

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO KLJUČEVŠEK

**RAZVOJ SINTEZNE POTI ZA PRIPRAVO 4-HIDROKSIFENILGLICINSKIH
DERIVATOV MONOBAKTAMOV**
MAGISTRSKA NALOGA

MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MARKO KLJUČEVŠEK

**RAZVOJ SINTEZNE POTI ZA PRIPRAVO 4-HIDROKSIFENILGLICINSKIH
DERIVATOV MONOBAKTAMOV
SYNTHETIC ROUTE DEVELOPMENT OF 4-HYDROXYPHENYLGLYCINE
MONOACTAM DERIVATIVES
MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM INDUSTRIJSKA FARMACIJA**

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Martine Hrast, mag. farm.

Spektroskopske meritve in NMR analize so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo.

ZAHVALA

Zahvalil bi se rad prof. dr. Stanislavu Gobcu, mag. farm. in doc. dr. Martini Hrast, mag. farm. za pomoč in nasvete pri izdelavi magistrskega dela. Ob tej priložnosti se zahvaljujem tudi družini, dekletu in prijateljem za podporo in pomoč v času študija.

IZJAVA

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom prof. dr. Stanislava Gobca, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Martine Hrast, mag. farm.

Marko Ključevšek

Kazalo vsebine

POVZETEK	vi
ABSTRACT	vii
SEZNAM OKRAJŠAV	viii
1 UVOD.....	1
1.1 Protibakterijske učinkovine	1
1.2 Bakterijska odpornost	1
1.2.1 Mehanizem bakterijske odpornosti.....	2
1.2.2 Posledice bakterijske odpornosti	3
1.3 Biosinteza peptidoglikana	3
1.3.1 Biosinteza UDP-GlcNAc.....	4
1.3.2 Biosinteza UDP-MurNAc.....	5
1.3.3 Biosinteza UDP-MurNAc peptidov.....	5
1.3.4 Mur ligaze.....	5
1.4 Penicilin vezoči proteini	6
1.4.1 β -laktamski zaviralci PBP-jev	7
2 NAMEN DELA	11
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 Materiali	12
3.2 Metode	12
3.2.1 Kromatografske metode	12
3.2.2 Spektroskopske metode	12
3.2.3 Določanje temperatur tališč	12
3.2.4 Ekstrakcije	13
3.2.5 Poimenovanje in risanje spojin.....	13
4 EKSPIRIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ.....	14
4.1 Sinteza metil (R)-2-amino-2-(4-hidroksifenil)acetata (2a).....	14
4.2 Sinteza metil (R)-2-((terc-butoksikarbonil)amino)-2-(4-hidroksifenil)acetata (3a)	15
4.3 Sinteza metil (R)-2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((terc-butoksikarbonil) amino) acetata (4a)	16
4.4 Sinteza (R)-1-(4-(benziloksi)fenil)-2-metoksi-2-oksoetan-1-amonijevega klorida (5a)	17

4.5	Sinteza (R)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanojske kisline (2b).....	18
4.6	Sinteza metil (R)-2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((S)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) acetata (1c)	19
4.7	Sinteza metil (R)-2-(4-benziloksi)fenil-2-((S)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)acetata (2c)	21
4.8	Sinteza metil (R)-2-((S)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)acetata (3c)	23
4.9	Sinteza metil (R)-2-((R)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)acetata (5c)	24
4.10	Sinteza metil (R)-2-((R)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-(piridin-3-ilmetoksi)fenil)acetata (6c)	26
4.11	Poizkus sinteze metil (R)-2-((R)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-(piridin-3-ilmetoksi)fenil)ocetne kisline (7c)	27
4.12	Poizkus sinteze metil (R)-2-((S)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-(piridin-3-ilmetoksi)fenil)acetata (6c)	28
4.13	Poizkus sinteze metil (R)-2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((S)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) acetata.....	29
4.14	Sinteza metil 2-(((benziloksi)D-karbonil)amino)-2-(4-(piridin-2-iloksi)fenil)acetata (2d).....	30
4.15	Sinteza metil 2-amino-2-(4-(piridin-2-iloksi)fenil)acetata	31
4.16	Sinteza metil 2-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)-2-(4-piridin-2-iloksi)fenil)acetata	32
4.17	Poizkus sinteze metil (R)-2-((S)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-piridin-3-iloksi)fenil) acetata	33
5	RAZPRAVA.....	34
6	SKLEPI.....	38
7	VIRI.....	39

Kazalo tabel

Tabela 1: Prikaz mehanizmov bakterijske odpornosti na znane antibiotike (6).....	2
--	---

Kazalo slik

Slika 1: Prikaz citoplazemskih stopenj biosinteze peptidoglikana (2).	4
Slika 2: Prikaz 3D struktur Mur ligaz. a) Prosta, odprta oblika liganda MurC, b) Zaprta oblika MurD Escherichie coli, c) Zaprta oblika MurC E. coli, d) Zaprta oblika MurF kompleksa v Streptococcus pneumoniae (2).	6
Slika 3: Prikaz reakcij transpeptidaz, ki jih katalizirajo penicilin vezoči proteini (13).....	7
Slika 4: Prikaz struktur nekaterih inhibitorjev transpeptidaz (13).....	8
Slika 5: Sinteza metil (R)-2-amino-2-(4-hidroksifenil)acetata.....	14
Slika 6: Sinteza metil (R)-2-((terc-butoksikarbonil)amino)-2-(4-hidroksifenil)acetata.....	15
Slika 7: Sinteza metil (R)-2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((terc-butoksikarbonil) amino) acetata	16
Slika 8: Sinteza (R)-1-(4-(benziloksi)fenil)-2-metoksi-2-oksoetan-1-amonijevega klorida	17
Slika 9: Sinteza (R)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanojske kisline.....	18
Slika 10: Sinteza metil (R)-2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((S)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) acetata	19
Slika 11: Sinteza metil (R)-2-(4-benziloksi)fenil-2-((S)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)acetata	21
Slika 12: Sinteza metil (R)-2-((S)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)acetata	23
Slika 13: Sinteza metil (R)-2-((R)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)acetata	24
Slika 14: Sinteza metil (R)-2-((R)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-(piridin-3-ilmetoksi)fenil)acetata	26
Slika 15: Poizkus sinteze metil (R)-2-((R)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-(piridin-3-ilmetoksi)fenil)ocetne kisline	27
Slika 16: Poizkus sinteze metil (R)-2-((S)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-(piridin-3-ilmetoksi)fenil)acetata....	28

