajoči peptidoglikan.

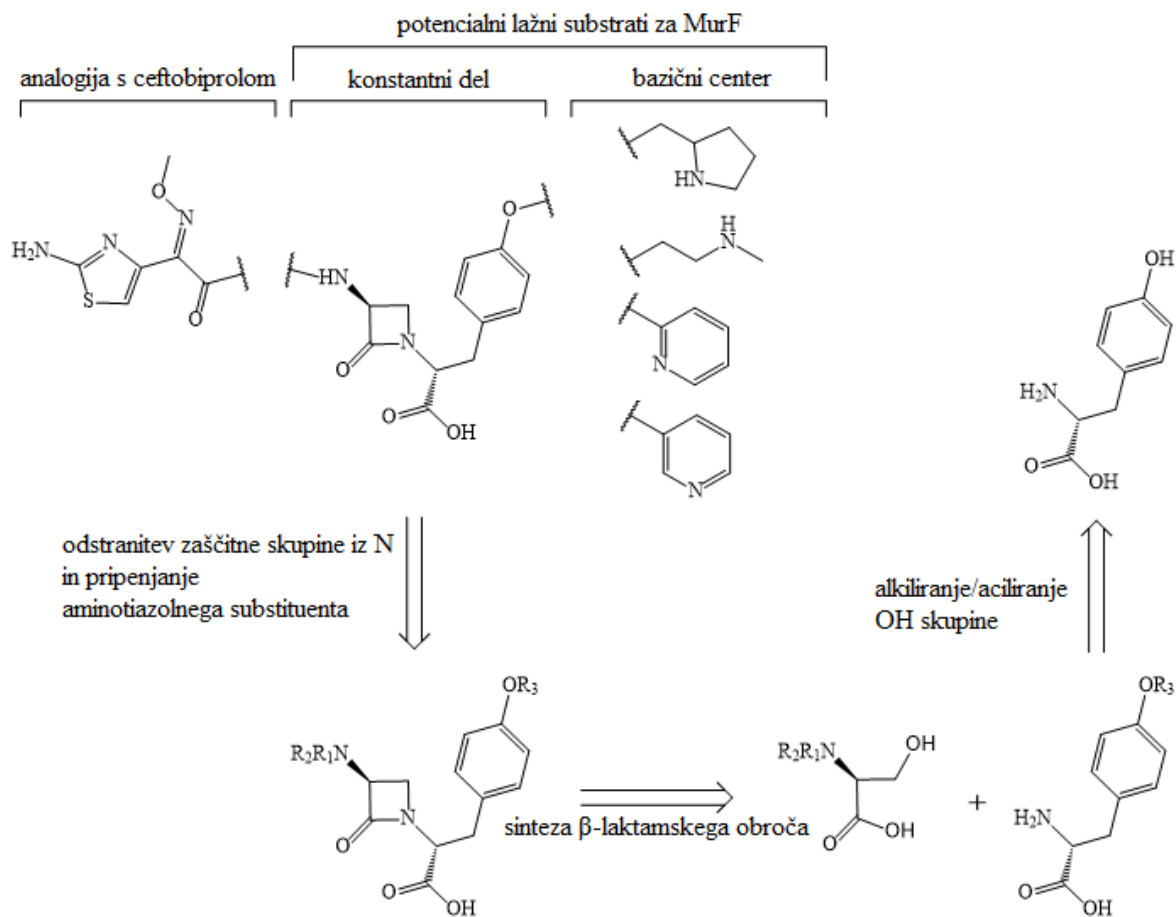


Slika 15: Načrtovani mimetiki ceftobiprola (puščica a) in krajši D-Ala-D-Ala mimetiki (puščica b).

Mimetike ceftobiprola (puščica a, slika 14) so poskušali sintetizirati z alkiliranjem OH skupine v stranski verigi na mestu N1 na že obstoječi spojini (**Iu**, slika 14), po tvorbi β -laktamskega obroča in pripenjanju stranske verige na mestu C3. Poskus je bil neuspešen, saj obstoječa spojina v svoji strukturi vsebuje funkcionalne skupine, ki v reakciji predstavljajo potencialne nukleofile in lahko motijo alkiliranje šibko kisle OH skupine. Poleg tega so pogoji Ullmannove reakcije precej ostri (visoka T, bazični pogoji) in ne amidna skupina, ne β -laktamski obroč nista pretirano stabilna pod temi pogoji. Iz teh razlogov bomo načrtovali sintezno pot po kateri bomo fragmente vgraditi že na samem začetku sinteze, pred tvorbo β -laktamskega obroča, kjer uporaba ostrih pogojev ni problematična in struktura ne vsebuje toliko potencialnih nukleofilov. Na ta način bomo poleg mimetikov

ceftobiprola hkrati sintetizirali tudi krajše mimetike D-Ala-D-Ala (puščica b, slika 14), ki bi zaradi analogije med strukturama D-Ala-D-Ala in β -laktamskaga obroča delovali na ligazo MurF ter tako predstavljali novo skupino spojin z delovanjem na MurF.

V okviru magistrske naloge bomo poskušali oblikovati sintezno pot za pripravo monobaktamov iz aminokislin D-tirozina in L-serina (slika 16), pri tem bomo β -laktamski obroč sintetizirali po alkiliranju/ariliranju OH skupine. Iz strukture ceftobiprola bomo ohranili stransko verigo na mestu C3 (aminotiadiazoloksimski substituent), ki se je kot učinkovita izkazala tako pri cefalosporinih kot pri monobaktamih. Derivati se bodo med seboj razlikovali v stranski verigi na mestu N1, terminalni konec pa bo v svoji strukturi vseboval bazični center. Za krajše D-Ala-D-Ala mimetike predvidevamo, da bodo, glede na strukturo in mehanizem delovanja ligaze MurF, vstopili v nastajajočo verigo peptidoglikana in tako delovali kot lažni substrat, ki bo opravljal vlogo "trojanskega konja". To je v nasprotju z običajnim načinom, kjer se β -laktamski antibiotik veže v aktivno mesto encima in tam opravlja svojo vlogo. Tak način načrtovanja novih protibakterijskih učinkovin zaenkrat še ni bil preizkušen v farmacevtski kemiji protibakterijskih učinkovin. Cilj magistrske naloge je torej razviti sintezno metodo za pripravo monobaktamskih antibiotikov z variabilnim delom na mestu N1, ki bodo zavirali PBP in/ali bodo lažni substrati za MurF ter optimizirati posamezne sintezne stopnje .



Slika 16: Shema zelenih spojin z načrtovano sintezno potjo.

3 Materiali in metode

3.1 Materiali

Pri eksperimentalnem delu smo uporabljali kemikalije različnih proizvajalcev (Acros Organics, Fluca, Merck, Sigma-Aldrich), brez predhodne obdelave. Brezvodni THF smo pripravili tik pred uporabo z destilacijo ob prisotnosti natrija in benzofenona v inertni atmosferi. Brezvodni DMF smo predhodno pripravili in shrani nad molekularnimi siti.

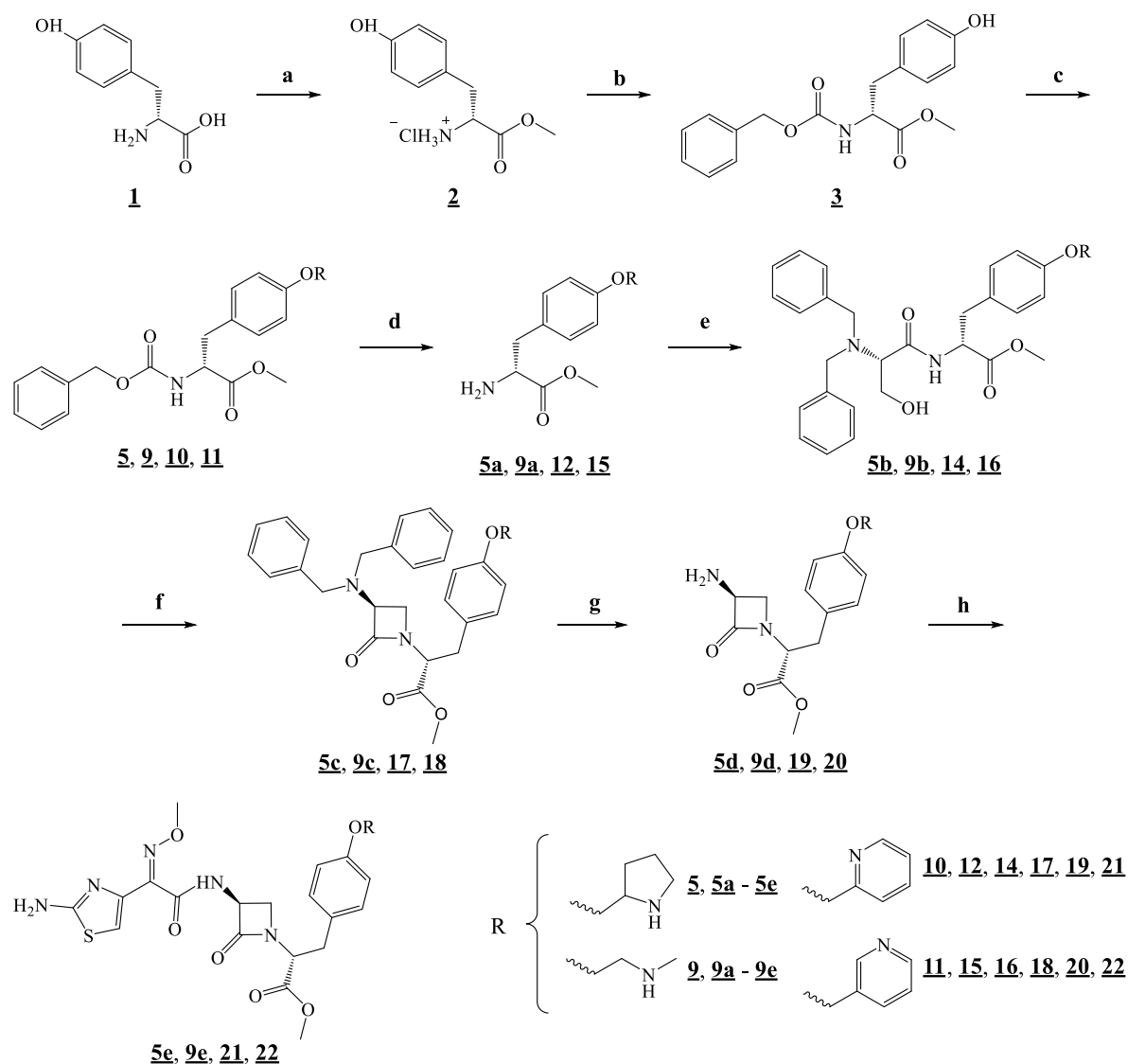
3.2 Metode

Brezvodne reakcijske pogoje smo zagotovili s prepihanjem z argonom. Segrevanje reakcijskih zmesi v mikrovalovnem reaktorju smo izvedli z aparaturo CED Discover. Potek kemijskih reakcij smo spremljali z aluminijastimi ploščami s silikagelom 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck. Za razvijanje smo uporabili različne mobilne faze, te so navedene pri posameznih reakcijah. Lise smo detektirali pod UV svetlobo ($\lambda = 245$ nm, $\lambda = 366$ nm) in z orositvenimi reagenti (ninhidrin, FeCl₃, KMnO₄). Spojine smo očistili s kolonsko kromatografijo. Pri tem smo uporabili silikagel 60 (premer delcev: 0,04 – 0,064 mm) proizvajalca Merck in različne mobilne faze, ki so navedene pri posameznih produktih. HPLC analize (potek kemijskih reakcij, končne spojine) smo izvedli na instrumentu Agilent Technologies 1100 z UV-VIS detektorjem G1365B ($\lambda = 254$ in 220 nm). Za spremljanje reakcij smo uporabili kolono Agilent Eclipse Plus C18 (4,6 x 150 mm, velikost delcev 5 μ m), pretok mobilne faze 1,0 mL/min, volumen injiciranja 5 μ L in gradientno elucijo z mobilno fazo 90 % ACN v H₂O. Za končno identifikacijo sintetiziranih spojin smo uporabili kolono Agilent Extend C18 (4,6 x 150 mm, velikost delcev: 3,5 μ m), pretok mobilne faze 1,0 mL/min, volumen injiciranja 5 μ L in izokratsko elucijo z mobilno fazo 0,1 % TFA v H₂O. Za vrednotenje epimerizacije smo uporabili kolono Kromasil 3-Cellucoat (4,6 x 150 mm, velikost delcev 3,5 μ m), pretok mobilne faze 1,0 mL/min, volumen injiciranja 5 μ L in izokratsko elucijo z mobilno fazo heksan/izopropanol = 85:15. ¹H in ¹³C NMR smo posneli s spektrometrom Bruker AVANCE III 400 MHz. Vzorce smo pred analizo raztopili v 600 μ L devteriranem topilu (CDCl₃, DMSO-d₆, aceton), katerim je že dodan interni standard (TMS). Za obdelavo spektrov smo uporabili računalniški program NMRNotebook 2.80, proizvajalca NMRtec S.A.S. IR spektre smo posneli s spektrometrom Thermo Nicolet Nexus 470 ESP FT-IR z ATR tehniko. Za obdelavo spektrov smo uporabili programsko opremo Omnic E.S.P. 5.3, proizvajalca

TermoFisher Scientific™. Masne spektre za vmesno identifikacijo spojin smo posneli s spektrometrom ADVION expression CMLS, medtem ko so bili masni spektri visoke ločljivosti (HRMS) za končno identifikacijo spojin posneti z masnim spektrometrom Waters Q-Tof Premier ali VG-Analytical Autospec Q v Centru za masno spektrometrijo na Institut Jožef Stefan. Optično sučnost sintetiziranih spojin smo izmerili s polarimetrom PerkinElmer 241 MC ($\lambda = 589,592$ nm, $l = 1$ dm). Določena vrednost je povprečna vrednost 5 zaporednih uspešnih meritev (integracijski čas 5 s). Temperaturo tališča smo določili z mikroskopom z ogrevalno mizico Leica Cambridge Instruments, vrednosti niso korigirane. Za risanje in poimenovanje spojin smo uporabili računalniški program ChemDraw Professional 16.0, proizvajalca PerkinElmer Informatics. Za iskanje sinteznih postopkov in eksperimentalnih podatkov za spojine smo uporabili spletni brskalnik SciFinder.

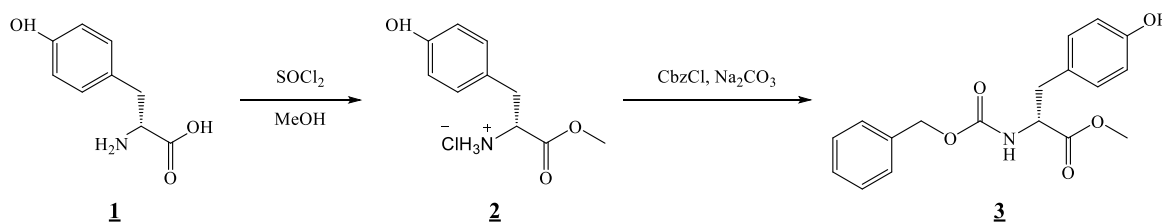
4 Eksperimentalni del

4.1 Splošna sintezna pot



Reagenti in reakcijski pogoji: (a) SOCl_2 , MeOH, sobna temperatura, (b) CbzCl, Na_2CO_3 , sobna temperatura, (c) O-alkiliranje/O-ariliranje, (d) H_2 , Pd-C, sobna temperatura, (e) *N,N*-dibenzil-L-serin, HOBt, EDC, NMM, CH_2Cl_2 , sobna temperatura, (f) PPh_3 , DEAD, THF, (g) H_2 , Pd-C, sobna temperatura, (h) 2-2-(aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)ocetna kislina, CH_2Cl_2 , sobna temperatura.

4.2 Sinteza metil *N*-((benziloksi)karbonil)-*D*-tirozinata (**3**)



4.2.1 Prva sintezna pot

Tyr (**1**, 1 ekv., 2,50 g, 13,8 mmol) smo suspendirali v MeOH (92 mL). Na ledeni kopeli (0 °C) smo po kapljicah dodali SOCl_2 (1,5 ekv., 1,5 mL, 20,7 mmol) in pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. MeOH smo uparili pod znižanim tlakom. Dobljene bele kristale smo suspendirali v dietiletru in odnučali ter dobili bele kristale (2,59 g, 80,93 %). Spojino **2** (1 ekv., 2,59 g, 11,2 mmol) smo raztopili v mešanici $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{H}_2\text{O} = 1:1$ (80 mL) in ohladili na ledeni kopeli, dodali Na_2CO_3 (1,3 ekv., 1,54 g, 14,5 mmol) ter po kapljicah dodajali CbzCl (1 ekv., 1,64 mL, 11,2 mmol). Na sobni temperaturi smo pustili mešati 3 ure. Izmerjen bazičen pH (7–8) je nakazal konec reakcije. Reakcijski zmesi smo dodali H_2O (50 mL) in CH_2Cl_2 (50 mL) ter odnučali zaostanek oborine. Matičnico smo ekstrahirali z CH_2Cl_2 (3 x 50 mL). Združene organske faze smo sprali z nasičeno raztopino NaCl, sušili nad brezvodnim Na_2SO_4 in prefiltrirali ter uparili CH_2Cl_2 pod znižanim tlakom. Dobljeno rumeno obarvano viskozno tekočino smo očistili s kolonsko kromatografijo (silikagel, mobilna faza: heksan/EtOAc = 1:1) in izolirali spojino **3** kot prozorno tekočino, ki je čez noč kristalizira v bele kristale (2,68 g, 72,8 %).