Slika 17: Poizkus sinteze metil (R)-2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((S)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) acetata	29
Slika 18: Sinteza metil 2-(((benziloksi)D-karbonil)amino)-2-(4-(piridin-2-iloksi)fenil)acetata	30
Slika 19: Sinteza metil 2-amino-2-(4-(piridin-2-iloksi)fenil)acetata.....	31
Slika 20: Sinteza metil 2-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)-2-(4-piridin-2-iloksi)fenil)acetata	32
Slika 21: Poizkus sinteze metil (R)-2-((S)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-piridin-3-iloksi)fenil) acetata.....	33
Slika 22: Mehanizem Mitsunobujeve reakcije (22).....	34
Slika 23: Skupna shema kemijskih reakcij	36

POVZETEK

Zaradi razvoja bakterijske odpornosti je ves čas potrebno razvijati nove protibakterijske učinkovine, zato smo se v magistrski nalogi usmerili v razvoj sintezne poti derivatov monobaktamov, ki bi oponašali znan β -laktamski antibiotik ceftobiprol. Takšni antibiotiki zavirajo penicilin vezoče proteine in tako preprečujejo nastanek peptidoglikana, ki je bistven za celično steno bakterij in preživetje bakterij.

V okviru magistrske naloge smo uporabili različne sintezne metode, kot so Mitsunobujeva reakcija, sklopitvena reakcija, katalitsko hidrogeniranje in Ullmanova kataliza etra. Izhajali smo iz optično čistih aminokislin v želji, da bi dobili čiste produkte, ki bi imeli podobno strukturo in delovanje kot ceftobiprol. Produkte, ki smo jih izolirali s pomočjo kolonske kromatografije smo analizirali z NMR in masno spektroskopijo ter tako določili uspešnost sintezne poti. Uporabili smo tudi različne reagente v istem sinteznem koraku in primerjali dobljene rezultate.

V okviru sintezne poti nam je uspelo sintetizirati spojino, ki je strukturno podobna ceftobiprolu. Takšno spojino smo optimizirali z 2-pikolilkloridom in dobili zelene rezultate, saj smo sintetizirali spojino, ki bi lahko oponašala delovanje ceftobiprola.

Ključne besede: ceftobiprol, β -laktami, penicilin vezoči proteini

ABSTRACT

Development of new antibiotics is very important due to the spread of bacterial resistance. We developed a synthetic route for monobactam derivatives, which mimic a well known β -lactam antibiotic ceftobiprole. This kind of antibiotics inhibit penicillin binding proteins and prevent the formation of peptidoglycane, which is essential for bacterial cell wall and survival of bacteria.

In our work we used several synthetic methods, such as Mitsunobu reaction, coupling reaction, catalytic hydrogenation and Ullman ether synthesis. Our synthesis route started from optically pure amino acids, with the goal to obtain pure products, which would have similar structure and activity of ceftobiprole. Products were isolated by column chromatography and analysed with NMR and mass spectroscopy. We also compared the results where we used different reagents in the same synthetic route.

In our experiment we managed to synthesise structurally similar compound to ceftobiprole. Optimization with 2-picolylchloride led to synthesis of a compound which could mimic ceftobiprole's activity.

Keywords: ceftobiprole, β -lactams, penicillin binding proteins

SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozindifosfat
Ala	alanin
ATMO	2-amino-4-tiazolil metoksiimino skupina
ATP	adenozintrifosfat
bs	širok singlet
Bzl	benzil
CDCl ₃	devteriran kloroform
d	dublet
dd	dublet dubleta
ddd	dublet dubleta dubleta
DEAD	dietil azodikarboksilat
DIAD	disopropil azodikarboksilat
DKM	diklorometan
DMF	dimetilformamid
DMSO-d ₆	devteriran dimetilsulfoksid
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EtOAc	etil acetat
EtOH	etanol
FDA	Ameriška agencija za hrano in zdravila (ang. Food and drug administration)
GlcN	glukozamin
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
GlmM	fosfoglukozamin mutaza
GlmS	glukozamin-6-fosfat
GlmU	encim glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza in <i>N</i> -acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferaza
Glu	glutaminska kislina
HATU	heksafluorofosfat azabenzotriazol tetrametil uronij
Hex	n-heksan
HOBt	hidroksibenzotriazol
Lys	lizin

m	multiplet
m-A ₂ pm	mezo- diaminopimelinska kislina
MeOH	metanol
MF	mobilna faza
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MRSA	proti meticilinu odporni <i>Staphylococcus aureus</i>
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruviltransferaza
MurB	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat-L-alanin ligaza
MurD	UDP- <i>N</i> - acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamil m-diaminopimelat/L-lizin ligaza
MurF	UDP-I-acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat-m-diaminopimelat/L-lizin-D-alanil-D-alanin ligaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NMM	n-metilmorfolin
NMR	jedrska magnetna resonanca
PASTA	domena penicilin vezočih proteinov in serin/treonin kinaz
PBP	penicilin vezoči proteini
PEP	fosfoenolpiruvat
PRSP	proti penicilinu odporni <i>Streptococcus pneumoniae</i>
Rf	retencijski faktor
s	singlet
SAR	odnos med strukturo in delovanjem
t	triplet
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija
T _{tal}	temperatura tališča
UDP	uridin difosfat
UDP-GlcNAc	uridildifosfat- <i>N</i> -acetilglukozamin
UDP-MurNAc	uridildifosfat- <i>N</i> -acetilmuraminska kislina
WHO	Svetovna zdravstvena organizacija

1 UVOD

1.1 Protibakterijske učinkovine

Med najpomembnejša odkritja 20. stoletja na področju zdravstva uvrščamo prav odkritje protibakterijskih učinkovin. Leta 1928 je dr. Alexander Fleming iz glive *Penicillium chrysogenum* izoliral prvo antibiotično spojino – penicilin. Danes poznamo številne spojine s protibakterijskim delovanjem, v nalogi pa se bomo osredotočili predvsem na β -laktamske antibiotike. Na trgu je registriranih na stotine β -laktamskih antibiotikov, ki jih na grobo lahko razvrstimo v štiri podskupine: penicilini, cefalosporini, monobaktami in karbapenemi. Tovrstni antibiotiki, kot je že iz imena razvidno vsebujejo β -laktamski obroč, ki oponaša D-Ala-D-Ala fragment peptidnega stebla v peptidoglikanu. Na ta način zavirajo sintezo peptidoglikanskega ogrodja bakterijske celične stene, saj inaktivirajo encim transpeptidazo, ki je ključen za končno tvorbo peptidoglikana. Najbolj pomemben mehanizem bakterijske rezistence predstavlja prisotnost encima beta laktamaze, ki hidrolizira β -laktamski obroč. Kljub temu da poznamo že mnogo predstavnikov te skupine antibiotikov, pa so še vedno možnosti odkritja novih. Eden takšnih je ceftobiprol, ki inhibira tako β -laktamaze, kot tudi PBP2a, in je tako primeren za zdravljenje tudi na meticilin odpornih sevov *Staphylococcus aureus* (i.e. MRSA). Ceftobiprol so že odobrili za klinično uporabo v Švici in Kanadi, čaka pa se še na končno odobritev iz strani Ameriške agencije za hrano in zdravila (FDA) (1, 2).

Poleg farmakološkega vpliva pa so β -laktami pomembni tudi iz sintetskega vidika, saj imajo lahko tudi vlogo gradnika pri sintezi mnogih cikličnih in heterocikličnih tarčnih spojin. Kot primer lahko izpostavimo 3-amino- β -laktame, ki se s pomočjo modifikacij stranskih verig oz. obroča, lahko pretvorijo v veliko različnih β -laktamskih produktov. Glavni pristop za sintezo β -laktamskega obroča vključuje reakcije cikloadicije oz. ciklizacije. Pri ciklizaciji ponavadi pride do nastanka N_1-C_2 , N_1-C_4 in C_3-C_4 vezi. Za nastanek N_1-C_2 vezi so potrebni substrati, kot so β -amino estri z zaščiteno amino skupino (3, 4, 5).

1.2 Bakterijska odpornost

O bakterijski odpornosti govorimo takrat, ko učinkovina izgubi sposobnost zaviranja rasti bakterijskih celic. Na ta način bakterije postanejo odporne na zdravilo in se razmnožujejo

kljub prisotnosti antibiotikov, zato je potrebno zvišati koncentracijo zdravilne učinkovine nad minimalno inhibitorno koncentracijo (MIK), da dosežemo enako učinkovitost zdravila, kot ga je zdravilo imelo pred razvojem rezistence bakterije (6, 7).

1.2.1 Mehanizem bakterijske odpornosti

Bakterijska odpornost se lahko pojavi kot naravni proces selekcije, kjer pride do mutacije genov. Naravno pridobljena odpornost pa ni edini mehanizem (Tabela 1), saj so bakterije tudi same sposobne prenašati genetski material tako, da med seboj izmenjujejo plazmide. Dokazano je tudi bilo, da obstaja korelacija med bakterijsko odpornostjo in zaužitjem zdravila, kar pomeni, da se odpornost lahko razvije zaradi pomanjkljivega jemanja predpisanega zdravila. Bakterije dalj časa ostanejo nedotaknjene s strani antibiotika in na ta način postanejo močnejše ter posledično bolj odporne.

Bakterije lahko skozi leta postanejo odporne tudi na več različnih razredov antibiotikov. Pri stafilokokih so zasledili istočasno rezistenco, ki je bila posledica kromosomske mutacije, neefektivnega transporta aminoglikozidov v bakterijsko celico ter modifikacije v bakterijskih encimih. Rezistenca na določen antibiotik pa lahko vodi v razširjeno rezistenco tudi na strukturno podobne spojine iz iste skupine antibiotikov. Kot primer lahko navedemo odpornost na tetraciklin, ki lahko vodi tudi v odpornost bakterije na oksitetraciklin, klorotetraciklin, doksiciklin in minociklin (6, 8).

Tabela 1: Prikaz mehanizmov bakterijske odpornosti na znane antibiotike (6)

Vrsta antibiotikov	Primer antibiotikov	Vrsta odpornosti
β -laktami	Penicilini, cefalosporini, karbapenemi, monobaktami	Hidroliza, efluks, sprememba tarče
Aminoglikozidi	Streptomycin, Gentamicin	Fosforilacija, efluks, sprememba tarče
Glikopeptidi	Vankomicin	Sprememba v biosintezi peptidoglikana
Tetraciklini	Minociklin, Tigeciklin	Monooksigenacija, sprememba tarče, efluks
Makrolidi	Eritromicin, Azitromicin	Hidroliza, fosforilacija, glikozilacija, sprememba tarče
Kinoloni	Ciprofloksacin	Acetilacija, sprememba tarče, efluks
Sulfonamidi	Sulfometoksazol	Efluks, sprememba tarče

1.2.2 Posledice bakterijske odpornosti

Bakterijska odpornost že zdaj povzroča mnogo težav po svetu, saj dnevno prihaja do preštevlnih smrti in življenja ogrožajočih infekcij. Letno je samo v ZDA zaradi bolnišnično povzročenih infekcij bilo zabeleženih več kot 63.000 smrtnih primerov. V Evropi je številka manjša, a še vedno približno 25.000 bolnikov umre zaradi infekcij z bakterijami, ki so odporne tudi na več učinkovin hkrati. Svetovna zdravstvena organizacija (WHO) opozarja, da bodo v prihodnosti tudi manjše poškodbe in infekcije lahko vodile v smrt pacienta, če ne bo ustreznih ukrepov proti bakterijski odpornosti (6, 7, 9).