4.2.2 Druga sintezna pot

Spojino **1** (1 ekv., 2,50 g, 13,8 mmol) smo suspendirali v MeOH (100 mL). Na ledeni kopeli (0 °C) smo po kapljicah dodali SOCl_2 (1,5 ekv., 1,5 mL) in pustili mešati čez noč na sobni temperaturi ter MeOH uparili pod znižanim tlakom. Dobili smo bele kristale spojine **2**, ki smo jo brez predhodnega čiščenja (prepostavljen 100 % izkoristek: 1 ekv., 3,20 g, 13,81 mmol) raztopili v mešanici dioksan/ $\text{H}_2\text{O} = 1:1$ (80 mL). Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli, dodali Na_2CO_3 (1,3 ekv., 1,90 g, 18,0 mmol) in po kapljicah tekem 1,5 ure dodajali CbzCl (1 ekv., 2 mL, 13,8 mmol). Reakcijski zmesi smo dodali EtOAc (150 mL) in H_2O (50 mL) ter ločili obe fazi. Vodno fazo smo še dodatno ekstrahirali z EtOAc (2 x 50 mL). Organsko fazo smo sprali z 1 M HCl (2 x 25 mL) in nato

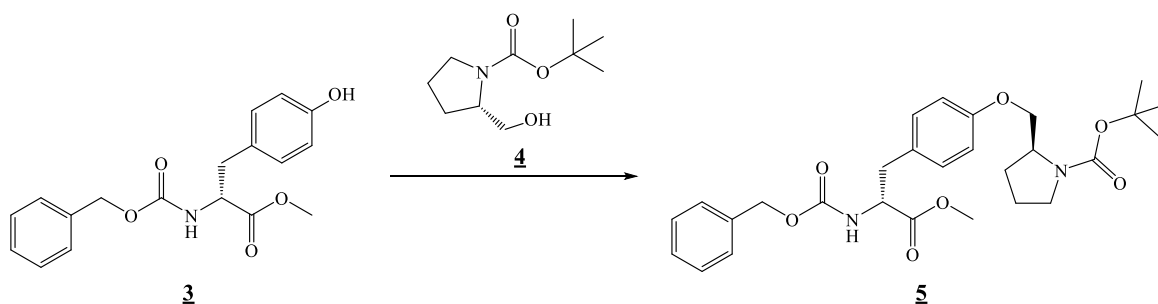
združene frakcije sprali z nasičeno raztopina NaCl (2 x 25 mL), sušili nad brezvodnim Na₂SO₄ in prefiltrirali. EtOAc smo uparili pod znižanim tlakom. Dobljeno rumeno viskozno tekočino smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: heksan/EtOAc = 1:1) in ob tem izolirali spojino **3** kot prozorno tekočino, ki je čez noč kristalizira v bele kristale (4,37 g, 96,1 %).

4.2.3 Identifikacija metil *N*-((benziloksi)karbonil)-*D*-tirozinata (**3**)

Tališče: 84,2–84,6 °C. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2,96 (dd, *J* = 14,0 Hz, 6,0 Hz, 1H, Tyr-CH₂-H_a), 3,04 (dd, *J* = 14,0 Hz, 6,0 Hz, 1H, Tyr-CH₂-H_b), 3,70 (s, 3H, OCH₃), 4,61 (dt, *J* = 8,4 Hz, 6,0 Hz, 1H, Tyr-CH), 5,06 (d, *J* = 12,5 Hz, 1H, Bn-CH₂-H_a), 5,10 (d, *J* = 12,3 Hz, 1H, Bn-CH₂-H_b), 5,37 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, NH), 6,59 (s, 1H, OH), 6,68 (d, *J* = 8,4 Hz, 2H, Tyr-2 x CH), 6,90 (d, *J* = 8,5 Hz, 2H, Tyr-2 x CH), 7,22–7,37 (m, 6H, 5 x Bn-CH in CHCl₃) ppm. ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 37,44 (Tyr-CH₂), 52,53 (OCH₃), 55,08 (Tyr-CH), 67,25 (Bn-CH₂), 115,64 (Tyr-2 x CH), 127,02 (Tyr-C), 128,12 (Bn-2 x CH), 128,30 (Bn-CH), 128,59 (Bn-2 x CH), 130,37 (Tyr-2 x CH), 136,04 (Bn-C), 155,35 (Tyr-COH), 156,04 (Bn-C), 172,46 (C=OO) ppm. IR (ATR): ν 3401, 3318, 3035, 2957, 2919, 1716, 1687, 1526, 1515, 1253, 1221, 1018 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* = 328,1 (100, [M-H]⁻). HRMS za C₁₈H₁₈NO₅: izračunana 328,1185, ugotovljena 328,1177. HPLC: retencijski čas: 9,09 min (96,1 % pri 220 nm, 97,6 % pri 254 nm). [α]_D = + 19,1 (0,23, MeOH).

4.3 Sinteza *tert*-butil (*S*)-2-((4-((*R*)-2-(((benziloksi)karbonil)amino)-3-metoksi-3-oksopropil)fenoksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (**5**)

4.3.1 Mitsunobujeva reakcija



Spojino **3** (1 ekv.), PPh₃ (1,5 ekv.) in *N*-Boc-*L*-prolinol (**4**) (1 ekv.) smo raztopili v brezvodnem topilu in ohladili na ledu ter dodali po kapljicah azodikarboksilat (1,5 ekv.) pod Ar. Reakcijsko zmes smo pustili mešati na ledu čez noč.

Preglednica I: Reagenti in reakcijski pogoji pri poskusu sinteze spojine **5**.

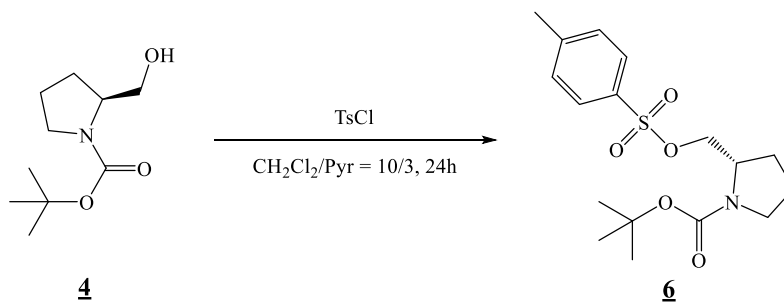
Fosfin	Azodikarboksilat	Topilo	Temperatura ledene kopeli	η [%]
PPh ₃	DIAD	THF	0 °C	-
PPh ₃	DIAD	Toluen/THF = 3/2	0 °C	3,3
PPh ₃	DEAD	THF	-15 °C	15,0
P(But) ₃	ADDP	THF	0 °C	1,3

V prvem primeru smo uparili topilo in surovo zmes poskušali čistiti z adsorpcijsko kolonsko kromatografijo (silikagel, mobilna faza: heksan/EtOAc = 2:1). Iz ¹H NMR spektra nismo mogli identificirati produkta, tega je potrdila še MS. V ostalih primerih smo izkoristek ocenili s HPLC. Ta je najvišji v primeru, kjer smo uporabili DEAD in najnižji v primeru, kjer smo uporabili kombinacijo ADDP/P(But)₃.

Poleg tega smo spojino **5** poskušali sintetizirati s predhodno tvorbo betaina, tako da smo v brezvodnem THF raztopili PPh₃ in na ledeni kopeli dodali DIAD. Nastali betain smo pod Ar na ledeni kopeli po kapljicah dodali zmesi **3** in **4** v brezvodnem THF. Izkoristek je primerljiv z izkoristkom v primeru uporabe DEAD (15,1 %). Zaradi nizkih izkoristkov smo opustili to sintezno pot.

4.3.2 Sinteza *tert*-butil (*S*)-2-((4-((*R*)-2-(((benziloksi)karbonil)amino)-3-metoksi-3-oksopropil)fenoksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (**5**) s pomočjo tozilata

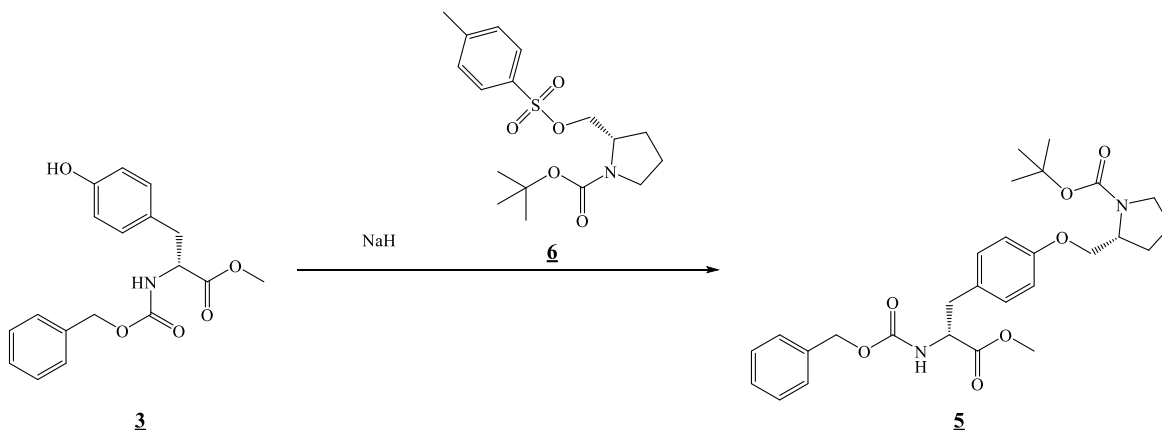
4.3.2.1 Sinteza *tert*-butil (*S*)-2-((toziloksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (**6**)



Spojino **4** (1 ekv., 1,00 g, 5,0 mmol) smo raztopili v mešanici CH₂Cl₂/piridin = 10:3 (13 mL), ohladili na ledeni kopeli in pod Ar dodali TsCl (1,25 ekv., 1,22 g, 6,3 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč na sobni temperaturi. Dodali smo CH₂Cl₂ (10 mL) in ekstrahirali z H₂O (2 x 10 mL), 10 % citrsko kislino (2 x 10 mL) in nasičeno NaCl (10 mL). Organsko fazo smo sušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in uparili CH₂Cl₂ pod znižanim tlakom. Dobili smo rumeno obarvano spojino **6** oljne konsistence (1,44 g, 81,5

%). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1,33–1,43 (m, 9H, Boc-3 x CH_3), 1,76–1,97 (m, 4H, Pro-2 x CH_2), 2,45 (s, 3H, Ar- CH_3), 3,22–3,37 (m, 2H, Pro- CH_2N), 3,83–4,16 (m, 3H, Pro-CH in OSO_2CH_2), 7,31–7,38 (m, 2H, Ar-2 x CH), 7,78 (d, $J = 8,3$, 2H, Ar-2 x CH) ppm. Kemijski premiki in sklopitvene konstante so skladni z literaturnimi podatki (38).

4.3.2.2 Poskus sinteze *terc*-butil (*S*)-2-((4-((*R*)-2-(((benziloksi)karbonil)amino)-3-metoksi-3-oksopropil)fenoksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (**5**)



Spojino **3** smo raztopili v brezvodnem topilu, ohladili na ledeni kopeli in dodali bazo. Reakcijsko zmes smo pustili mešati 20 minut na ledeni kopeli in še 20 minut na sobni temperaturi. Nato smo pod Ar dodali spojino **6**, ki smo jo predhodno raztopili v brezvodnem topilu (1 mL). Mešali smo v inertni atmosferi na 80 °C čez noč. Da bi povečali izkoristek smo poskusili zgoraj opisano reakcijo pripraviti še z uporabo drugih topil in baz.

Preglednica II: Baze in topila pri poskusu sinteze **5**.

3	6	Baza	Topilo
1,33 ekv.	1 ekv.	1,5 ekv. NaH	2,35 mL THF
1,33 ekv.	1 ekv.	1,5 ekv. NaH	2,35 mL DMF
1,33 ekv.	1 ekv.	1,5 ekv. K_2CO_3	2,35 mL Ac_2O
1 ekv.	1,3 ekv.	1,5 ekv NaH	2,4 mL THF
1 ekv.	1,3 ekv.	1,5 ekv. NaH	2,4 mL DMF
1 ekv.	1,3 ekv.	1,5 ekv. K_2CO_3	2,4 mL Ac_2O

V prvem primeru smo dodali dietileter (3 mL) in H_2O (2 mL) ter ekstrahirali z 1 M NaOH (3 x 2 mL) in nasičeno NaCl (2 mL). Organsko fazo smo sušili z Na_2SO_4 , prefiltrirali,

uparili topilo pod znižanim tlakom in očistili z adsorpcijsko kolonsko kromatografijo (mobilna faza: heksan/EtOAc = 2:1). Izolirali smo spojino **5**. V ostalih primerih smo opazovali s TLC in HPLC. Količina produkta je zanemarljiva. Več produkta je nastalo ob uporabi prebitne količine spojine **6**. Reakcija je bolje potekla v THF, najslabše v DMF.

Spojino **5** smo po zgoraj opisanem postopku poskušali pripraviti s segrevanjem v mikrovalovnem reaktorju. Uporabili smo prebitno količino spojine **6**, kot topilo DMF in THF.

Preglednica III: Poskus sinteze spojine **5** v mikrovalovnem reaktorju.

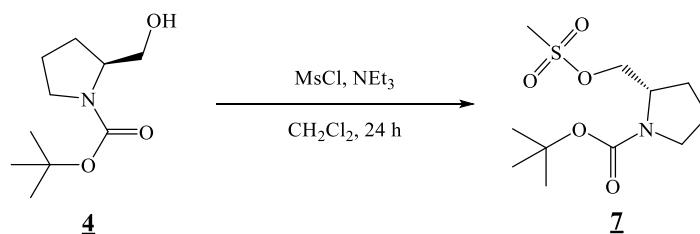
Topilo	Reakcijski pogoji
THF	10 min, 90 °C, 50 W
	10 min, 100 °C, 70 W
	10 min, 120 °C, 100 W
	10 min, 140 °C, 150 W
DMF	10 min, 100 °C, 10 W
	10 min, 120 °C, 10 W
	10 min, 130 °C, 20 W

S HPLC smo ugotovili, da smo pri reakciji s THF dobili več spojine **5**, kot pri vseh prejšnjih poskusih, vendar je bila še vedno prisotna izhodna spojina **3** v znatni količini (razmerje izhodna/produkt = 4,6:1).

Spojino **5** smo poskusili sintetizirati z uporabo $\text{LiN}(\text{Si}(\text{CH}_3)_3)_2$ (1,5 ekv.) kot baze. Kot topilo smo uporabili brezvodni DMF. Reakcijsko zmes smo mešali dva dni na 60 °C. Potek reakcije smo spremljali s TLC in HPLC. S podaljšanim časom gretja smo sicer dosegli, da se je količina izhodne zmanjšala (za 9 %), vendar pri tem ni nastalo več produkta (razmerje izhodna/produkt = 1,6:1). Zaradi nizkih izkoristkov smo opustili to sintezno pot.

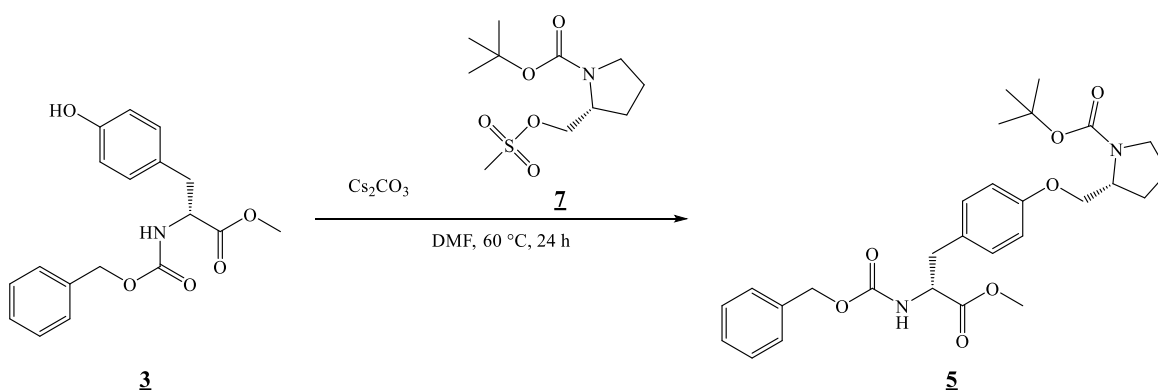
4.3.3 Sinteza *tert*-butil (*S*)-2-((4-((*R*)-2-(((benziloksi)karbonil)amino)-3-metoksi-3-oksopropil)fenoksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (**5**) s pomočjo mezilata

4.3.3.1 Sinteza *tert*-butil (*S*)-2-(((metilsulfonil)oksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (**7**)



Spojino **4** (1 ekv., 0,50 g, 2,5 mmol) smo raztopili v CH₂Cl₂ (2,5 mL) in ohladili na ledeni kopeli. Dodali smo trietilamin (2,0 ekv., 690 μ l, 5,0 mmol) in po kapljicah metansulfonil klorid (1,5 ekv., 280 μ l, 3,3 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. Dodali smo CH₂Cl₂ (10 mL) in sprali z 10 % citronska kislino (3 x 5 mL) in nasičeno NaCl (5 mL). Organsko fazo smo sušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobili smo rumeno obarvano spojino **7** oljne konsistence (217 mg, 31,3 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 1,42–1,52 (m, 9H, Boc-3 x CH₃), 1,86–2,10 (m, 4H, Pro-2 x CH₂), 3,01 (s, 3H, SO₂CH₃), 3,28–3,47 (m, 2H, Pro-CH₂N), 3,95–4,07 (m, 1H, Pro-CH), 4,08–4,37 (m, 2H, OSO₂CH₂) ppm. Kemijski premiki in sklopitvene konstante so skladni z literturnimi podatki (39).