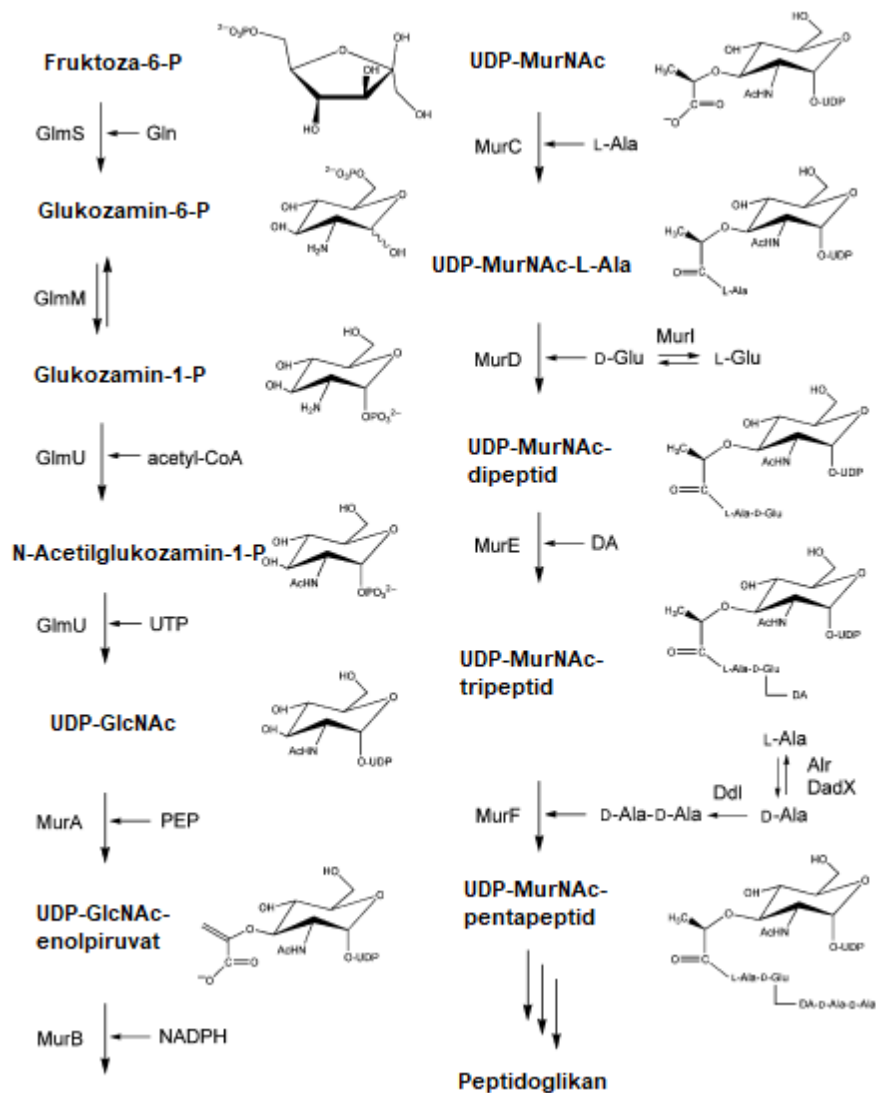
1.3 Biosinteza peptidoglikana

Ena od najpomembnejših komponent celične stene pri skoraj vseh evbakterijah je peptidoglikan oz. murein. Peptidoglikan je kompleksen heteropolimer, sestavljen iz dolgih glikanskih verig, ki so prečno premrežene s kratkoverižnimi peptidi. Celični steni daje trdnost in obliko ter ščiti celico pred visokim citoplazemskim osmotskim tlakom. Glikanske verige so sestavljene iz *N*-acetilglukozamina (GlcNAc) in ostankov *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc), povezanih z 1 - 4 β vezjo. Na vsako D-laktilno skupino ostanka MurNAc je vezan peptidni fragment, ki je najpogosteje sestavljen iz L-Ala- γ -D-Glu-mezo-L-lys-D-Ala-D-Ala. Premreženje glikanskih verig ponavadi poteče med karboksilno skupino D-alanina na mestu 4 in amsko skupino diaminokislina na mestu 3 (2, 10).

Biosinteza peptidoglikana (Slika 1) je zelo kompleksna, saj je v proces vključenih okoli 20 reakcij, ki potekajo v citoplazmi ter v notranji in zunanji strani citoplazemske membrane. Proces lahko razdelimo na štiri tipe reakcij:

1. nastanek UDP-GlcNAc iz fruktoze-6-fosfata,
2. nastanek UDP-MurNAc iz UDP-GlcNAc,
3. sklopitev peptidnega fragmenta, ki vodi do nastanka UDP-MurNAc-pentapeptida in
4. sinteza D-glutaminske kisline in D-alanil-D-alanin dipeptida.

V sintezni poti sodelujejo številni encim, ki so tarče delovanja že obstoječih antibiotičnih učinkovin kot tudi učinkovin v razvoju (2, 10).



Slika 1: Prikaz citoplazemskih stopenj biosinteze peptidoglikana (2).

1.3.1 Biosinteza UDP-GlcNAc

Za nastanek UDP-GlcNAc iz fruktoze-6-fosfata so potrebni encimi glukozamin-6-fosfat sintaza (GlmS), fosfoglukozamin mutaza (GlmM), glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza in *N*-acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferaza.

GlmS je amidotransferaza, ki katalizira pretvorbo D-fruktoze-6-fosfata v D-glukozamin-6-fosfat tako, da uporablja L-glutamin kot vir dušika. GlmS monomer je sestavljen iz dveh strukturno in funkcijsko ločenih domen. N-terminalni del domene spodbuja hidrolizo glutamina v glutamat in amonijak medtem, ko C-terminalni del veže akceptor dušika in uporabi amonijak za pretvorbo fruktoze-6-fosfata v glukozamin-6-fosfat.

Drugi encim pri biosintezi UDP-GlcNAc je GlmM, ki služi kot katalizator za reverzibilno pretvorbo izomerov glukozamina-6-fosfata in glukozamina-1-fosfata. Reakcija poteka po principu »ping-pong« mehanizma, kjer GlcN-1,6-difosfat v katalitskem procesu nastane kot intermediat, ki ima vlogo tako produkta kot tudi substrata.

V zadnjem koraku bifunkcionalen encim GlmU katalizira acetiltransferazo in uridiltransferazo med pretvorbo GlcN-1-fosfata v UDP-GlcNAc (2, 11).

1.3.2 Biosinteza UDP-MurNAc

Naslednji pomemben korak k tvorbi peptidoglikana je nastanek UDP-MurNAc iz UDP-GlcNAc, ki ga omogočata encima MurA in MurB. Prvo stopnjo pretvorbe katalizira MurA tako, da prenese enolpiruvatni del iz fosfoenolpiruvata (PEP) na 3-hidroksilno skupino UDP-GlcNAc-a. Pri tem nastane produkt UDP-GlcNAc-enolpiruvat, ki se reducira s pomočjo encima MurB in privede do nastanka laktalnega etra UDP-MurNAc (2, 11).