4.3.3.2 Poskus sinteze *tert*-butil (*S*)-2-((4-((*R*)-2-(((benziloksi)karbonil)amino)-3-metoksi-3-oksopropil)fenoksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (**5**)



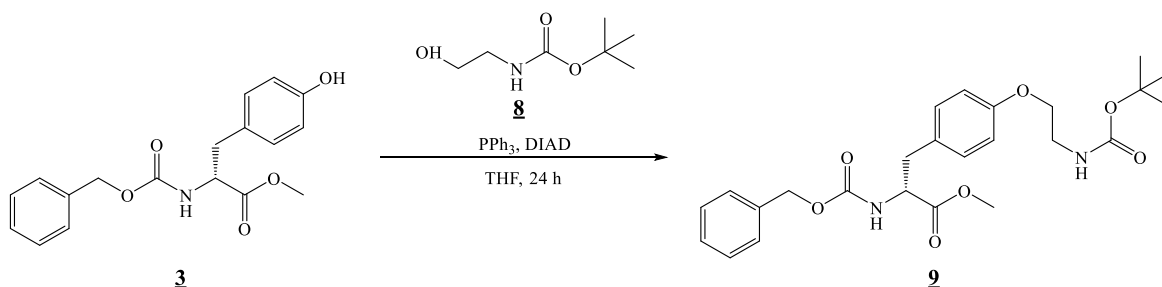
Spojino **3** (1 ekv.) smo raztopili v DMF (1,2 mL) in pod Ar dodali Cs₂CO₃ (2 ekv.) ter spojino **7** (1 ekv.) raztopljeno v DMF (1,2 mL). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč na 60 °C. Iz TLC in HPLC smo videli, da je spojina **3** ostala po večini nezreagirana,

zato smo pustili mešati še eno noč. Količina spojine **5** se ni spremenila, nastalo je več stranskih produktov. Zaradi nizkih izkoristkov smo opustili to sintezno pot.

4.3.4 Izolacija *terc*-butil (*S*)-2-((4-((*R*)-2-(((benziloksi)karbonil)amino)-3-metoksi-3-oksopropil)fenoksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (**5**)

Vse reakcijske zmesi, s katerimi smo poskusili sintetizirati spojino **5**, smo združili, uparili topilo pod znižanim tlakom in očistili z absorpcijsko kolonsko kromatografijo (mobilna faza: heksan/EtOAc = 2:1). Izolirati smo uspeli 80 mg produkta, vendar sta bila prisotna še DIAD in DEAD. ^1H NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ 1,47 (s, 9H, Boc), 1,83–2,05 (m, 4H, Pro- CH_2CH_2), 2,95 (dd, $J = 14,0$ Hz, 8,9 Hz, 1H, Tyr- $\text{CH}_2\text{-H}_a$), 3,12 (dd, $J = 14,0$ Hz, 5,2 Hz, 1H, Tyr- $\text{CH}_2\text{-H}_b$), 3,32–3,39 (m, 2H, Pro-N CH_2), 3,69 (s, 3H, OCH_3), 3,86–3,94 (m, 1H, Pro-NCH), 4,05–4,18 (m, 2H, Pro- OCH_2), 4,46 (dt, $J = 5,2$ Hz, 8,9 Hz, 1H, Tyr-CH), 5,03 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H, Bn- $\text{CH}_2\text{-H}_a$), 5,07 (d, $J = 12,9$ Hz, 1H, Bn- $\text{CH}_2\text{-H}_b$), 6,91 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, Tyr-2 x CH), 7,18 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H, Tyr-2 x CH), 7,30–7,37 (m, 5H, Bn-5 x CH), 8,02 (s, 1H, NH) ppm. ^{13}C NMR (400 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$): δ 23,44 (Pro- CH_2), 24,41 (Pro- CH_2), 28,72 (Boc-3 x Me), 37,47 (Tyr- CH_2), 47,32 in 47,65 (Pro- CH_2N), 52,38 (OCH_3), 56,71 (Tyr-CH), 66,71 (Bn- CH_2), 69,18 (Pro-NCH CH_2O), 79,42 in 79,40 (Boc-C), 115,30 (Tyr-2 x CH), 128,58 (Bn-2 x CH), 128,66 (Tyr-C), 128,98 (Bn-CH), 129,22 (Bn-2 x CH), 131,16 (Tyr-2 x CH), 138,15 (Bn-C), 156,82 (NHC=O), 157,24 (Boc-NHC=O), 158,81 (Tyr-COH), 173,08 (C=OO) ppm. IR (ATR): ν 2982, 1686, 1514, 1177, 1053, 1033, 1015 cm^{-1} . MS (ESI): $m/z = 513,3$ (100, $[\text{MH}]^-$). HRMS za $\text{C}_{28}\text{H}_{36}\text{N}_2\text{O}_7$: izračunana 513,0601, ugotovljena 513,2605. HPLC: retencijski čas: 14,95 min (89,0 % pri 220 nm, 70,0 % pri 254 nm). $[\alpha]_{\text{D}} = -24,9$ (0,20, MeOH).

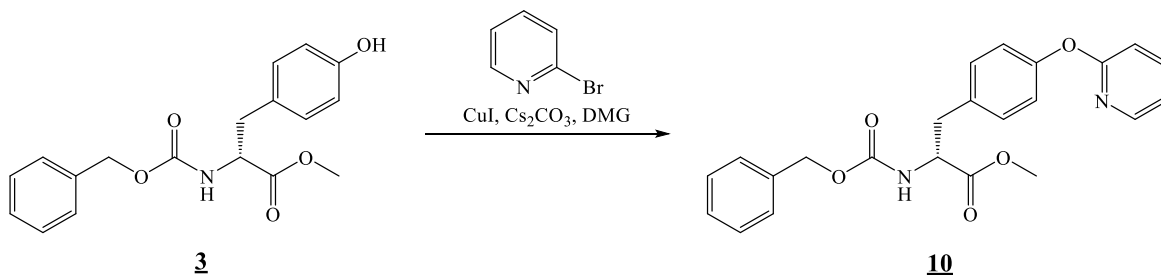
4.4 Sinteza metil (*R*)-2-(((benziloksi)karbonil)amino)-3-(4-(2-((*tert*-butoksikarbonil)(metil)amino)etoksi)fenil)propanoata (**9**)



Spojino **3** (1 ekv.), *tert*-butil (2-hidroksietil)(metil)karbamat (**8**) (1 ekv.) in PPh_3 (1,5 ekv.) smo raztopili v brezvodnem THF (2,5 mL). Ohladili smo jo na ledeni kopeli in pod Ar po kapljicah dodali DIAD (1,5 ekv.). Reakcijsko zmes smo pustili čez noč mešati v inertni atmosferi na sobni temperaturi. Uparili smo topili in surovo zmes čistili z adsorpcijsko kolonsko kromatografijo (mobilna faza: heksan/EtOAc = 2:1). Spojine **9** nismo uspeli očistiti, saj je poleg spojine **3** prisoten še DIAD. Glede na TLC in HPLC smo videli, da je izhodna spojina **3** ostala po večini nezreagirana.

Spojino **9** smo poskušali sintetizirati po zgoraj opisanem postopku z manjšo modifikacijo – povečali smo količino PPh_3 in DIAD na 3 ekv. Surovo zmes smo poskusili očistiti po zgornjem postopku, vendar nam ni uspelo izolirati spojine **9**. Zaradi nizkih izkoristkov smo opustili to sintezno pot. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3): δ 1,46 (s, 9H, Boc-3 x CH_3), 2,98 (s, 3H, CH_3N), 3,02 (dd, $J = 14,1$ Hz, 5,9 Hz, 1H, Tyr- $\text{CH}_2\text{-H}_a$), 3,08 (dd, $J = 14,1$ Hz, 5,9 Hz, 1H, Tyr- $\text{CH}_2\text{-H}_b$), 3,55–3,62 (m, 2H, NCH_2), 3,72 (s, 1H, OCH_3), 4,00–4,09 (m, 2H, CH_2O), 4,61 (dt, $J = 8,0$ Hz, 5,9 Hz, 1H, Tyr-CH), 5,07 (d, $J = 12,4$ Hz, 1H, Bn- $\text{CH}_2\text{-H}_a$), 5,11 (d, $J = 12,2$ Hz, 1H, Bn- $\text{CH}_2\text{-H}_b$), 5,33 (d, $J = 8,0$ Hz, 1H, NH), 6,79 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H, Tyr-2 x CHAr), 7,01 (d, $J = 8,3$ Hz, 2H, Tyr-2 x CHAr), 7,31–7,38 (m, 5H, Bn-5 x CH) ppm.

4.5 Sinteza metil (*R*)-2-(((benziloksi)karbonil)amino)-3-(4-(piridin-2-iloksi)fenil)propanoata (**10**)

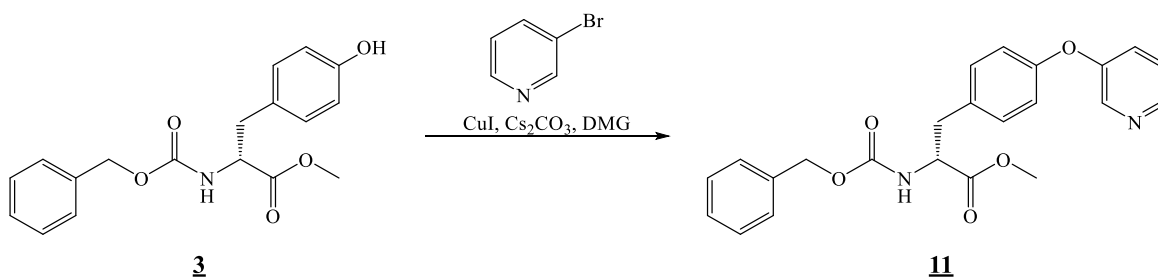


Spojino **3** (1 ekv.), 2-bromopiridin (1,5 ekv.), Cs₂CO₃ (2 ekv.), dimetilglicin (0,3 ekv.) in CuI (0,1 ekv.) smo zmešali v brezvodnem dioksanu (1 mL). Reakcijsko zmes smo segreli v mikrovalovnem reaktorju (10 min, 130 °C, 165 W). Topilo smo uparili pod znižanim tlakom, dodali EtOAc (10 mL) in spirali z H₂O (3 x 5 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (5 mL). Organsko fazo smo sušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobljeno spojino **10** smo očistili z adsorpcijsko kolonsko kromatografijo (mobilna faza: heksan/EtOAc = 2:1) in dobili rumeno tekočino smolnate konsistence (35,7 %). Izkoristek reakcije smo poskusili še povečati s spreminjanjem reakcijskih pogojev. Postopek je bil enak kot zgoraj, ob tem smo reakcijsko zmes zaradi prisotnosti izhodne spojine segrevali 30 min pri 100 °C in nato še 30 min na 110 °C. Potek smo spremljali s TLC in HPLC in ugotovili, da se je količina produkta zvišala. Reakcijo smo po zgoraj opisanem postopku segrevali v mikrovalovnem reaktorju (30 min, 120 °C, 150 W) (**3**, 0,50 g). Izolacija in čiščenje enako kot je opisano zgoraj (111 mg, 18,0 %).

Reakcijo smo poskusili izvesti tudi z običajnim segrevanjem. Spojino **3** (1 ekv., 1,30 g, 4,0 mmol), smo raztopili v brezvodnem dioksanu (70 mL), nato smo dodali Cs₂CO₃ (2 ekv., 2,57 g, 7,9 mmol), 97 % dimetilglicin (0,3 ekv., 126 mg, 1,2 mmol), CuI (0,1 ekv., 75 mg, 394 μmol) in nazadnje 2-bromopiridin (3 ekv., 1,13 mL, 11,84 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pod refluxom (110 °C). Izolacija in čiščenje spojine **10** smo izvedli po zgoraj opisanem postopku (688 mg, 42,9 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3,08 (dd, *J* = 14,0 Hz, 6,0 Hz, 1H, Tyr-CH₂-H_a), 3,15 (dd, *J* = 14,0 Hz, 6,0 Hz, 1H, Tyr-CH₂-H_b), 3,73 (s, 3H OCH₃), 4,67 (dt, *J* = 8,2 Hz, 6,0 Hz, 1H, Tyr-CH), 5,08 (d, *J* = 12,8 Hz, 1H, Bn-CH₂-H_a), 5,12 (d, *J* = 12,3 Hz, 1H, Bn-CH₂-H_b), 5,29 (d, *J* = 8,2 Hz, 1H, NH), 6,88 (d, *J* = 8,4 Hz, 1H, Pyr-CH), 7,99 (ddd, *J* = 7,2 Hz, 5,0 Hz, 0,9 Hz, 1H, Pyr-CH), 7,02–7,07 (m, 2H, Tyr-2 x CH), 7,10–7,15 (m, 2H, Tyr-2 x CH), 7,25–7,38 (m, 6H, Bn-5 x CH in

CHCl₂), 7,67 (ddd, $J = 8,3$ Hz, 7,2 Hz, 2,0 Hz, 1H, Pyr-CH), 8,18 (dd, $J = 4,9$ Hz, 1,8 Hz, 1H, Pyr-CH) ppm. ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 37,59 (Tyr-CH₂), 52,43 (Tyr-CH), 54,85 (OCH₃), 67,03 (OCH), 111,62 (Pyr-CH), 118,60 (Pyr-CH), 121,29 (Tyr-2 x CH), 128,14 (Bn-2 x CH), 128,23 (Bn-CH), 128,57 (2 x Bn-CH), 130,58 (Tyr-2 x CH), 131,99 (Tyr-C), 136,25 (Bn-C), 139,51 (Pyr-CH), 147,76 (Pyr-CH), 153,32 (Tyr-C-O), 155,71 (NHC=O), 163,63 (Pyr-C), 172,01 (C=OO) ppm. IR (ATR): ν 3334, 3034, 2952, 1717, 1506, 1466, 1728, 1244, 1206, 1055, 1018 cm⁻¹. MS (ESI): $m/z = 407,2$ (100, [MH]⁺). HRMS za: C₂₃H₂₂N₂O₅: izračunana 407,1607, ugotovljena 407,1613. HPLC: retencijski čas: 11,64 min (84,3 % pri 220 nm, 84,5 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +21,2$ (0,27, MeOH).

4.6 Sinteza metil (*R*)-2-(((benziloksi)karbonil)amino)-3-(4-(piridin-3-iloksi)fenil)propanoata (**11**)

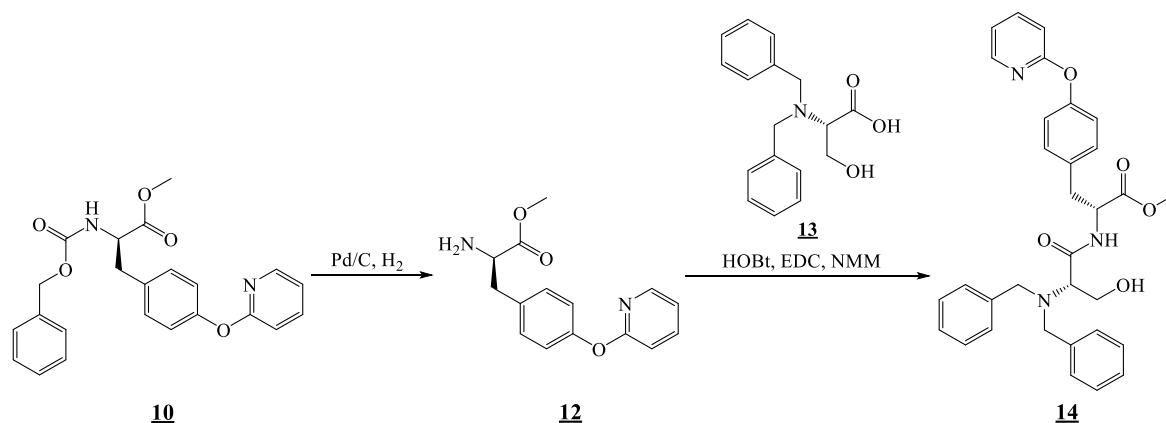


Spojino **3** (1 ekv.), smo raztopili v brezvodnem dioksanu (2 mL), dodali Cs₂CO₃ (2 ekv.), 97 % dimetilglicin (0,3 ekv.), CuI (0,1 ekv.) in nazadnje 3-bromopiridin (1,5 ekv.). Reakcijsko zmes smo segrevali v mikrovalovnem reaktorju (10 min, 130 °C, 150 W). Reakcijo smo spremljali s TLC in HPLC. Zaradi prisotnosti izhodne spojine **3** smo s segrevanjem nadaljevali še 30 min pri 130 °C, nato pri 140 °C in 150 °C. Spojina **3** se je skoraj v celoti porabila, količina nastale spojine **11** se je povečevala in dodanih lis, ki bi nakazovale na prisotnost stranskih produktov, nismo zaznali. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom in dobljeno zmes očistili z adsorpcijsko kolonsko kromatografijo (mobilna faza: heksan/EtOAc = 1:1). Dobili smo tekočino smolnate konsistence (32,0 %).

Reakcijo smo izvedli po zgoraj opisanem postopku (spojina **3**, 1,39 g), z eno spremembo, in sicer smo uporabili 3 ekv. 3-bromopiridina. Reakcijsko zmes smo segrevali v mikrovalovnem reaktorju (30 min, 150 °C, 150 W). Reakcijski zmesi smo dodali EtOAc (40 mL), organsko fazo spirali z H₂O (2 x 20 mL) in nasičeno raztopino NaCl (15 mL), jo sušili nad brezvodnim Na₂SO₄, prefiltrirali in uparili topilo pod znižanim tlakom. Dobljeno spojino **11** smo očistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: heksan/EtOAc = 1:1).

Izolirali smo rumeno tekočino smolnate konsistence (306 mg, 17,8 %, *er* = 90:10 (HPLC analiza s kiralnim selektorjem)). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3,07 (dd, *J* = 13,9 Hz, 5,9 Hz, 1H, Tyr-CH₂-H_a), 3,15 (dd, *J* = 13,9 Hz, 5,9 Hz, 1H, Tyr-CH₂-H_b), 3,74 (s, 3H, OCH₃), 4,66 (dt, *J* = 8,2 Hz, 5,9 Hz, 1H, Tyr-CH), 5,08 (d, *J* = 12,2, 1H, Bn-CH₂-H_a), 5,12 (d, *J* = 12,3 Hz, 1H, Bn-CH₂-H_b), 5,27 (d, *J* = 8,2, 1H, NH), 6,90–6,94 (m, 2H, Tyr-2 x CH), 7,06–7,10 (m, 2H, Tyr-2 x CH), 7,25–7,27 (m, 2H, Pyr-2 x CH), 7,29–7,38 (m, 5H, Bn), 8,35–8,38 (m, 1H, Pyr-CH), 8,38–8,41 (m, 1H, Pyr-CH) ppm. ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 37,72 (Tyr-CH₂), 52,63 (OCH₃), 55,00 (Tyr-CH), 67,24 (OCH₂), 119,20 (Tyr-2 x CH), 124,31 (Pyr-CH), 125,72 (Pyr-CH), 128,34 (Bn-2 x CH), 128,47 (Bn-CH), 128,76 (2 x Bn-CH), 131,07 (Tyr-2 x CH), 131,66 (Tyr-C), 136,35 (Bn-C), 141,68 (Pyr-CH), 144,64 (Pyr-CH), 153,93 (Pyr-CO), 155,71 (Tyr-CO ali NHC=O), 155,78 (Tyr-C-O ali NHC=O), 172,05 (C=OO) ppm. IR (ATR): ν 3318, 2952, 1718, 1505, 1474, 1425, 1250, 1054, 1018 cm⁻¹. MS (ESI): *m/z* = 407,2 (100, [MH]⁺). HRMS za: C₂₃H₂₂N₂O₅: izračunana 407,1607, ugotovljena 407,1612. HPLC: retencijski čas: 7,71 min (99,4 % pri 220 nm, 96,8 % pri 254 nm). [α]_D = + 20,8 (0,29, MeOH).

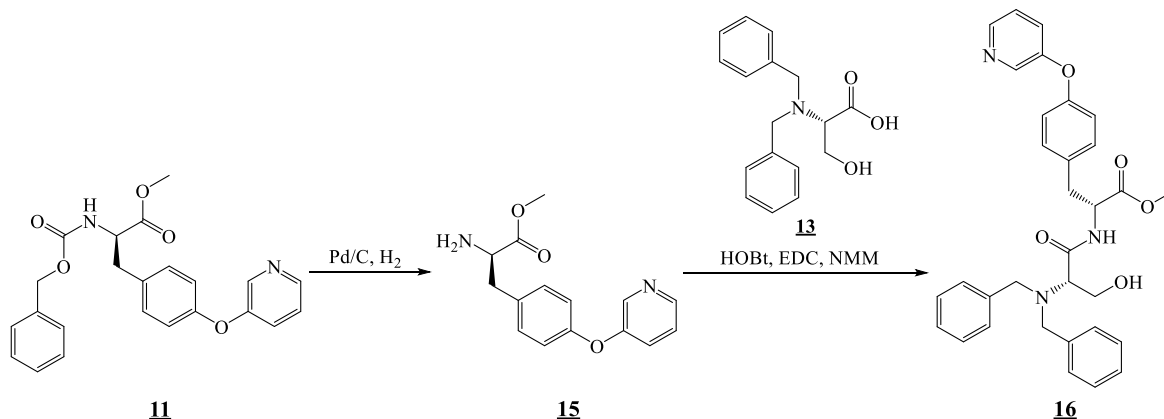
4.7 Sinteza metil (*R*)-2-((*S*)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksiopropanamido)-3-(4-(piridin-2-iloksi)fenil)propanoata (**14**)



Spojino **12** smo poskušali sintetizirati po spodaj opisanem postopku. Uporabili smo minimalne količine spojine, kot topilo smo uporabili MeOH oz. AcOH. Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč v H₂ atmosferi in njen potek spremljali s TLC in HPLC. Več spojine **13** je nastalo v primeru uporabe MeOH kot topila.

Spojino **10** (1 ekv., 700 mg, 1,7 mmol) smo raztopili v MeOH (60 mL) in raztopino preprihivali z argonom (15 min). Reakcijski zmesi smo dodali Pd-C (0,2 ekv., 41 mg, 346 μ mol) in preprihali z H₂ (30 min) ter jo pustili mešati v H₂ atmosferi 72 ur. Reakcijsko zmes smo filtrirali skozi guč in uparili topilo. Predvideli smo 100 % izkoristek in brez predhodnega čiščenja nadaljevali sintezo. Spojino **12** (1 ekv., 469 mg (predpostavljen 100 % izkoristek prejšnje stopnje), 1,7 mmol), *N,N*-dibenzil-L-serin (**13**) (1 ekv., 491 mg, 1,7 mmol), HOBt (1 ekv., 264 mg, 1,7 mmol) in NMM (1 ekv., 190 μ l, 1,7 mmol) smo nato raztopili v CH₂Cl₂ (70 mL). Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli, dodali EDC (1 ekv., 243 mg, 1,7 mmol) in pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. Reakcijski zmesi smo uparili topilo in dobljeno surovo zmes čistili s kolonsko kromatografijo (gradientna mobilna faza: heksan/EtOAc = 2:1, 1:1, EtOAc). Izolirali smo spojino **14** v obliki rumene tekočine smolnate konsistence (138 mg, 14,9 %). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3,08 (dd, $J = 13,9$ Hz, 5,6 Hz, 1H, Tyr-CH₂-H_a), 3,12 (dd, $J = 13,9$ Hz, 5,6 Hz, 1H, Tyr-CH₂-H_b), 3,31 (dd, $J = 7,4$ Hz, 3,8 Hz, 1H, NCH), 3,47 (d, $J = 13,3$ Hz, 2H, NCH₂), 3,64 (s, 3H, OCH₃), 3,86 (d, $J = 13,3$ Hz, 2H, NCH₂), 3,97 (dd, $J = 11,3$ Hz, 3,8 Hz, 1H, CH₂-H_a), 4,11 (dd, $J = 14,1$, 1H, CH₂-H_b), 4,90 (dt, $J = 8,9$ Hz, 5,6 Hz, 1H, Tyr-CH), 6,92 (d, $J = 8,3$ Hz, 1H, Pyr-CH), 6,97–7,01 (m, 1H, Pyr-CH), 7,01–7,10 (m, 4H, Tyr-4 x CH), 7,20–7,24 (m, 5H, Bn), 7,27–7,32 (m, 5H, Bn), 7,65–7,71 (m, 1H, Pyr-CH), 7,76 (d, $J = 8,9$, 1H, NH), 8,17 (dd, $J = 5,0$ Hz, 1,9 Hz, 1H, Pyr-CH) ppm. ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 37,15 (Tyr-CH₂), 52,40 (Tyr-CH ali OCH₃), 52,54 (Tyr-CH ali OCH₃), 54,65 (N(CH₂)₂), 57,48 (CH₂OH), 61,72 (NCH), 111,65 (Pyr-CH), 118,69 (Pyr-CH), 121,56 (Tyr-2 x CH), 127,55 (2 x Bn-CH), 128,65 (Bn-4 x CH), 128,84 (Bn-4 x CH), 130,61 (Tyr-2 x CH), 131,83 (Tyr-C), 138,40 (2 x Bn-C), 139,62 (Pyr-CH), 147,71 (Pyr-CH), 153,45 (Tyr-CO), 163,62 (Pyr-C), 171,62 (C=OO), 173,96 (NC=O) ppm. IR (ATR): ν 3317, 3029, 2952, 1742, 1664, 1506, 1467, 1429, 1266, 1245, 1206 cm⁻¹. MS (ESI): $m/z = 540,2$ (100, [MH]⁺). HRMS za C₃₂H₃₃N₃O₅: izračunana 540,2498, ugotovljena 540,24960. HPLC: retencijski čas: 10,81 min (82,6 % pri 220 nm, 89,7 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = -22,2$ (0,32, MeOH).

4.8 Sinteza metil (*R*)-2-((*S*)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)-3-(4-(piridin-3-iloksi)fenil)propanoata (**16**)

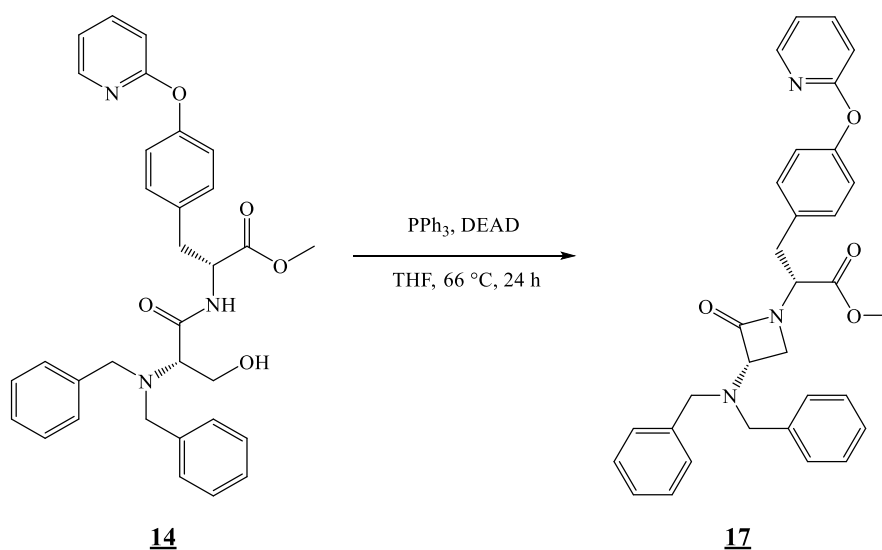


Spojino **15** smo poskušali sintetizirati po spodaj opisanem postopku. Uporabili smo minimalne količine spojine, kot topilo smo uporabili MeOH oz. AcOH ter jo pustili mešati v H₂ atmosferi. Reakciji smo spremljali s TLC in HPLC. Več spojine **16** je nastalo v primeru uporabe MeOH kot topilo.

Spojino **11** (1 ekv., 300 mg, 738 μ mol) smo raztopili v MeOH (25 mL) in prepihovali z argonom (15 min). Reakcijski zmesi smo dodali Pd-C (0,2 ekv., 18 mg, 152 μ mol) in prepihali z H₂ (30 min) ter jo pustili mešati v H₂ atmosferi 72 ur. Reakcijsko zmes smo filtrirali skozi guč in uparili topilo. Predvideli smo 100 % izkoristek in brez predhodnega čiščenja nadaljevali sintezo. Spojino **15** (1 ekv., 201 mg (predpostavljen 100 % izkoristek prejšnje stopnje), 738 μ mol), spojina **13** (1 ekv., 211 mg, 738 μ mol), HOBt (1 ekv., 113 mg, 738 μ mol) in NMM (1 ekv., 81 μ l, 738 μ mol) smo raztopili v CH₂Cl₂ (30 mL). Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli, dodali EDC (1 ekv., 104 mg, 738 μ mol) in pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. Uparili smo topilo in dobljeno surovo zmes čistili s kolonsko kromatografijo (mobilna faza: heksan/EtOAc = 2:1, EtOAc). Izolirati smo uspeli čisti izomer spojine **16a** (65 mg) in zmes obeh izomerov spojine **16** v razmerju *dr* = 60:30 (118 mg), oboje v obliki rumeno tekočine smolnate konsistence. Celokupni izkoristek reakcije je 45,9 % z razmerjem *dr* = 70:30. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3,05 (dd, *J* = 13,9 Hz, 6,4 Hz, 1H, Tyr-CH₂-H_a), 3,11 (dd, *J* = 13,9 Hz, 5,3 Hz, 1H, Tyr-CH₂-H_b), 3,29 (dd, *J* = 7,4 Hz, 4,0 Hz, 1H, NCH), 3,47 (d, *J* = 13,2 Hz, 2H, NCH₂), 3,67 (s, 3H, OCH₃), 3,85 (d, *J* = 13,2 Hz, 2H, NCH₂), 3,99 (dd, *J* = 11,4 Hz, 4,0 Hz, 1H, OCH₂-H_a), 4,12 (dd, *J* = 11,4 Hz, 7,4 Hz, 1H, OCH₂-H_b), 4,88 (ddd, *J* = 8,8 Hz, 6,4 Hz, 5,3 Hz, 1H,

Tyr-CH), 6,86–6,93 (m, 2H, Tyr-2 x CH), 6,93–7,01 (m, 2H, Tyr-2 x CH), 7,19–7,35 (m, 12H, Pyr-2 x CH in Bn-10 x CH), 7,78 (d, $J = 8,8$ Hz, 1H, NH), 8,38 (t, $J = 2,6$ Hz, 1H, Pyr-CH), 8,40–8,43 (m, 1H, Pyr-CH) ppm. ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3): 37,16 (Tyr- CH_2), 52,44 (Tyr-CH), 52,62 (OCH_3), 54,63 ($\text{N}(\text{CH}_2)_2$), 57,37 (OCH_2), 61,77 (NCH), 119,06 (Tyr-2 x CH), 124,20 (Pyr-CH), 125,65 (Pyr-CH), 127,57 (2 x Bn-CH), 128,62 (2 x Bn-2 x CH), 128,89 (2 x Bn-2 x CH), 130,93 (Tyr-2 x CH), 131,35 (Tyr-C), 138,41 (2 x Bn-C), 141,53 (Pyr-CH), 144,56 (Pyr-CH), 153,70 (Pyr-CO), 155,64 (Tyr-CO), 171,56 ($\text{C}=\text{OO}$), 173,86 ($\text{NHC}=\text{O}$) ppm. IR (ATR): ν 3369, 3030, 2951, 1742, 1665, 1504, 1475, 1247, 1202, 1028 cm^{-1} . MS (ESI): $m/z = 540,2$ (100, $[\text{MH}]^+$). HRMS za $\text{C}_{32}\text{H}_{33}\text{N}_3\text{O}_5$: izračunana 540,2498, ugotovljena 540,2486. HPLC: retencijski čas: 7,84 min (99,1 % pri 220 nm, 95,1 % pri 254 nm). $[\alpha]_{\text{D}} = -14,6$ (0,25, MeOH).

4.9 Sinteza metil (*R*)-2-((*S*)-4-(dibenzilamino)-3-oksoizoksazolidin-2-il)-3-(4-(piridin-2-iloksi)fenil)propanoata (**17**)



Spojino **14** (1 ekv.) smo raztopili v ustreznem topilu (1,5 mL), dodali PPh_3 (3,34 ekv.), reakcijsko zmes ohladili na ledeni kopeli (0 $^\circ\text{C}$ oz. -10 $^\circ\text{C}$ pri DEAD) in pod Ar po kapljicah dodali azodikarbonsilat (3,34 ekv.).

Preglednica IV: Reakcijski pogoji za sintezo spojine **17**.

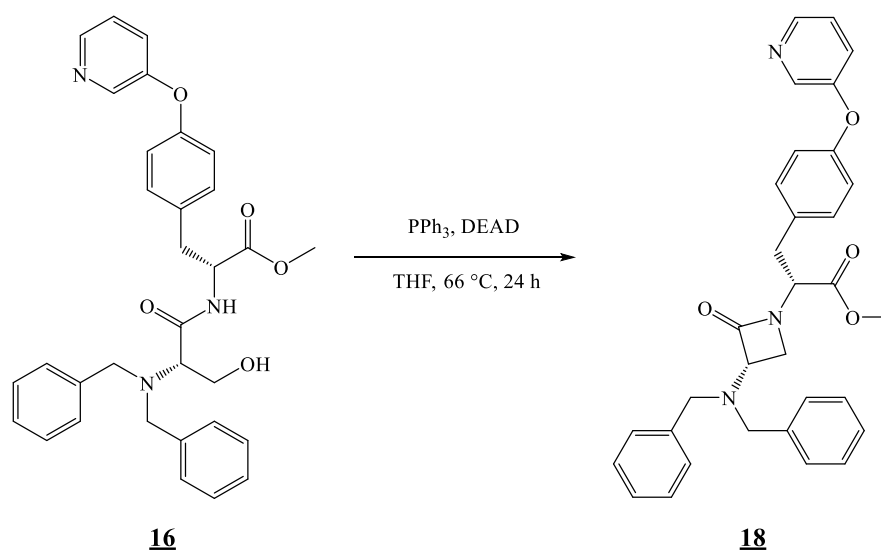
Reagent	Topilo	Reakcijski pogoji	Dodatki	Reakcijski pogoji
DIAD	brezvodni THF	sobna temperatura, čez noč	/	/
DEAD	brezvodni THF	sobna temperatura, čez noč	/	/
DEAD	brezvodni THF	sobna temperatura, 72 ur	+ PPh ₃ (1,5 ekv.), + DEAD (1,5 ekv.)	- sobna temperatura, 1 uro - pod refluxom (66 °C), čez noč
DEAD	brezvodni DMF	sobna temperatura, 72 ur	/	pod refluxom (66 °C), čez noč
DEAD	brezvodni toluen	sobna temperatura, 72 ur	/	sobna temperatura, čez noč

V prvem primeru reakcija ni potekla. V drugem primeru smo uparili topilo pod znižanim tlakom in dobljeno surovo zmes čistili s kolonsko kromatografijo (gradientna mobilna faza: eter/MeOH = 1:0,3; heksan/EA = 1:1). V tretjem primeru smo najprej tvorili betain in nato na ledeni kopeli po kapljicah dodali spojino **14** raztopljeno v topilu. V zadnjih treh primerih smo reakcijsko zmes mešali 72 ur, a je bila spojina **14** še vedno prisotna. Najmanj produkta je nastalo v toluenu. Z mešanjem smo nadaljevali še eno noč, v tretjem (ob dodatku PPh₃ in DEAD) in četrtem primeru smo ob tem še segrevali. Glede na TLC, se je količina izhodne spojine zmanjšala, najmanj jo je prisotne v THF.