1.3.3 Biosinteza UDP-MurNAc peptidov

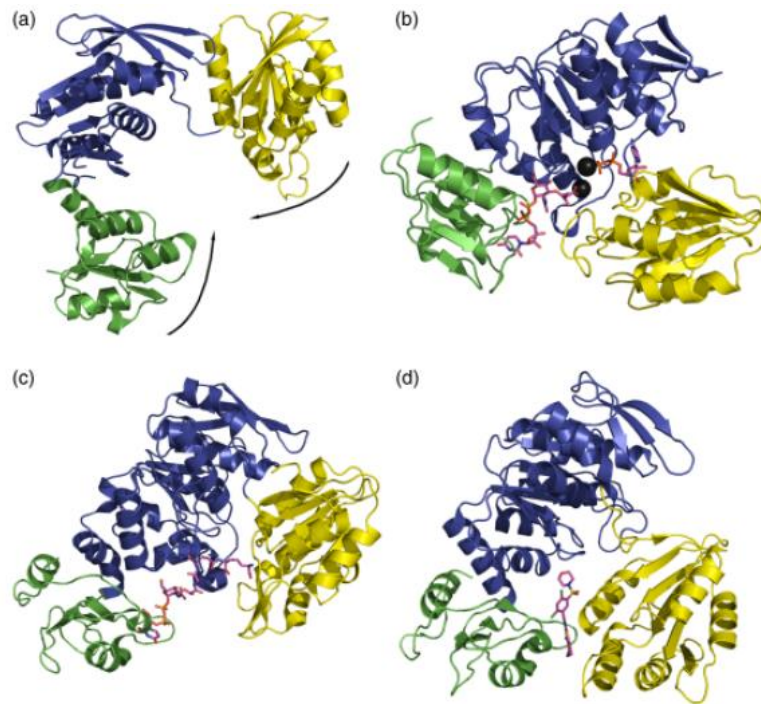
Tvorbo peptidnega stebra peptidoglikana omogočajo štirje encimi (MurC, D, E in F), ki se imenujejo Mur ligaze. Njihova vloga je dodatek L-alanina (MurC), D-glutaminske kisline (MurD), L-lizina ali mDAP (MurE) in dipeptida D-Ala-D-Ala (MurF) na laktoilno skupino UDP-MurNAc (2, 11).

1.3.4 Mur ligaze

Narejenih je bilo veliko različnih raziskav o mehanizmu delovanja Mur ligaz (biokemijski eksperimenti, pregled sekvence aminokislin, določitev strukture z rentgenskimi žarki,...), ki pa so pokazali, da imajo Mur ligaze tri podobne lastnosti:

1. Vse delujejo po enakem mehanizmu tako, da najprej uporabijo ATP za aktivacijo karboksilne skupine UDP prekursorjev in povzročijo, da nastaneta acil fosfat, kot intermediat in ADP. V nadaljevanju amino skupina povzroči nukleofilni napad na acil fosfat, kar privede do nastanka tetraedričnega intermediata z visoko energijo, ki se sčasoma pretvori v amid oz. peptid.
2. Poleg šestih nespremenljivih ostankov vsebujejo tudi mesto kamor se veže ATP.

3. Sestavljene so iz treh domen, ki imajo enako 3D strukturo, kot prikazuje slika 2. N-terminalna domena sodeluje pri vezavi UDP prekursorja, na centralno domeno se veže ATP, na C-terminalno domeno pa aminokislino ali dipeptidi. Centralna in C-terminalna domena sta enaki v vseh Mur ligazah, medtem ko je N-terminalna domena v MurC in MurD drugačna kot pri MurE in MurF, saj se razlikujejo po dolžini substratov UDP prekursorjev (2, 12).

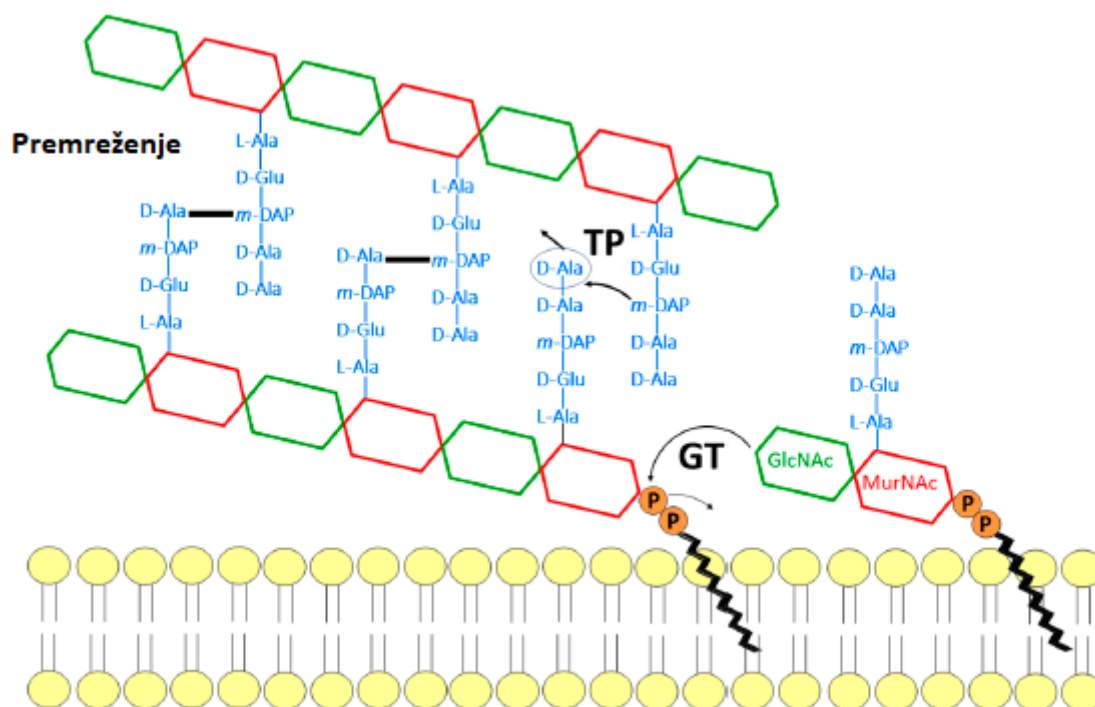


Slika 2: Prikaz 3D struktur Mur ligaz. a) Prosta, odprta oblika liganda MurC, b) Zaprta oblika MurD Escherichie coli, c) Zaprta oblika MurC E. coli, d) Zaprta oblika MurF kompleksa v Streptococcus pneumoniae (2).

1.4 Penicilin vezoči proteini

Penicilin vezoči proteini (PBP) oz. transpeptidaze so bakterijski encimi, ki so prisotni pri biosintezi celične stene. Njihova funkcija je kataliza reakcij transpeptidacije, kjer pride do premreženja peptidnih verig (Slika 3). Skoraj vse bakterije vsebujejo vsaj eno vrsto PBP-jev, njihova količina pa vpliva tudi na celični cikel in morfologijo bakterije. PBP-je uvrščamo v obsežno skupino proteinov, ki jih lahko razdelimo na PBP-je z visoko in nizko molsko maso. Visoko molekularni PBP-ji so prisotni pri končnih fazah sinteze peptidoglikana medtem, ko nizkomolekularni sodelujejo pri vzdrževanju peptidoglikana.