Spojino **14** (1 ekv., 80 mg, 148 μmol) smo raztopili v brezvodnem THF (15 mL) in dodali PPh₃ (3,34 ekv., 123 mg, 495 μmol). Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli (-10 °C) in pod Ar po kapljicah dodali 97 % DEAD (3,34 ekv., 80 μL, 495 μmol). Reakcijsko zmes smo mešali v inertni atmosferi na sobni temperaturi 1 uro, nato čez noč pod refluxom (66 °C). Topilo smo uparili in surovo zmes čistili s kolonsko kromatografijo (gradientna mobilna faza: CH₂Cl₂/aceton = 50:1, 40:1, 30:1, CH₂Cl₂/EtOH = 100:1, 9:1). Izolirali smo spojino **17**, ki je zmes obeh izomerov (28 mg, 36,2 %), ostali del spojine **17** je ostal v koloni in ga nismo uspeli očistiti (218 mg: **14**, **17** in PPh₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2,98 (dd, *J* = 14,6 Hz, 10,8 Hz, 1H, Tyr-CH₂-H_a), 3,15 (dd, *J* = 5,5 Hz, 2,4 Hz, 1H, cikel-CH₂-H_a), 3,28 (dd, *J* = 5,3 Hz, 14,6 Hz, 1H, Tyr-CH₂-H_b), 3,35 (dd, *J* = 5,0 Hz, 5,5 Hz, 1H, cikel-CH₂-H_b), 3,38 (d, *J* = 13,8 Hz, 2H, NCH₂), 3,52 (d, *J* = 13,8 Hz, 1H,

NCH₂), 3,72 (s, 3H, OCH₃), 4,28 (dd, $J = 5,0$ Hz, 2,4 Hz, 1H, cikel-CH), 4,80 (dd, $J = 10,8$ Hz, 5,3 Hz, 1H, Tyr-CH), 6,75 (dt, $J = 8,3$ Hz, 0,8 Hz, 1H, Pyr-CH), 6,95 (ddd, $J = 7,2$ Hz, 4,9 Hz, 0,9 Hz, 1H, Pyr-CH), 7,00–7,07 (m, 2H, Tyr-2 x CH), 7,13–7,31 (m, 12H, Tyr-2 x CH in 2 x Bn-5 x CH), 7,58 (ddd, $J = 8,3$ Hz, 7,1 Hz, 2,0 Hz, 1H, Pyr-CH), 8,11–8,14 (m, 1H, Pyr-CH) ppm. ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 35,22 (Tyr-CH₂), 42,77 (cikel-CH₂), 52,54 (OCH₃), 54,04 (Tyr-CH), 54,45 (N(CH₂)₂), 68,64 (cikel-CH), 111,62 (Pyr-CH), 118,58 (Pyr-CH), 121,34 (Tyr-2 x CH), 127,19 (2 x Bn-CH), 128,32 (2 x Bn-2 x CH), 128,91 (2 x Bn-2 x CH), 129,97 (Tyr-2 x CH), 132,21 (Tyr-C), 138,26 (2 x Bn-C), 139,44 (Pyr-CH), 147,73 (Pyr-CH), 153,34 (Tyr-CO), 163,44 (Pyr-CO), 169,32 (NC=O), 170,44 (C=OO) ppm. IR (ATR): ν 2981, 2973, 2950, 2922, 2866, 2844, 1739, 1429, 1266, 1244, 1057, 1032, 1016 cm⁻¹. MS (ESI): $m/z = 522,2$ (100, [MH]⁺). HRMS za C₃₂H₃₁N₃O₄: izračunana 522,2393, ugotovljena 522,2388. HPLC: retencijski čas: 13,27 min (81,8 % pri 220 nm, 87,0 % pri 254 nm). $[\alpha]_D = +66,7$ (0,44, MeOH).

4.10 Sinteza metil (*R*)-2-((*S*)-4-(dibenzilamino)-3-oksoizoksazolidin-2-il)-3-(4-(piridin-3-iloksi)fenil)propanoata (**18**)



Spojine **16a** (1 ekv., 60 mg, 111 μmol) smo raztopili v brezvodnem THF (9 mL) in dodali PPh₃ (3,34 ekv., 97 mg, 371 μmol). Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli (-10 °C) in pod Ar po kapljicah dodali 97 % DEAD (3,34 ekv., 60 μl , 371 μmol). Reakcijsko zmes smo mešali 1 uro na sobni temperaturi, nato čez noč pod refluxom (66 °C). Uparili smo topilo in dobljeno surovo zmes čistili s kolonsko kromatografijo (gradientna mobilna faza: heksan/EtOAc = 1:2, EtOAc, MeOH). Izolirali smo spojino **18a** (33 mg, 56,9 %). ¹H

NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2,95 (dd, $J = 14,6$ Hz, 11,2 Hz, 1H, Tyr-CH₂-H_a), 3,14 (dd, $J = 5,6$ Hz, 2,4 Hz, 1H, cikel-CH₂-H_a), 3,29 (dd, $J = 14,6$ Hz, 5,2 Hz, 1H, Tyr-CH₂-H_b), 3,32 (d, $J = 13,7$ Hz, 2H, NCH₂), 3,36 (dd, $J = 5,6$ Hz, 4,9 Hz, 1H, cikel-CH₂-H_b), 3,45 (d, $J = 13,7$ Hz, 2H, NCH₂), 3,73 (s, 3H, OCH₃), 4,29 (dd, $J = 4,9$ Hz, 2,4 Hz, 1H, cikel-CH), 4,83 (dd, $J = 11,2$ Hz, 5,2 Hz, 1H, Tyr-CH), 6,85–6,91 (m, 2H, Tyr-2 x CH), 6,94 (ddd, $J = 8,4$ Hz, 2,8 Hz, 1,4 Hz, 1H, Pyr-CH), 7,09 (ddd, $J = 8,4$ Hz, 4,7 Hz, 0,6 Hz, 1H, Pyr-CH), 7,19–7,29 (m, 2H, Tyr-2 x CH), 7,23–7,33 (m, 10H, 2 x Bn-5 x CH), 8,25 (d, $J = 2,7$ Hz, 1H, Pyr-CH), 3,32 (dd, $J = 4,7$ Hz, 1,3 Hz, 1H, Pyr-CH) ppm. ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 35,08 (Tyr-CH₂), 42,55 (cikel-CH₂), 52,58 (OCH₃), 53,76 (Tyr-CH), 54,30 (N(CH₂)₂), 62,22 (cikel-CH), 118,63 (Tyr-2 x CH), 124,11 (Pyr-CH), 125,86 (Pyr-CH), 127,29 (2 x Bn-CH), 128,38 (2 x Bn-2 x CH), 128,94 (2 x Bn-2 x CH), 130,28 (Tyr-2 x CH), 131,46 (Tyr-C), 138,17 (2 x Bn-C), 141,88 (Pyr-CH), 144,63 (Pyr-CH), 153,14 (Pyr-CH), 155,80 (Tyr-CO), 169,33 (NC=O), 170,35 (C=OO) ppm. IR (ATR): ν 2966, 2865, 2844, 1736, 1506, 1226, 1170, 1056, 1031, 1017 cm⁻¹. MS (ESI): $m/z = 522,2$ (100, [MH]⁺). HRMS za C₃₂H₃₁N₃O₄: izračunana 522,2393, ugotovljena 522,2385. HPLC: retencijski čas: 9,71 min (95,4 % pri 220 nm, 86,0 % pri 254 nm). [α]_D = 83,2 (0,47, MeOH).

Po enakem postopku smo pripravili reakcijo z zmesjo spojine **16** (1 ekv., 121 mg, 224 μ mol), ki vsebuje diastereoizomerno zmes. Uspeli smo izolirati oba posamezna izomera **18a** (34 mg) in **18b** (19 mg), celoten izkoristek reakcije je 73,5 % (86 mg), z razmerjem izomerov **18a:18b** $dr = 60:40$. Spojina **18b**: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 3,01 (dd, 14,4 Hz, 10,0 Hz, 1H Tyr-CH₂-H_a), 3,21 (dd, 14,4 Hz, 5,6 Hz, 1H Tyr-CH₂-H_b), 3,21 (dd, $J = 5,6$ Hz, 4,9 Hz, 1H, cikel-CH₂-H_a), 3,41 (dd, $J = 5,6$ Hz, 2,6 Hz, 1H, cikel-CH₂-H_b), 3,66 (d, $J = 13,8$ Hz, 2H, NCH₂), 3,72 (s, 3H, OCH₃), 3,75 (d, $J = 13,8$ Hz, 2H, NCH₂), 4,17 (dd, $J = 4,9$ Hz, 2,6 Hz, 1H, cikel-CH), 4,66 (dd, $J = 10,0$ Hz, 5,6 Hz, 1H, Tyr-CH), 6,90–6,94 (m, 2H, Tyr-2 x CH), 7,14–7,18 (m, 2H, Tyr-2 x CH), 7,22–7,36 (m, 15H, Pyr-2 x CH in 2 x Bn-5 x CH), 8,34–8,40 (m, 2H, Pyr-2 x CH) ppm. ¹³C NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 34,83 (Tyr-CH₂), 43,11 (cikel-CH₂), 52,57 (OCH₃), 54,60 (N(CH₂)₂), 54,87 (Tyr-CH), 68,40 (cikel-CH), 119,10 (Tyr-2 x CH), 124,14 (Pyr-CH), 125,58 (Pyr-CH), 127,26 (2 x Bn-CH), 128,37 (2 x Bn-2 x CH), 128,93 (2 x Bn-2 x CH), 130,25 (Tyr-2 x CH), 131,94 (Tyr-C), 138,39 (2 x Bn-C), 141,56 (Pyr-CH), 144,51 (Pyr-CH), 153,66 (Pyr-CH), 155,49 (Tyr-CO), 169,54 (NC=O), 170,40 (C=OO) ppm. IR (ATR): ν 2966, 2922, 2865, 2844,

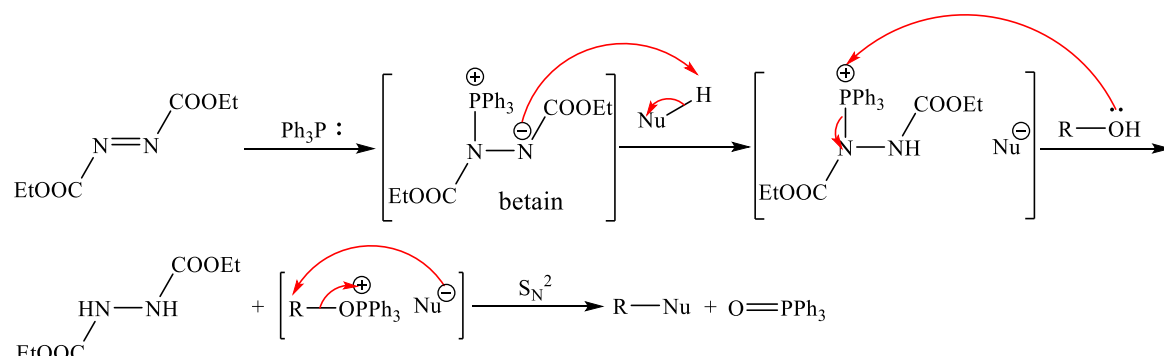
1738, 1506, 1251, 1228, 1056, 1032, 1016 cm^{-1} . MS (ESI): $m/z = 522,2$ (100, $[\text{HM}]^+$). HRMS za $\text{C}_{32}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_4$: izračunana 522,2393, ugotovljena 522,2397. HPLC: retencijski čas: 9,61 min (84,7 % pri 220 nm, 86,6 % pri 254 nm). $[\alpha]_{\text{D}} = -17,4$ (0,32, MeOH).

5 Razprava

5.1 Sinteza stranske verige na mestu N1 β -laktamskega obroča

5.1.1 *O*-alkiliranje

5.1.1.1 Mitsunobujeva reakcija



Slika 17: Mehanizem Mitsunobujeve reakcije. Prirejeno po (40).

Mitsunobujeva reakcija je reakcija substitucije med 1° ali 2° alkoholom in nukleofilom. Posredovana je z redoks reakcijo, pri kateri poteče oksidacija fosfina in redukcija azodikarboksilata. V prvem koraku fosfin in azodikarboksilat tvorita intermediat – betain, ki v naslednji stopnji deprotonira nukleofil (slika 17) (41). Za odstranitev protona mora biti njegov pKa nižji od pKa betaina (42). V naslednjem koraku nastala fosfonijeva sol reagira z alkoholom do ključne alkoksifosfonijeve soli, na kateri poteče nukleofilna substitucija. Reakcija poteče pod milimi pogoji, pri temperaturi med 0 °C in 25 °C (41). Kot azodikarboksilat se običajno uporabljata DIAD ali DEAD, pri čemer pKa nastalega betaina znaša okrog 13 (42). Nukleofil je običajno relativno kislja spojina, vsebuje OH, SH ali NH skupino s pKa nižjim od 15, raje nižjim od 11 (41). Vrsten red dodajanja reagentov je lahko različen, največkrat v reakcijsko mešanico po kapljicah dodajamo azodikarboksilat, lahko pa najprej tvorimo betain, ki ga nato po kapljicah dodajamo izhodni mešanici. (41, 43). Pri Mitsunobujevih reakcijah se uporabljajo različna nepolarna in polarna aprotična topila, navadno so rezultati reakcij boljši v THF in toluenu (41).

Uspešne reakcije *O*-alkiliranja fenolov, ki so bodisi nesubstituirani, bodisi substituirani z elektron-donorskimi in elektron-privlačnimi skupinami, z uporabo Mitsunobujeve reakcije so dobro dokumentirane (43), zato smo po pregledu literature spojino **5** najprej poskušali sintetizirati z uporabo klasičnih reagentov, in sicer DIAD in PPh₃ v THF pri znižani temperaturi. Količina nastale spojine **5** je bila zanemarljiva, zato smo poskušali izkoristek reakcije povečati z uporabo mešanice topil toluen/THF (Mitsunobujeve reakcije estrenja

alkoholov potekajo hitreje v nepolarnih topilih (44)) ter s predhodno tvorbo betaina. Nadalje smo poskusili z DEAD, ki je nekoliko reaktivnejši od DIAD, vendar modifikacije reakcijskega postopka niso bile uspešne. Čeprav pKa spojine **3** znaša 9,6 (vrednost je bila določena s pomočjo programa ChemDraw), smo poskusili reakcijo izvesti z reaktivnejšimi redoks sistemi, ki se sicer uporabljajo pri nukleofilih s pKa višjim od 11 (45). Znano je uspešno *O*-alkiliranje fenola z uporabo ADDP in TBP (46), vendar v našem primeru uporaba te kombinacije reagentov ni povečala izkoristka, zato smo to sintezno pot opustili. Predvidevali smo, da premajhna kislost nukleofila (spojina **3**) najverjetneje ni edini razlog za neuspeh, vzrok se lahko skriva tudi v spojini **4**. Poznane so uspešne reakcije fenola z *N*-Bn-prolinolom, pri standardnih pogojih (DEAD, sobna temperatura, CH₂Cl₂), medtem ko reakcija z *N*-Boc-prolinolom kljub optimizaciji standardnih pogojev (brezvodni pogoji, spreminjanje temperature, alternativna topila, alternativni azodikarboškilati) ni bila uspešna, šele dodatek baze v reakcijsko zmes je prinesel želen rezultat (47), zato bi bilo v bodoče vredno poskusiti Mitsunobujevo reakcijo izvesti z dodatkom baze. V primeru uporabe sterično oviranih alkoholov je sinteza alkil aril etrov počasna (41). Boc zaščitna skupina lahko predstavlja sterično oviro za nukleofilni napad na CH₂ skupino prolina, zato bi jo lahko nadomestili z *N*-benzilno zaščito. Možna alternativa je uporaba povišane temperature, ki se je kot dobra modifikacija izkazala pri sintezi β-laktamskega obroča (glej poglavje 5.2 Sinteza β-laktamskega obroča). Ta princip se uporablja zlasti pri sterično oviranih sekundarnih in terciarnih alkoholih (43, 48).

Namesto spojine **4** smo poskusili z uporabo manj rigidnega *N*-Boc-aminoetanola (spojina **8**). Poznana je uspešna reakcija med *L*-*N*-Cbz-tirozil metilnim estrom in *N*-Boc-2-aminoetanolom (DEAD, PPh₃, sobna temperatura, 48 ur) (49). Spojino **9** smo poskušali sintetizirati z uporabo standardnih pogojev (DIAD, PPh₃, 0 °C, čez noč). Reakcija je bila sicer uspešna, vendar zaradi nizkih izkoristkov sintezene poti nismo nadaljevali. Razlog za nizek izkoristek je lahko nižja reaktivnost spojine **3**, zaradi česar bi bil potreben daljši reakcijski čas. Iz eksperimentalnih opažanj lahko zaključimo, da Tyr ni dovolj močan nukleofil, da bi z β-aminoalkoholom tvoril eter z uporabo Mitsunobujeve reakcije.

5.1.1.2 Uvedba dobro izstopajoče skupine

O-alkiliranje smo poskušali izvesti po drugi sintezni poti – z uvajanjem dobro izstopajoče skupine na alkohol (spojina **4**). Poznane so uspešne reakcije etrenja med fenolom in *N*-Boc-tozilprolinom (NaH v DMF (50) ali THF (51, 52)) ter med različno derivatiziranimi 4-

benzilfenoli in *N*-Boc-tozilprolinom (NaH v DMF (53, 54)), zato smo sintetizirali *O*-tozilprolinol (**6**). Z uvedbo dobro izstopajoče skupine, smo fenolu (spojina **3**) olajšali nukleofilni napad na OCH₂ skupino prolina. *O*-alkiliranje smo izvedli po znanem literaturnem postopku (51). Nadalje smo poskušali z uporabo različno polarnih aprotičnih topil (THF, DMF, aceton) v kombinaciji z različnimi bazami (NaH, K₂CO₃, LiHMDS) – več v preglednici II (glej poglavje 4.3.2.2 Poskus sinteze *terc*-butil (*S*)-2-((4-((*R*)-2-(((benziloksi)karbonil)amino)-3-metoksi-3-oksopropil)fenoksi)metil)pirolidin-1-karboksilata (**5**)). V primerjavi z Mitsunobujevo reakcijo so bili izkoristki višji, zato smo se odločili da bomo reakcijo poskušali optimizirati. Uporabili smo presežno količino spojine **6**, vendar je bila v vseh primerih še vedno prisotna izdatna količina izhodne spojine **3** (razmerje **3:5** za THF 2,9:1, DMF 16,5:1 in aceton 17:1). Največ produkta (spojina **5**) je nastalo v THF in acetonu (razmerje nastalega produkta **5** THF:DMF:aceton = 2,4:0,3:1). S predpostavljanjem, da bi bil za potek reakcije potreben daljši čas oz. višja temperatura, smo poskusili reakcijo izvesti pri višji temperaturi v mikrovalovnem reaktorju (topilo THF in DMF), ki se rutinsko uporabljajo v organski kemiji že vrsto let (55). Spojina **3** je bile še vedno prisotna, sicer je bil izkoristek višji (v THF), a je bila količina vseeno kvantitativno zanemarljiva. Obenem so se že pri 100 °C pojavili dodatni signali stranskih produktov. Sklepali smo, da je razlog za nizek izkoristek v sterični oviranosti spojine **6**, zaradi česar je oviran nukleofilni napad fenolata **3**.

O-alkiliranje smo poskušali izvesti tudi s tvorbo manj voluminozne izstopajoče skupine – mezilat. Poznano je uspešno *O*-alkiliranje derivata tirozina z 2-azoetilmetansulfonatom v 28 urah ob prisotnosti K₂CO₃ in DMF (70 °C) (56). Odločili smo se za uporabo znanega literaturnega postopka (57), po katerem je sicer nastalo več spojine **5**, kot pri tozilat, vendar je bila spojina **3** še vedno prisotna (razmerje **3:5** = 2,8:1). Čas reakcije smo podaljšali še za en dan, kar pa ni prineslo povečanja izkoristka, saj se je količina spojine **3** zmanjšala na račun stranskih produktov. Zaključili smo, da zaradi prenizkih izkoristkov *O*-alkiliranja spojine **3** z alkoholi ne nadaljujemo. Razlogi za slab potek reakciji bi bili lahko v reaktivnosti Tyr (spojina **3**), saj se je izkazalo, da ta ni tako dober nukleofil kot fenol ali/in v sterični oviranosti uporabljenega alkohola (**4**). V bodoče bi lahko uporabili sterično manj ovirane aminoalkohole (uporaba druge zaščitne skupine za NH skupino) ali pa jih zamenjali za bromirane derivate, in bromoalkane, saj smo v literaturi zasledili uspešno *O*-alkiliranje tirozina z 2-bromo-*N*-Boc-etan-1-aminom ob prisotnosti Cs₂CO₃ in KI v DMF

(3 ure, sobna temperatura) (58) in z 4-bromobut-1-inom ob prisotnosti Cs₂CO₃ v DMF (12 ur, 60 °C) (59).

5.1.2 O-ariliranje z uporabo Ullmannove reakcije

Zaradi neuspešnega O-alkiliranja z *N*-Boc-aminoalkoholi, smo poskusili z uvedbo bazičnih aromatskih substituentov v stransko verigo na mesto N1 monobaktama, s pomočjo Ullmannove reakcije, ki je pogosta metoda za tvorbo C–O vezi. Sklopitvena reakcija poteče v prisotnosti katalizatorja (Cu²⁺), liganda in močne baze. Točen mehanizem reakcije je še vedno nejasen. Naloga liganda je povečati topnost katalizatorja in sodelovati v katalitskem mehanizmu. V splošnem se uporablja Cs₂CO₃ kot baza, ligandi so navadno bidentatni (prolin, *N,N*-dimetilglicin, *N,N*-dimetiletandiamin). Razmerje ligand/Cu je navadno 1:1 ali 1:2 in baza/substrat 2:1. Izbira topila je odvisna od same reakcije, uporabljajo se tako polarna (DMF) kot nepolarna topila (toluen, dioksan) (60). Pri reakcijah pod vplivom mikrovalov prisotnost vode v topilih mnogokrat zmanjša količino nastalega produkta, zato je tam priporočena uporaba brezvodnih topil. Čas reakcije lahko močno zmanjšamo z uporabo mikrovalov, celo na 20 minut (61). Poznane so uspešne reakcije fenolov z različno substituiranimi arilhalidi ob prisotnosti CuI/Cs₂CO₃ z uporabo mikrovalov, ki so močno skrajšali čas reakcije (do 3 ur) (62, 63). Ker smo ob pregledu literature našli nekaj zapisov uspešnih sintez diaril etrov iz arilhalidov in *N*-Cbz-L-tirozin metilnega estra (64), smo reakcijo izvedli po znanem literaturnem postopku (63) z uporabo mikrovalov in brezvodnega dioksana kot topila. Reakcijo smo izvajali v inertni atmosferi pri različnih temperaturah, zbrano v preglednici V, z namenom najti optimalne reakcijske pogoje.

Preglednica V: Reakcijski pogoji za sintezo bazičnih aromatskih substituentov v stranski verigi na mestu N1 monobaktama.

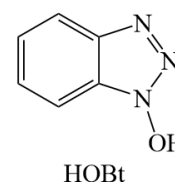
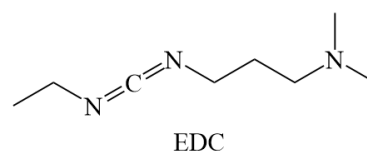
<i>Spojina</i>	Čas in temperatura
<u>10</u>	30 min, 100 °C + 30 min, 110 °C
	10 min 130 °C
<u>11</u>	10 min, 130 °C + 30 min, 130 °C
	+ 30 min, 140 °C + 30 min, 150 °C

Halogeni na mestu 2 ali 4 piridina se zlahka zamenjajo z drugimi nukleofili po mehanizmu adicija s sledečo eliminacija, saj je nastali intermediat resonančno stabiliziran z N, medtem

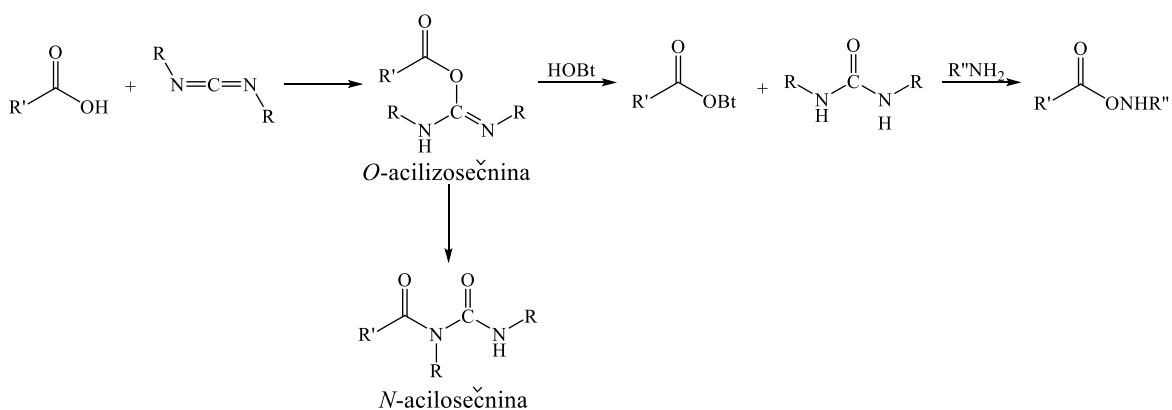
ko na mestu 3 taka stabilizacija ni možna in so zato 3-halo-piridini manj reaktivni, vendar še vedno nekoliko bolj kot halo-benzeni (65, 66). S_NAr pri 3-halo-piridinih poteče po alternativnem mehanizmu eliminacija s sledečo adicija (66). Hitrost substitucije in izkoristek lahko povečamo z uporabo mikrovalov namesto konvencionalnega gretja (65). Zaradi nižje reaktivnosti 3-halo-piridinov je bila za sintezo spojine **11** potrebna višja temperatura (150 °C) in uporaba 3 ekv. 3-Br-piridina, medtem ko smo za sintezo spojine **10** reakcijo izvajali pri 120 °C s 1,5 ekv. 2-Br-piridina. Kljub mnogim naštetim prednostim, ki jih ponuja izvajanje reakcije pod vplivom mikrovalov pa zaradi volumske omejenosti mikrovalovnega reaktorja reakcije z večjo količino niso bile možne. V kaloti namreč ni bilo mogoče zagotoviti optimalnega mešanja med reakcijo in posledično so bili na dnu prisotni neraztopljeni izhodni reagenti. Sintezo smo zato morali izvesti v večkratnih ponovitvah z majhnimi količinami. Spojino **10** smo kasneje sintetizirali tudi s klasičnim segrevanjem pod refluxom (110 °C) čez noč in uporabi 3 ekv. 2-Br-piridina. Izkoristek je bil primerljiv z izkoristkom pri reakciji v mikroreaktorju (10 min, 130 °C), kar nakazuje, da pri bolj reaktivnih derivatih uporaba mikrovalov nima značilne prednosti pred uporabo konvencionalnega gretja. Spojine **11** nismo poskušali sintetizirati s klasičnim segrevanjem, saj bi bila glede na pogoje pri reakciji z mikrovalovi potrebna višja temperatura kot pri spojini **10**, ki pa je zaradi vrelišča dioksana ne moremo doseči.

5.2 Sinteza β -laktamskega obroča

Za uvajanje β -laktamskega obroča v strukturo se pogosto uporablja aminokislina serin v obliki N-zaščitenega hidroksamata in kot dipeptid, npr. derivati serilglicina (67). Za tvorbo peptidne vezi med spojinama **12** oz. **15** in **13** smo uporabili sklopitvene reagente, s pomočjo katerih nastane peptidna vez med dvema aminokislinama v dveh korakih. Najprej se aktivira COOH skupina prve aminokislina, nato v drugem koraku NH_2 skupina (vstopajoče aminokislina) kot nukleofil napade aktivirano karboksilno skupino. Za aktivacijo karboksilne skupine je odgovoren sklopitveni reagent, najpogosteje se uporabljajo različni karbodiimidi (DCC, EDC), pri tem nastale *O*-acilizosečnina. Aktivacija karboksilne skupine je ključni korak, saj olajša nukleofilni napad, vendar če poteka prepočasi, lahko pride do razgradnje sklopitvenega reagenta (68). Čeprav je *O*-acilizosečnina odličen acilirajoči reagent, lahko poteče intramolekularna

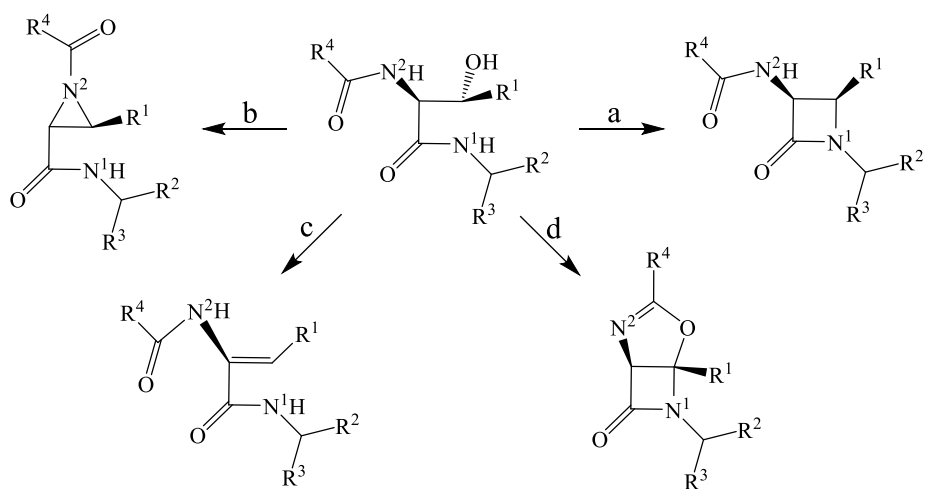


reakcija do *N*-acilsečnine, zato izvajamo sklopitvene reakcije vedno v prisotnost derivatov hidroksiamina (npr. HOBt), ob katerem nastane pri aktivaciji aktiviran ester, ki je odličen acilirajoči reagent (slika 18) (68, 69). Elektron-privlačna skupina Bt zmanjša elektronsko gostoto na karbonylnem C in poveča dovzetnost za nukleofilni napad (68). Dodatek terciarnega amina v zmes EDC/HOBt nekoliko poveča izkoristek. (70). Za tvorbo peptidne vezi med spojinama **13** in **14** oz. **15** smo uporabili kombinacijo EDC/HOBt ob prisotnosti NMM. Reakcijsko zmes smo pred dodatkom EDC ohladili, saj je reakcija eksotermna (predvsem aktivacija COOH) (68).



Slika 18: Shematski prikaz tvorbe peptidne vezi ob prisotnosti karboimidida in derivata hidroksiamina (HOBt). Povzeto po (68, 69).

Intramolekularno ciklizacijo oz. tvorbo β -laktamskega obroča smo izvedli z uporabo Mitsunobujeve reakcije, ki se uporablja tudi za direktno sintezo β -laktamskega obroča iz kiralnih aminokislin in peptidnih prekurzorjev. Primarni izziv pri taki sintezi je doseči selektivno ionizacijo zelene N–H vezi in sledečo ciklizacijo (puščica a, slika 19). Uspešnost reakcije je odvisna predvsem od kislosti N_1H skupine amida, torej nižji kot je pKa lažje poteče reakcija in več β -laktama nastane (71). Uporabili smo serin z dibenzilno zaščitenim N^2 in tako preprečili nastanek azitidina (puščica b, slika 19), ki bi lahko nastal zaradi prisotnosti proste N^2H skupine in nezadostne kislosti N^1H skupine, ki sodeluje v reakciji sinteze β -laktama. Prav tako bi lahko uporaba ftalimidne zaščite (tudi Cbz) vodila v eliminacijo vode do nastanka dvojne vezi na serinu (puščica c, slika 19) ali dihidrooksazola (puščica d, slika 19) (71).



Slika 19: Shematski prikaz ciklizacije v β -laktamski obroč (a) in nastanek stranskih produktov (b–d) (71).

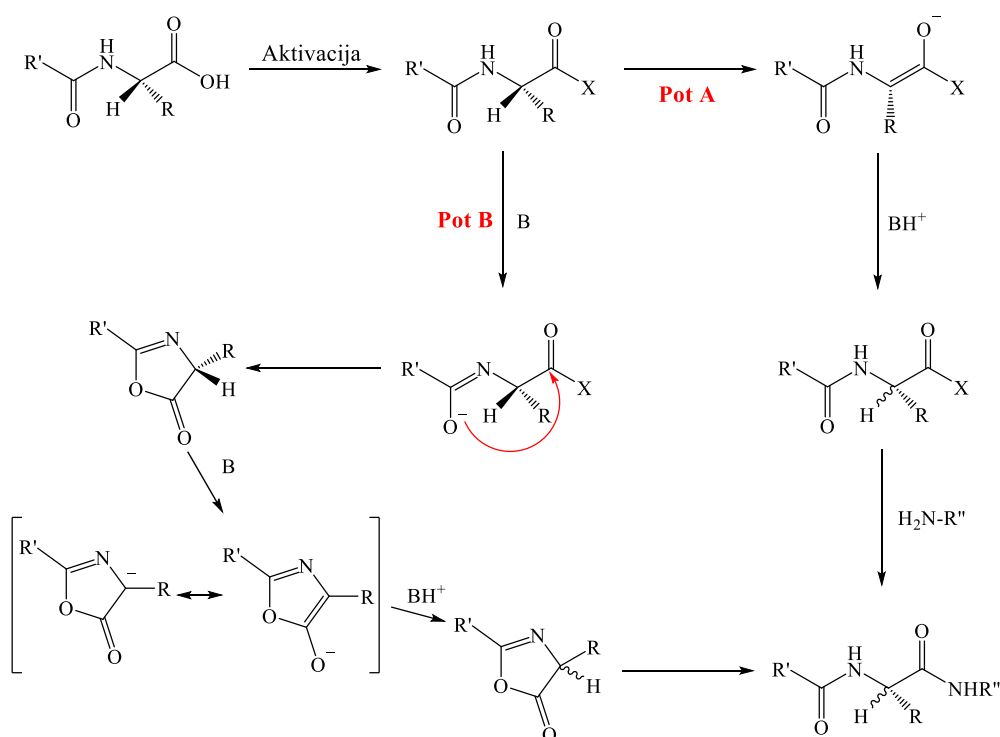
Odločili smo se za uporabo klasičnih pogojev Mitsunobujeve reakcije (glej poglavje 5.1.1.1 Mitsunobujeva reakcija). Prvi poskus s PPh₃ in 3 ekv. DIAD kot diazo reagentom ni bil uspešen, saj je bila količina nastalega produkta (spojina **17** oz. **18**) pri obeh reakcijah zanemarljiva. Zato smo poskusili z bolj reaktivnim reagentom DEAD v različno polarnih topilih (THF, DMF, toluen) in ob tem rahlo povečali izkoristek, vendar je bila izhodna spojina še vedno prisotna v znatni količini. Izkoristek nam je nato uspelo povečati s pomočjo segrevanja reakcijske zmesi pri temperaturi refluxa. Uporaba povišane temperature pri Mitsunobujevi reakciji je poznan ukrep, ki se uporablja pri sterično oviranih alkoholih, ki so slabo reaktivni pri običajnih pogojih reakcije (glej poglavje 5.1.1.1 Mitsunobujeva reakcija). Naši izhodni spojini **14** in **16** v svoji strukturi vsebujeta 4 aromatske obročje, kar lahko otežuje pravilno konformacijo spojine, ki je potrebna za nukleofilni napad amino skupine. Ciklizacija v β -laktamski obroč je bila lahko ovirana tudi zaradi epimerizacije, ki se je zgodila v zgodnejših stopnjah sinteze (glej poglavje 5.3 Izguba konformacije na stereogenem centru).

5.3 Izguba konformacije na stereogenem centru¹

Tekom laboratorijskega dela smo opazili prisotnost diastereoizomerne zmesi po tvorbi peptidne vezi pri spojini, ki vsebuje na mestu 3 derivatiziran piridin (spojina **16**), v razmerju $dr = 70:30$. Za sintezo načrtovanih spojin smo uporabili optično čiste aminokisliline, vendar je tekom sinteze lahko prišlo do izgube konformacije na stereogenem centru. Na aminokislini L-Ser je ohranitev stereogenega centra v (*S*) konformaciji nujna za posnemanje D-Ala-D-Ala aminokislinskega zaporedja. Kot že prej omenjeno je aktivacija

¹ Pri risanju in poimenovanju reakcij smo privzeli ohranitev konformacije na stereogenem centru.