Visokomolekularni PBP-ji so za celico bolj pomembni, saj brez le-teh ne bi preživel, zato so takšni PBP-ji prvotna tarča β -laktamskih antibiotikov (13, 14, 15).



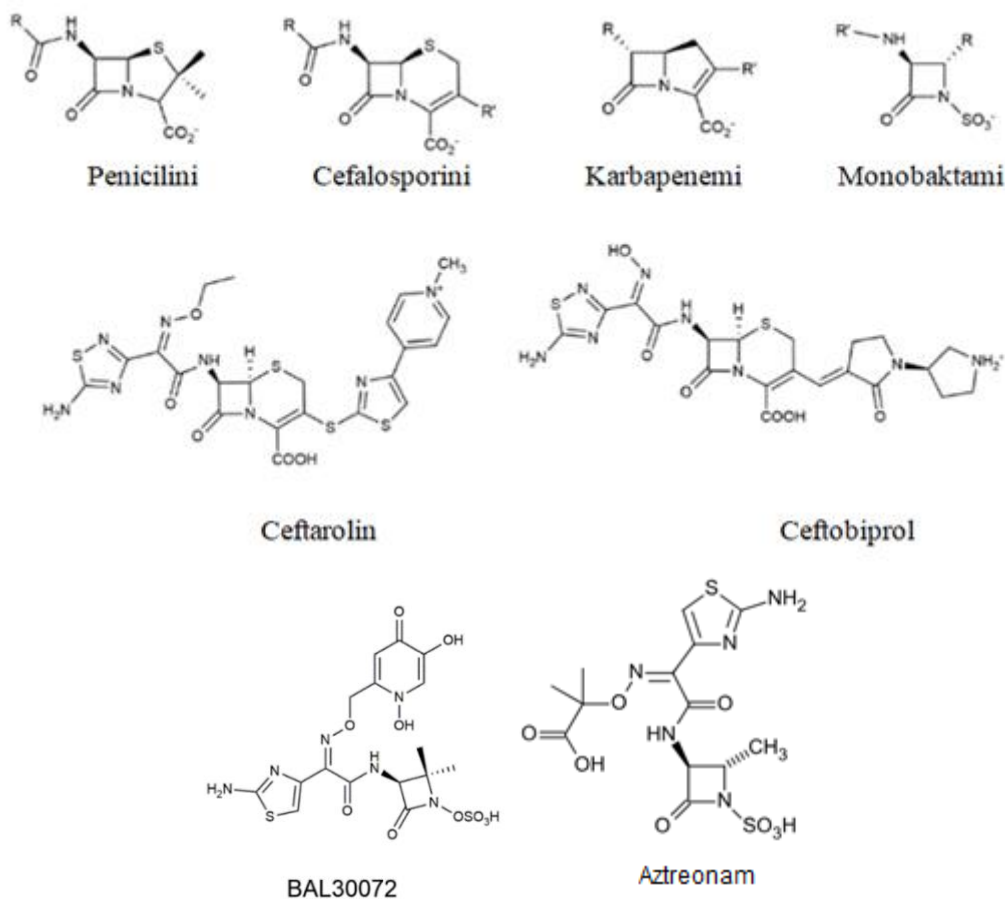
Slika 3: Prikaz reakcij transpeptidaz, ki jih katalizirajo penicilin vezoči proteini (13).

PBP-ji so multidomenski encimi, ki jih glede na njihovo domeno in funkcijo razvrščamo v 3 skupine (A, B in C). V skupini A je transpeptidazna domena povezana z N-terminalnim delom transglikozilazne domene. N-terminalni modul skupine B je sestavljen iz manjših domen in ne izraža katalitske aktivnosti, ampak služi kot »steblo«, ki omogoči interakcijo med C-terminalnim delom transpeptidazne domene in peptidoglikanom. Nekateri PBP-ji iz skupine B lahko vsebujejo tudi dodatne domene, kot je C-terminalna PASTA domena (PBP in serin / treonin kinazna domena). Takšne domene sodelujejo pri vezavi β -laktamov, bakterijski morfogenezi in povečujejo stabilnost proteinov. PBP-ji skupine C imajo samo eno domeno in izražajo DD-karboksiptidazno oz. endopeptidazno aktivnost. Njihova funkcija je regulacija stopnje premreženja peptidoglikana, niso pa bistveni za preživetje bakterije (13, 16).

1.4.1 β -laktamski zaviralci PBP-jev

Najbolj komercialno dostopni zaviralci PBP-jev so penicilini, cefalosporini, monobaktami in karbapenemi (Slika 4). Sestavlja jih štiričlenski β -laktamski obroč, ki izkorišča

strukturno podobnost D-Ala-D-Ala fragmenta naravnega substrata, da privablja PBP-je (13, 15).



Slika 4: Prikaz struktur nekaterih inhibitorjev transpeptidaz (13).

1.4.1.1 Cefalosporini

V zadnjem desetletju je prišlo do razvoja nove generacije cefalosporinov, od katerih sta najbolj pomembna ceftobiprol in ceftarolin. Obe spojini izkazujeta aktivnost proti MRSA. Ceftarolin ima širokospektralno aktivnost proti Gram pozitivnim patogenom z izjemo *P. aureginosa* in enterobakterij, medtem ko Ceftobiprol v širokospektralnem območju deluje na Gram negativne bakterije (*Citrobacter spp.*, *Escherichia coli*, *Enterobacter spp.*, *Pseudomonas aureginosa*,...) in nekatere klinično pomembne Gram pozitivne bakterije, kot so MRSA, PRSP in *Enterococcus faecalis*. Ceftobiprol kaže potencialno baktericidno aktivnost tako, da se veže na PBP in zavira transpeptidacijo ter nastanek celične stene, saj pride do lize celice. Veže se lahko na veliko različnih PBP-jev, ki se nahajajo tako v Gram

negativnih kot tudi v Gram pozitivnih bakterijah. Po vezavi na PBP (PBP2a in PBP2x) hitro oblikuje zaviralni encim-acil kompleks, ki aktivno deluje na β -laktam odporne stafilokoke in streptokoke. Stabilnost encim-acil kompleksa v kombinaciji z dolgo stransko verigo, ki vstopi globoko v vezavni žep PBP-ja, izboljša inhibicijo encima (13, 17).