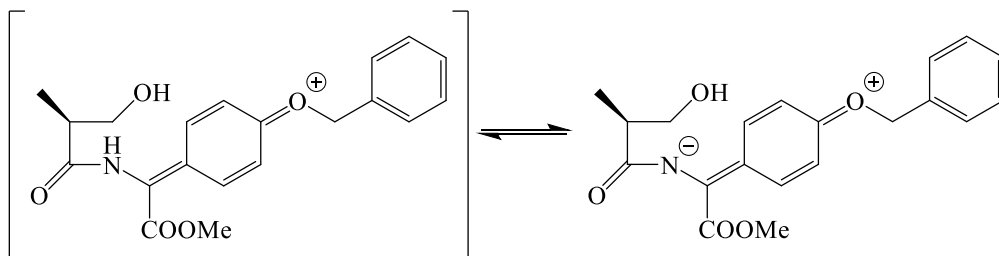
COOH skupine pri tvorbi peptidne vezi ključnega pomena, vendar lahko povzroči izgubo konformacije na kiralnem α -CH, ki lahko poteče po dveh mehanizmih, preko direktne enolizacije (pot A, slika 20) ali preko predhodnega nastanka oksazolona (pot B, slika 20). Oksazolona nastane, če je NH_2 skupina zaščitena v oblika karbamata ali amida, kar pospeši tudi aktivacija COOH skupine (68). Reakcijo smo izvajali z reagenti in pri pogojih, ki zmanjšujejo možnost izgube konformacije na stereogenem centru. Uporabili smo *N,N*-dibenzilno zaščiten Ser in s tem preprečili nastanek oksazolona, topilo CH_2Cl_2 , pri katerem skoraj ne pride do izgube konformacije (70) ter reakcijsko zmes ohladili pred dodatkom EDC, kar ravno tako zmanjša obseg epimerizacije (68). Epimerizacija po poti A ne prevlada in jo običajno opazimo le pri občutljivih aminokislinah s stransko verigo R, ki lahko stabilizira anion po odstranitvi protona (72).



Slika 20: Mehanizem izgube konformacije na stereogenem centru pri tvorbi peptidne vezi s sklopitvenimi reagenti. X: aktivator, B: baza. Prirejeno po (68).

Pri tvorbi β -laktamskega obroča lahko pride do izgube konformacije. Opazili so jo pri ciklizaciji derivatiziranega serilglicina, če je bil α -CH (v strukturi na sliki 19, glej poglavje 5.2 Sinteza β -laktama) substituiran z elektron-privlačnima skupinama, $\text{R}^3 = \text{COOR}$ in $\text{R}^2 = \text{C}_6\text{H}_4\text{OBzl}$, ki omogočita ionizacijo N^1H skupine (to pospeši ciklizacijo) in nastali ion hkrati tudi resonančno stabilizirata preko nastanka kinonmetidnega intermedija (slika 21) (71). Na samo epimerizacijo lahko vplivamo s količino uporabljenega diazo reagenta.

Ugotovljeno je bilo, da je diastereoizomerni izkoristek višji v primeru uporabe 1 ekv. kot pri 2,5 ekv. DEAD (71). Ker naši spojini **14** in **16** na α -CH ne vsebujeta substituentov (na Tyr), ki bi resonančno stabilizirali ionizirano N¹H skupino, epimerizacije vsaj po zgoraj omenjenem mehanizmu ne pričakujemo.



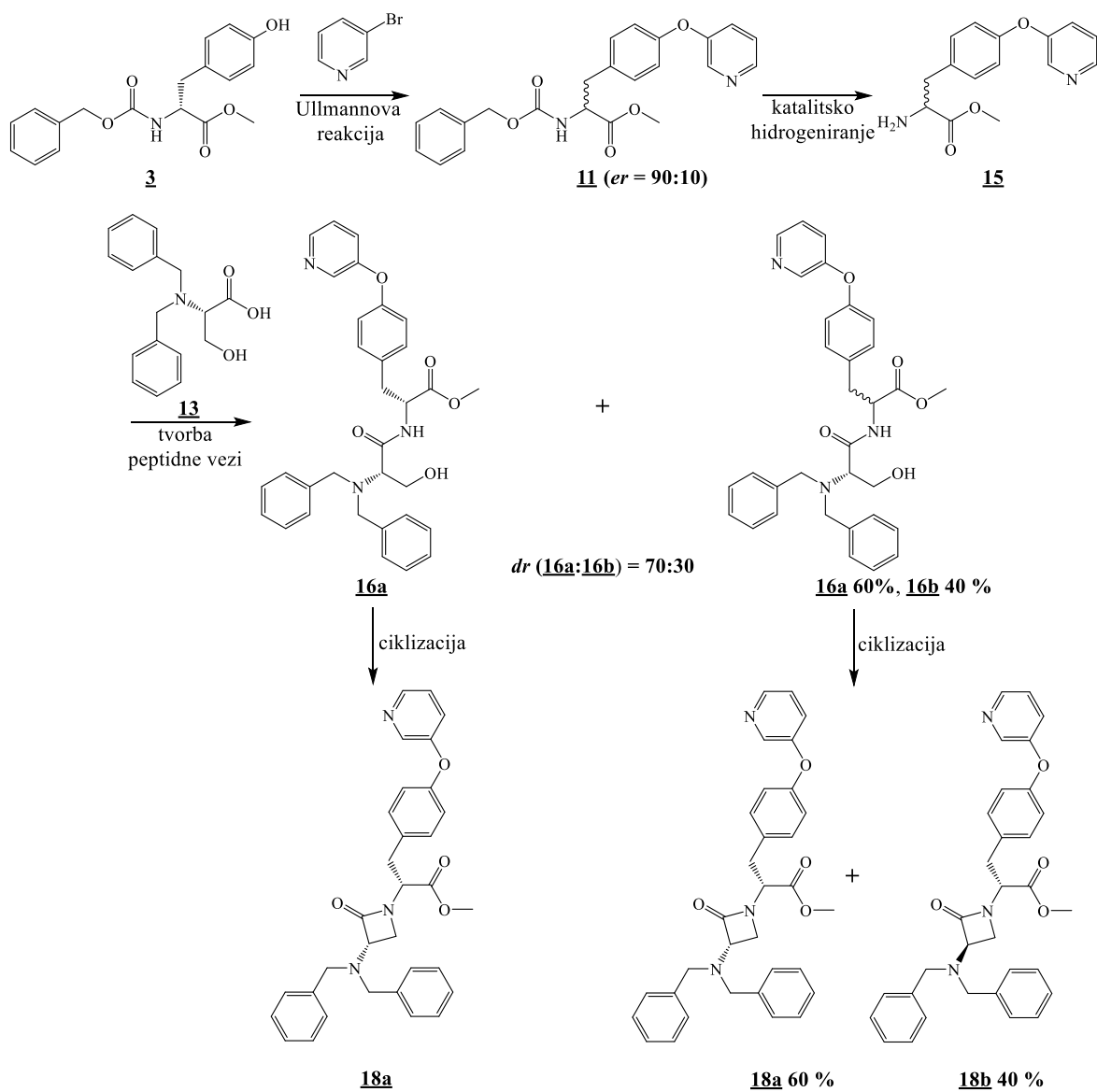
Slika 21: Kinonmetidni intermediat in resonačna stabilizacija ionizirane N¹H skupine. Povzeto po (71).

Posamezne reakcije smo izvajali v prisotnosti baz (NMM pKa 7,4, NaHCO₃ pKa 6,0 (73), 2-Br-piridini pKa 0,9; 3-Br-piridin pKa 2,8 (74)), kar predstavlja potencialno nevarnost za izgubo konformacije pri kiralnih aminokislinah, seveda je ta odvisno od kislosti α -protona (stranske verige) in same pKa vrednosti baze. Tudi uporabljena povišana temperatura lahko še dodatno pospeši epimerizacijo. Iz literature je znano, da derivatizirani metilni estri *N*-Boc-tirozina kljub uporabi 3,1 ekv. Na₂CO₃ (pKa 9,1 (73)) ne epimerizirajo (75), prav tako ne serin v prisotnosti NaOH pri sobni temperaturi, do epimerizacije pride šele pri segrevanju na 105 °C po 17 urah (76).

Izgubo konformacije na stereogenem centru smo prvič opazili pri spojini **11**, produktu tvorbe peptidne vezi, v razmerju *dr* = 70:30 (slika 22). Izolirati smo uspeli 48 % čistega izomera (spojina **16a**) in zmes obeh izomerov (spojina **16**) v razmerju *dr*(**16a:16b**) = 60:30. Po tvorbi β -laktamskega obroča pri spojini **16** se je razmerje izomerov **18a:18b**, kljub uporabi 3 ekv. DEAD, ohranilo² (*dr* = 60:40), kar nakazuje, da pri tvorbi β -laktamskega obroča ni dodatne epimerizacije. To potrjujejo tudi izsledki ciklizacije spojine **16a** v spojino **18a**, kjer nastanka diastereoizomerne zmesi nismo zaznali. S HPLC analizo s kiralnim selektorjem smo nato preverili, če je do izgube konformacije prišlo že pri Ullmannovi reakciji. Ugotovili smo, da je spojina **11** deloma epimerizirala v razmerju *dr* 90:10. Morebitno epimerizacijo med odstranitvijo benzilkarbamate zaščitne s spojine **11** nismo mogli preveriti, saj nam produkta s kolonsko kromatografijo ni uspelo očistiti, in posledično smo tvorbo peptidne vezi izvedli brez predhodne izolacije spojine **11**. V

² Pri izračunu razmerja izomerov smo predpostavili, da tekom čiščenja ni prišlo do selektivnih izgub enega od izomerov.

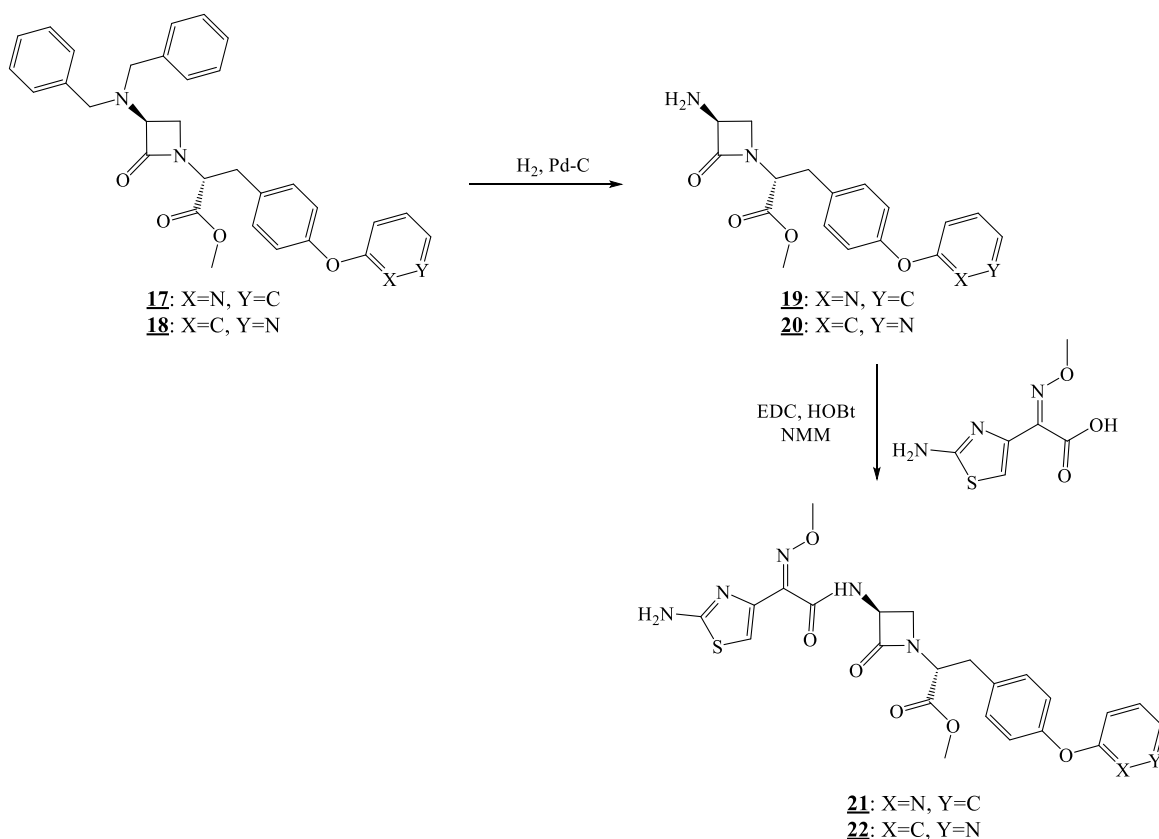
prihodnosti bo potrebno optimizirati to sintezno stopnjo, saj bo le tako možno določiti v kateri stopnji pride do signifikantne epimerizacije. Lahko bi poskusili tudi z uporabo druge zaščitne skupine, npr. Boc, ki se enostavno odstrani v kisljih pogojih. Iz opažanj lahko zaključimo, da je do izgube konformacije na stereogenem centru prišlo pri hidrogeniranju in/ali pri tvorbi peptidne vezi, ki znaša cca. 20 %, v manjšem obsegu tudi pri Ullmannovi reakciji (10%). Potrebno je omeniti, da smo pri derivatu, ki vsebuje na mestu 2 substituiran piridin, nastanek diastereoizomerne zmesi opazili šele po tvorbi β -laktamskega obroča (spojina **17**), pri tem smo uspeli delno izolirati le zmes izomerov, zato obsega epimerizacije tu ni bilo možno oceniti.



Slika 22: Shematski prikaz izgube konformacije na posameznih stopnjah sinteze z razmerji izoliranih stereoizomerov.

5.4 Sinteza končnih spojin

Po načrtovani sintezni poti smo uspešno sintetizirali spojine, ki so pripravljene za uvajanje strukturnih sprememb na NH₂ skupini β-laktamskega obroča (slika 23). V prvi stopnji je potrebno spojinama **17** in **18** s katalitskim hidrogeniranjem odstraniti dibenzilno zaščitno skupino. Nastali spojin **19** in **20** sta že lahko potencialna lažna substrata za encim MurF. V naslednji stopnji se na NH₂ skupino uvede substituent 2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetil. Za tvorba amidne vezi predlagamo uporabo sklopitvenih reagentov, ki smo jih uporabili pri sintezi spojin **14** in **16**.



Slika 23: Shema nadaljnjih stopenj v sintezi načrtovanih spojin.

6 Sklep

V okviru magistrske naloge smo uspešno razvili sintezni postopek za pripravo monobaktamov iz aminokislin D-Tyr in L-Ser. Za sintezo načrtovanih spojin je potrebno le pripenjanje stranske verige na mestu C3 β -laktamskega obroča. Med delom smo prišli do zanimivih spoznanj o fizikalno-kemijskih lastnostih hidroksilne skupine D-Tyr.

Največji izziva pri večstopenjski sintezi je predstavljalo *O*-alkiliranje hidroksilne skupine D-Tyr. Ugotovili smo, da Mitsunobujeva reakcija pri standardnih pogojih in ob uporabi dobro izstopajoče skupine na alkoholu, ni učinkovita metoda za *O*-alkiliranje spojine **3**. To lahko pomeni, da D-Tyr ni dovolj močan nukleofil, da smo uporabili preveč sterično ovirane alkohole ali oboje. Reakcija med spojino **3** in *N*-Boc-2-aminoalkoholom torej ni bila uspešna. *O*-ariliranje D-Tyr z Ullmannovo reakcijo je bilo uspešno, pri tem smo opazili pričakovano razliko v reaktivnosti med 2- in 3-Br-piridinom, saj je bila za sklopitev 3-Br-piridina in D-Tyr potrebna bistveno višja temperatura. Tekom sinteze smo s TLC ploščico in z NMR opazili nastanek diastereoizomerne zmesi (*dr* = 70:30), do katere je prišlo v stopnjah pred tvorbo β -laktamskega obroča. S HPLC analizo na normalnofazni koloni s kiralnim selektorjem smo potrdili delno epimerizacijo Tyr že pri Ullmannovi reakciji. Ugotovili smo, da je tvorba β -laktamskega obroča iz dipeptida L-Ser-D-Tyr z Mitsunobujevo reakcijo uspešna le pri povišani temperaturi.

Razvili smo sintezno metodo, ki bo služila kot osnova za nadaljnji razvoj in pripravo monobaktamskih analogov z različno derivatiziranim Tyr v stranski verigi. Načrtovani monobaktami naj bi poleg zaviranja PBP delovali tudi kot lažni substrati za MurF in kot taki izkazujejo nov način delovanja β -laktamskih antibiotikov. Verjamemo, da bodo naša opažanja in predlagane optimizacije mogoče uporabiti pri načrtovanju reakcij z aminokislinama Tyr in Ser. Po sintezi končnih aminokislinskih derivatov monobaktamov bodo potrebna biološka testiranja za ovrednotenje aktivnosti na PBP in MurF.