Hitro so se pojavile aminokislinske mutacije v MRSA, kar je povzročilo bakterijsko odpornost proti ceftarolinu. Mutacija v Glu₂₃₉Lis, ki se nahaja na alosteričnem mestu v domeni, ki ne veže penicilina, povzroči dvig MIK (MIK > 2 mg/L medtem ko imajo MRSA, ki so dovzetne na ceftarolin MIK < 1 mg/L). Iz različnih študij so ugotovili, da pride do zvišanja MIK zaradi mutacij v penicilin vezoči domeni, medtem ko imajo mutacije v domeni, ki ne veže penicilina, le majhen vpliv na porast MIK (13).

1.4.1.2 Karbapenemi

Karbapenemi so po navadi zadnja izbira β -laktamskih antibiotikov. Njihovo širokospektralno delovanje jim omogoča sposobnost vezave na B2-PBP-je in B3-PBP-je, prav tako pa lahko zavirajo LD-transpeptidaze, ki katalizirajo premreženje peptidoglikana na mestu 3,3. Takšno premreženje peptidoglikana prevladuje v *Mycobacterium tuberculosis*, tako da so za njih karbapenemi v kombinaciji z klavulansko kislino baktericidni. Zaradi bakterijske odpornosti pa prihodnost karbapenemov ni obetajoča, saj prihaja do razširjene tvorbe β -laktamaz, ki vsebujejo karbapenemaze (13).

1.4.1.3 Monobaktami

Čeprav je bilo razvitih že mnogo monobaktamov, pa je aztreonam (slika 4) edini monobaktam, ki je odobren s strani FDA. Aztreonam ima visok protibakterijski učinek na Gram negativne bakterije (B3-PBP) ne pa tudi na Gram pozitivne. Razvoj novih monobaktamov zajema vključitev sideroforne skupine, ki izkorišča privzem železa. Na ta način lahko pride do difuzije skozi zunanjo membrano Gram negativnih bakterij, prav tako pa se izogne odpornosti, ki jo povzročijo iztočni sistemi in mutacije slabe permeabilnosti. Takšen monobaktam je monosulfaktam BAL30072 (slika 4), ki ima sideroforno skupino povezano z metoksiiminskim delom 2-amino-4-tiazolil metoksiiminske skupine. Aktiven je proti *P. aeureginosa*, *Acinetobacter baumannii* in *Klebsiella pneumoniae* in ima visoko afiniteto za PBP3, PBP1a in PBP1b.

Med novejšje monobaktame spadajo tudi monokarbami, ki so monociklični β -laktami z karbonilaminosulfonil akitvno skupino. Takšen primer je MC-1, ki je konjugiran sideroforni monokarbam z visoko aktivnostjo proti *P. aureginosa*. Raziskali so tudi SAR konjugiranih siderofornih monokarbamov, ki temeljijo na triazolonu in ugotovili, da bi potencialno lahko bili zaviralci PBP3 z dobrimi farmakokinetičnimi lastnostmi (13).

2 NAMEN DELA

Cilj naše naloge je razviti sintezno pot za pripravo 4-hidroksifenil-glicinskih derivatov monocikličnih β -laktamov, ki bodo oponašali znan β -laktamski antibiotik ceftobiprol.

Izhajali bomo iz optično čistih aminokislin, ki jih bomo s posameznimi sintezni koraki privedli v dipeptid. V nadaljevanju bomo izvedli najpomembnejšo reakcijo v naši magistrski nalogi t.j. Mitsunobujevo reakcijo, s katero bomo sintetizirali β -laktamski obroč, ki je ključen za delovanje tovrstnih antibiotikov. Končne spojine bomo optimizirali tako, da bomo v prvem primeru uporabili 2-pikolilklorid v drugem pa 2-bromometilpiridin in dobljene produkte primerjali med seboj.

Vsak sintezni korak bomo zaključili z čiščenjem produkta s kolonsko kromatografijo, da bi dobili čim višji izkoristek glavnega produkta. Za določitev uspešnosti sinteze si bomo pomagali z različnimi analiznimi tehnikami, kot so TLC, NMR in masna spektroskopija.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Pri delu v laboratoriju smo uporabili reagente in topila različnih proizvajalcev (Sigma, Fluka, Merck, Apollo Scientific) brez posebne predpriprave. Orositveni reagent ninhidrin smo pripravili tako, da smo ninhidrin raztopili v očetni kislini in etanolu.

3.2 Metode

3.2.1 Kromatografske metode

Pri TLC smo uporabili plošče TLC Silica gel 60 F₂₅₄ proizvajalca Merck z 0,20 mm debelim nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu velikosti 20 x 20 cm z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Za detekcijo spojin smo uporabili UV svetlobo ($\lambda = 254$ nm in $\lambda = 366$ nm) in orositveni reagent ninhidrin.

Čiščenje produktov smo opravili s kolonsko kromatografijo, kjer smo kot stacionarno fazo uporabili silikagel 60 z velikostjo por 0,04 – 0,063 mm (Merck) in različne mobilne faze, ki so navedene pri opisih sintez in čiščenja produktov.

3.2.2 Spektroskopske metode

Jedrski magnetna resonanca (NMR): NMR spektri so bili posneti na Bruker Avance III 400 MHz spektrometru. Vzorce smo raztopili v devteriranih topilih (CDCl₃, DMSO-d₆ in MeOD), kot interni standard pa smo uporabili TMS. Kemijske premike (δ) smo podali v ppm glede na interni standard. Spektri so bili obdelani s programoma NMRnotebook 2.70 (NMRTEC S.A.S.).

Masna spektroskopija: Masni spektri so bili posneti na masnem spektrometru VG-Analytical AutoSpec Q proizvajalca Micromass z ESI tehniko.

3.2.3 Določanje temperatur tališč

Temperature tališča spojin smo določili s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica.

3.2.4 Ekstrakcije

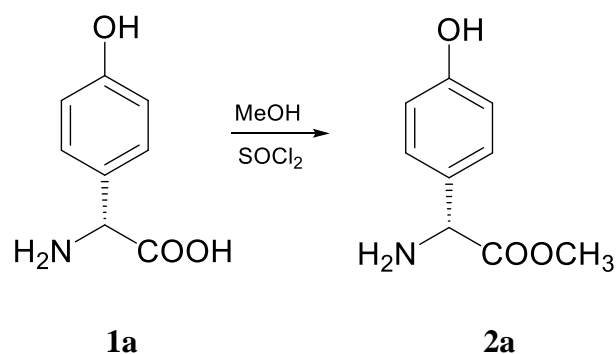
Za ekstrakcije reakcijskih zmesi smo uporabili prečiščeno vodo, nasičene vodne raztopine NaCl, NaHCO₃ in 10 % vodno raztopino citronske kisline ter EtOAc.