7 Literatura

1. Ventola CL. The Antibiotic Resistance Crisis. *P T* 2015; 40(4): 277–283. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4378521/>. Dostop: 14. 4. 2018.
2. Melander RJ, Melander C. The Challenge of Overcoming Antibiotic Resistance: An Adjuvant Approach? *ACS Infect Dis* 2017; 3(8): 559–563.
3. Shlaes DM, Sahm D, Opiela C, Spellberg B. The FDA Reboot of Antibiotic Development. *Antimicrob Agents Chemother* 2013; 57(10): 4605–4607.
4. Butler MS, Blaskovich MA, Cooper MA. Antibiotics in the clinical pipeline at the end of 2015. *J Antibiot* 2017; 70(1): 3–24.
5. Coates A, Hu Y, Bax R, Page C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat Rev Drug Discov* 2002; 1(11): 895–910.
6. Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA. Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32(2): 149–167.
7. Bouhss A, Trunkfield AE, Bugg TDH, Mengin-Lecreulx D. The biosynthesis of peptidoglycan lipid-linked intermediates. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32(2): 208–233.
8. Typas A, Banzhaf M, Gross CA, Vollmer W. From the regulation of peptidoglycan synthesis to bacterial growth and morphology. *Nat Rev Microbiol* 2012; 10(2): 123–136.
9. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32(2): 168–207.
10. Sham L-T, Butler EK, Lebar MD, Kahne D, Bernhardt TG, Ruiz N. MurJ is the flippase of lipid-linked precursors for peptidoglycan biogenesis. *Science* 2014; 345(6193): 220–222.
11. Mohammadi T, van Dam V, Sijbrandi R, Vernet T, Zapun A, Bouhss A, Diepeveen-de Bruin M, Nguyen-Distèche M, de Kruijff B, Breukink E. Identification of FtsW as a transporter of lipid-linked cell wall precursors across the membrane: FtsW transports Lipid II across the membrane. *EMBO J* 2011; 30(8): 1425–1432.

12. Macheboeuf P, Contreras-Martel C, Job V, Dideberg O, Dessen A. Penicillin Binding Proteins: key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30(5): 673–691.
13. El Zoeiby A, Sanschagrín F, Levesque RC. Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors: Structure-function and inhibitors of Mur enzymes. *Mol Microbiol* 2002; 47(1): 1–12.
14. Yan Y, Munshi S, Leiting B, Anderson MS, Chrzas J, Chen Z. Crystal structure of *Escherichia coli* UDPMurNAc-tripeptide d-alanyl-d-alanine-adding enzyme (MurF) at 2.3 Å resolution. *J Mol Biol* 2000; 304(3): 435–445.
15. Kouidmi I, Levesque RC, Paradis-Bleau C. The biology of Mur ligases as an antibacterial target: The biology of Mur ligases as an antibacterial target. *Mol Microbiol* 2014; 94(2): 242–253.
16. Cha S-S, An YJ, Jeong C-S, Yu JH, Chung KM. ATP-binding mode including a carbamoylated lysine and two Mg²⁺ ions, and substrate-binding mode in *Acinetobacter baumannii* MurF. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 450(2): 1045–1050.
17. Paradis-Bleau C, Lloyd A, Sanschagrín F, Clarke T, Blewett A, Bugg TD, Levesque RC. Phage display-derived inhibitor of the essential cell wall biosynthesis enzyme MurF. *BMC Biochem* 2008; 9(1): 33.
18. Sivaramakrishnan V, Thiyagarajan C, Kalaivanan S, Selvakumar R, Anusuyadevi M, Jayachandran K. Homology modeling, molecular docking and electrostatic potential analysis of MurF ligase from *Klebsiella pneumoniae*. *Bioinformation* 2012; 8(10): 466–473.
19. Miller DJ, Hammond SM, Anderluzzi D, Bugg TDH. Aminoalkylphosphinate inhibitors of D-Ala-D-Ala adding enzyme. *J Chem Soc, Perkin Trans 1* 1998; (1): 131–142.
20. Stamper GF, Longenecker KL, Fry EH, Jakob CG, Florjancic AS, Gu Y-G, Anderson DD, Cooper CS, Zhang T, Clark RF, Cia Y, Black-Schaefer CL, Owen McCall J, Lerner CG, Hajduk PJ, Beutel BA, Stoll VS. Structure-based Optimization of MurF Inhibitors. *Chem Biol Drug Des* 2006; 67(1): 58–65.

21. Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Abbanat D, Foleno B, Maden A, Goldschmidt R, Bush K. Utility of Muropeptide Ligase for Identification of Inhibitors of the Cell Wall Biosynthesis Enzyme MurF. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; 50(1): 230–236.
22. Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Klinger A, Foleno BD, Turchi I, Macielag M, Bush K. A MurF Inhibitor That Disrupts Cell Wall Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 2007; 51(12): 4420–4426.
23. Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Foleno BD, Simon LD, Guillemont J, Macielag M, Bush K. MurF Inhibitors with Antibacterial Activity: Effect on Muropeptide Levels. *Antimicrob Agents Chemother* 2009; 53(8): 3240–3247.
24. Turk S, Kovač A, Boniface A, Bostock JM, Chopra I, Blanot D, Gobec S. Discovery of new inhibitors of the bacterial peptidoglycan biosynthesis enzymes MurD and MurF by structure-based virtual screening. *Bioorg Med Chem* 2009; 17(5): 1884–1889.
25. Hrast M, Anderluh M, Knez D, Randall CP, Barreteau H, O'Neill AJ, Blanot D, Gobec S. Design, synthesis and evaluation of second generation MurF inhibitors based on a cyanothiophene scaffold. *Eur J Med Chem* 2014; 73: 83–96.
26. Hrast M, Turk S, Sosič I, Knez D, Randall CP, Barreteau H, Contreras-Martel C, Dessen A, O'Neill AJ, Mengin-Lecreulx D, Blanot D, Gobec S. Structure–activity relationships of new cyanothiophene inhibitors of the essential peptidoglycan biosynthesis enzyme MurF. *Eur J Med Chem* 2013; 66: 32–45.
27. Pratt RF. Substrate specificity of bacterial DD-peptidases (penicillin-binding proteins). *Cell Mol Life Sci* 2008; 65(14): 2138–2155.
28. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala JA, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32(2): 234–258.
29. Nicholas RA, Davies C. Structural Mechanisms of β -Lactam Antibiotic Resistance in Penicillin-Binding Proteins. Dougherty TJ (ed.), Pucci MJ (ed.). *Antibiotic Discovery and Development*. Springer, New York, 2012: 397–425.

30. Bernardo-García N, Mahasenan KV, Batuecas MT, Lee M, Hesk D, Petráčková D, Doubravová L, Branny P, Mobashery S, Hermoso JA. Allostery, Recognition of Nascent Peptidoglycan, and Cross-linking of the Cell Wall by the Essential Penicillin-Binding Protein 2x of *Streptococcus pneumoniae*. ACS Chem Biol 2018; 13(3): 694–702.
31. Zervosen A, Sauvage E, Frère J-M, Charlier P, Luxen A. Development of New Drugs for an Old Target — The Penicillin Binding Proteins. Molecules 2012; 17(11): 12478–12505.
32. Bush K, Bradford PA. β -Lactams and β -Lactamase Inhibitors: An Overview. Cold Spring Harb Perspect Med 2016; 6(8). <http://perspectivesinmedicine.cshlp.org/content/6/8/a025247.long>. Dostop: 20. 4 .2018.
33. Decuyper L, Jukić M, Sosić I, Žula A, D'hooghe M, Gobec S. Antibacterial and β -Lactamase Inhibitory Activity of Monocyclic β -Lactams. Med Res Rev 2018; 38(2): 426–503.
34. Kumar KM, Anbarasu A, Ramaiah S. Molecular docking and molecular dynamics studies on β -lactamases and penicillin binding proteins. Mol Biosyst 2014; 10(4): 891–900.
35. Kumar KM, Anitha P, Sivasakthi V, Bag S, Lavanya P, Anbarasu A, Ramaiah S. In silico study on Penicillin derivatives and Cephalosporins for upper respiratory tract bacterial pathogens. 3 Biotech 2014; 4(3): 241–251.
36. Lovering AL, Gretes MC, Safadi SS, Danel F, de Castro L, Page MGP, Strynadka NCJ. Structural Insights into the Anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) Activity of Ceftobiprole. J Biol Chem 2012; 287(38): 32096–32102.
37. Hebeisen P, Heinze-Krauss I, Angehrn P, Hohl P, Page MGP, Then RL. In Vitro and In Vivo Properties of Ro 63-9141, a Novel Broad-Spectrum Cephalosporin with Activity against Methicillin-Resistant Staphylococci. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45(3): 825–836.
38. Krause-Heuer AM, Howell NR, Matesic L, Dhand G, Young EL, Burgess L, Jiang CD, Lengkeek NA, Fookes CJR, Pham TQ, Sobrio F, Greguric I, Fraser BH. A new class of fluorinated 5-pyrrolidinylsulfonyl isatin caspase inhibitors for PET imaging of apoptosis. Med Chem Comm 2013; 4(2): 347–352.

39. Braghiroli D, Avallone R, Bella MD. Asymmetric synthesis of (R)- and (S)-2-pyrrolidinemethanesulfonic acid. *Tetrahedron: Asymmetry* 1997; 8(13): 2209–2213.
40. Lebreton J. Recent advance in the Mitsunobu reaction. *Atlan Chim Pharma* 2006. http://www.atlanchimpharma.com/wp-content/uploads/2016/05/06-Article_J_LEBRETON_2006-10.pdf. Dostop: 15. 9. 2017.
41. Swamy KCK, Kumar NNB, Balaraman E, Kumar KVPP. Mitsunobu and Related Reactions: Advances and Applications. *Chem Rev* 2009; 109(6): 2551–2651.
42. Herr RJ. A Whirlwind Tour of Current Mitsunobu Chemistry. *Albany Mol Res Tech Rep* 1999; 3: 1–36. <https://erowid.org/archive/rhodium/pdf/current.mitsunobu.chemistry.tour.pdf>. Dostop: 29. 3. 2018.
43. Hughes DL. Mitsunobu Reaction. Paquette LA (ed.). *Organic reactions*. Volume 42. Wiley & Sons Ltd, Hardcover, 1992: 335–656.
44. Camp D, Harvey PJ, Jenkins ID. The effect of solvent polarity on the rate of the Mitsunobu esterification reaction. *Tetrahedron* 2015; 71(23): 3932–3938.
45. Tsunoda T, Kaku H, Itô S. Mitsunobu Reagents. TCI Mail no. 123 2005. <http://www.tcichemicals.com/en/us/support-download/tcimail/backnumber/article/123drE.pdf>. Dostop: 29. 3. 2018.
46. Vaccaro WD, Davis HR. Sugar-substituted 2-azetidinone cholesterol absorption inhibitors: Enhanced potency by modification of the sugar. *Bioorg Med Chem Lett* 1998; 8(3): 313–318.
47. Lizarzaburu ME, Shuttleworth SJ. Synthesis of aryl ethers from aminoalcohols using polymer-supported triphenylphosphine. *Tetrahedron Lett* 2002; 43(12): 2157–2159.
48. Shi Y-J, Hughes DL, McNamara JM. Stereospecific synthesis of chiral tertiary alkyl-aryl ethers via Mitsunobu reaction with complete inversion of configuration. *Tetrahedron Lett* 2003; 44(18): 3609–3611.

49. Baldoli C, Rigamonti C, Maiorana S, Licandro E, Falciola L, Mussini PR. A New Triferrocenyl-tris(hydroxymethyl)aminomethane Derivative as a Highly Sensitive Electrochemical Marker of Biomolecules: Application to the Labelling of PNA Monomers and Their Electrochemical Characterization. *Chem Eur J* 2006; 12(15): 4091–4100.
50. Guandalini L, Norcini M, Varani K, Pistolozzi M, Gotti C, Bazzicalupi C, Martini E, Dei S, Manetti D, Scapecchi S, Teodori E, Bertucci C, Ghelardini C, Romanelli MN. Design, Synthesis, and Preliminary Pharmacological Evaluation of New Quinoline Derivatives as Nicotinic Ligands. *J Med Chem* 2007; 50(20): 4993–5002.
51. Chu W, Zhang J, Zeng C, Rothfuss J, Tu Z, Chu Y, Reichert DE, Welch MJ, Mach RH. *N*-Benzylisatin Sulfonamide Analogues as Potent Caspase-3 Inhibitors: Synthesis, in Vitro Activity, and Molecular Modeling Studies. *J Med Chem* 2005; 48(24): 7637–7647.
52. Lee D, Long SA, Murray JH, Adams JL, Nuttall ME, Nadeau DP, Kikly K, Winkler JD, Sung C-M, Ryan MD, Levy MA, Keller PM, DeWolf WE. Potent and Selective Nonpeptide Inhibitors of Caspases 3 and 7. *J Med Chem* 2001; 44(12): 2015–2026.
53. Davies DR, Mamat B, Magnusson OT, Christensen J, Haraldsson MH, Mishra R, Pease B, Hansen E, Singh J, Zembower D, Kim H, Kiselyov AS, Burgin AB, Gurney ME, Stewart LJ. Discovery of Leukotriene A4 Hydrolase Inhibitors Using Metabolomics Biased Fragment Crystallography. *J Med Chem* 2009; 52(15): 4694–4715.
54. Sandanayaka V, Mamat B, Mishra RK, Winger J, Krohn M, Zhou L-M, Keyvan M, Enache L, Sullins D, Onua E, Zhang J, Halldorsdottir G, Sigthorsdottir H, Thorlaksdottir A, Sigthorsson G, Thorsteinnsdottir M, Davies DR, Stewart LJ, Zembower DE, Andresson T, Kiselyov AS, Singh J, et al. Discovery of 4-[(2*S*)-2-[[4-(4-Chlorophenoxy)phenoxy]methyl]-1-pyrrolidinyl]butanoic Acid (DG-051) as a Novel Leukotriene A4 Hydrolase Inhibitor of Leukotriene B4 Biosynthesis. *J Med Chem* 2010; 53(2): 573–585.
55. Lidström P, Tierney J, Wathey B, Westman J. Microwave assisted organic synthesis—a review. *Tetrahedron* 2001; 57: 9225–9283.

56. Tookmanian EM, Phillips-Piro CM, Fenlon EE, Brewer SH. Azidoethoxyphenylalanine as a Vibrational Reporter and Click Chemistry Partner in Proteins. *Chem Eur J* 2015; 21(52): 19096–19103.
57. Ma M-T, Lu J-M. Dinuclear Pd(II)-NHC complex derived from proline and its application toward Mizoroki-Heck reaction performed in water: Dinuclear Pd(II)-NHC complex toward Mizoroki-Heck reaction in water. *Appl Organomet Chem* 2012; 26(4): 175–179.
58. Baldoli C, Oldani C, Licandro E, Ramani P, Valerio A, Ferruti P, Falciola L, Mussini P. Ferrocene derivatives supported on poly(N-vinylpyrrolidin-2-one) (PVP): Synthesis of new water-soluble electrochemically active probes for biomolecules. *J Organometallic Chem* 2007; 692(6): 1363–1371.
59. Maza JC, McKenna JR, Raliski BK, Freedman MT, Young DD. Synthesis and Incorporation of Unnatural Amino Acids To Probe and Optimize Protein Bioconjugations. *Bioconjugate Chem* 2015; 26(9): 1884–1889.
60. Sambigiagio C, Marsden SP, Blacker AJ, McGowan PC. Copper catalysed Ullmann type chemistry: from mechanistic aspects to modern development. *Chem Soc Rev* 2014; 43(10): 3525–3550.
61. Zhu X-H, Chen G, Ma Y, Song H-C, Xu Z-L, Wan Y-Q. A General, Highly Efficient Ullmann C-O Coupling Reaction under Microwave Irradiation and the Effects of Water. *Chinese J Chem* 2007; 25(4): 546–552.
62. He H, Wu Y-J. Synthesis of diaryl ethers through the copper-catalyzed arylation of phenols with aryl halides using microwave heating. *Tetrahedron Lett* 2003; 44(17): 3445–3446.
63. Ma D, Cai Q. *N, N*-Dimethyl Glycine-Promoted Ullmann Coupling Reaction of Phenols and Aryl Halides. *Org Lett* 2003; 5(21): 3799–3802.
64. Cai Q, Zou B, Ma D. Mild Ullmann-Type Biaryl Ether Formation Reaction by Combination of ortho-Substituent and Ligand Effects. *Angew Chem Ed Engl* 2006; 118(8): 1298–1301.

65. Joule JA, Mills K. Pyridines: Reactions and Synthesis. *Heterocyclic Chemistry*. John Wiley & Sons Ltd, 2010: 125–176.
66. Wade LG Jr. Amines. *Organic Chemistry*. 8th ed. Upper Saddle River: Pearson Education, 2018: 439–466.
67. Wiśniewski K, Kołodziejczyk AS, Falkiewicz B. Applications of the Mitsunobu reaction in peptide chemistry. *J Pept Sci* 1998; 4(1): 1–14.
68. Al-Warhi TI, Al-Hazimi HMA, El-Faham A. Recent development in peptide coupling reagents. *J Saudi Chem Soc* 2012; 16(2): 97–116.
69. Benoiton LN. Methods for the Formation of Peptide Bonds. *Chemistry of Peptide Synthesis*. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006: 25–64.
70. Carpino LA, El-Faham A. The diisopropylcarbodiimide/ 1-hydroxy-7-azabenzotriazole system: Segment coupling and stepwise peptide assembly. *Tetrahedron* 1999; 55(22): 6813–6830.
71. Miller MJ, Mattingly PG. The direct chemical conversion of peptides to β -lactams. *Tetrahedron* 1983(15): 2563–2570.
72. Yi Y. Peptide Racemization. *Side Reactions in Peptide Synthesis*. Elsevier Inc., 2015: 257–292.
73. Henderson RK, Hill AP, Redman AM, Sneddon HF. Development of GSK's acid and base selection guides. *Green Chem* 2015; 17(2): 945–949.
74. Widjaja F, Jin Z, Nash JJ, Kenttämaa HI. Comparison of the Reactivity of the Three Distonic Isomers of the Pyridine Radical Cation Toward Tetrahydrofuran in Solution and in the Gas Phase. *J Am Soc Mass Spectr* 2013; 24(4): 469–480.
75. Prieto M, Mayor S, Rodríguez K, Lloyd-Williams P, Giralt E. Racemization in Suzuki Couplings: A Quantitative Study Using 4-Hydroxyphenylglycine and Tyrosine Derivatives as Probe Molecules. *J Org Chem* 2007; 72(3): 1047–1050.
76. Crawhall JC, Elliott DF. A Note on the Racemization of Serine. *Biochem J* 1951; 48(2): 237–238.