3.2.5 Poimenovanje in risanje spojin

Za poimenovanje in risanje struktur smo uporabili računalniški program ChemDraw Professional 16.0 proizvajalca PerkinElmer.

4 EKSPIRIMENTALNO DELO IN REZULTATI ANALIZ

4.1 Sinteza metil (R)-2-amino-2-(4-hidroksifenil)acetata (2a)

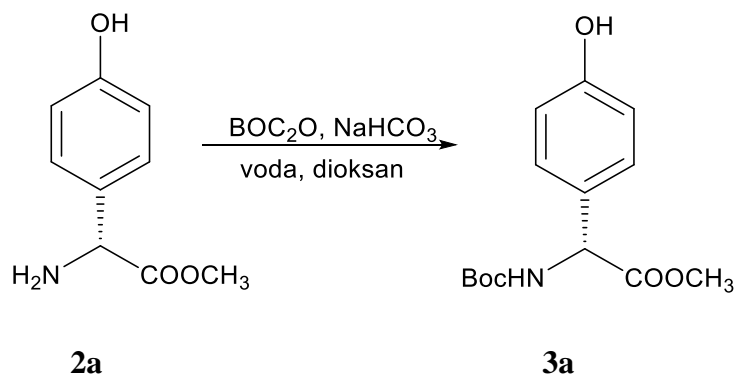


Slika 5: Sinteza metil (R)-2-amino-2-(4-hidroksifenil)acetata

Raztopini D-4-hidroksifenil glicina (40,0 g, 240,0 mmol) v 200 mL MeOH smo ob hlajenju postopoma dodajali SOCl_2 (34,8 mL, 480,0 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 10 ur pri sobni temperaturi. MeOH smo uparili pod znižanim tlakom in ostanek večkrat sprali z etrom (3 x 200 mL) in uparili topilo (18).

Izgled	bel prašek
M	181,07 g/mol
T_{tal}	166 – 168 °C
TLC	R _f (DKM/MeOH = 9/1 + NH ₃) = 0,29
Izkoristek reakcije	99 %
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆)	δ 3,67 (s, 3H), 5,05 (s, 1H), 6,83 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 7,27 (d, J = 8,4 Hz, 2H), 9,05 (bs, 3H), 9,99 (s, 1H) ppm.

4.2 Sinteza metil (R)-2-((terc-butoksikarbonil)amino)-2-(4-hidroksifenil)acetata (3a)

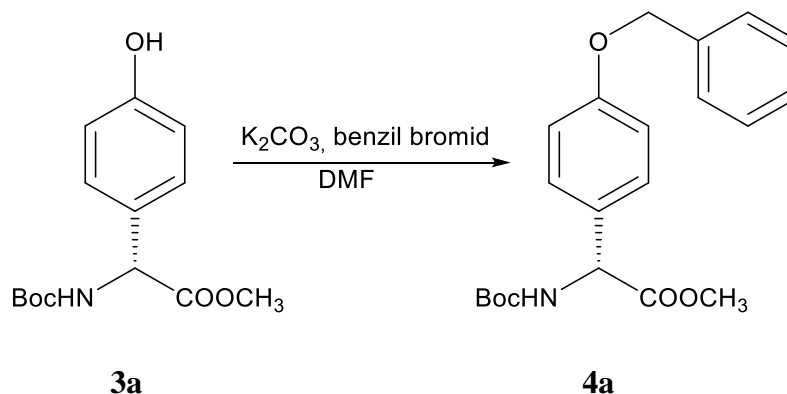


Slika 6: Sinteza metil (R)-2-((terc-butoksikarbonil)amino)-2-(4-hidroksifenil)acetata

Spojini **2a** (43,46 g, 240,0 mmol) smo dodali vodno raztopino NaHCO₃ (30,24 g, 360,0 mmol, 150 mL) in Boc anhidrid (62,85 g, 288,0 mmol), raztopljen v dioksanu (100 mL). Reakcijsko zmes smo mešali 1 uro pri 0°C in 6 ur pri sobni temperaturi. Zmesi smo nato počasi dodajali koncentrirano HCl do pH 2. Zmes smo ekstrahirali z EtOAc (3 x 100 mL). Združene organske faze smo sprali z 200 mL prečiščene vode in 200 mL nasičene vodne raztopine NaCl, posušili z Na₂SO₄ in topilo odstranili pod nižanim tlakom (19).

Izgled	bel prašek
M	281,31 g/mol
T_{tal}	138 - 140 °C
TLC	R _f (DKM/MeOH = 9/1) = 0,61
Izkoristek reakcije	97 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1,42 (s, 9H), 3,69 (s, 3H), 5,19 (s, 1H), 5,49 (s, 1H), 6,79 (d, J = 8,5 Hz, 2H), 7,24 (d, J = 8,54 Hz, 2H) ppm.	

4.3 Sinteza metil (R)-2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((terc-butoksikarbonil) amino) acetata (4a)

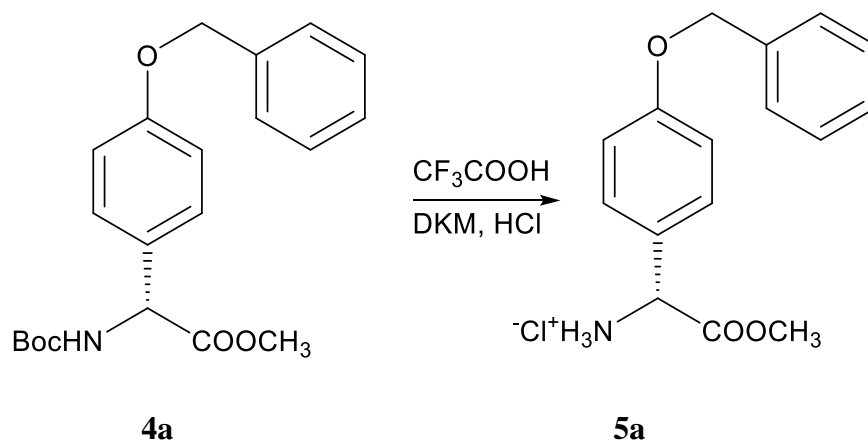


Slika 7: Sinteza metil (R)-2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((terc-butoksikarbonil) amino) acetata

Spojino **3a** (67,51 g, 240,0 mmol) smo raztopili v 300 mL DMF in dodali K_2CO_3 (70,0 g, 504,0 mmol) ter benzil bromid (42,0 mL, 360,0 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali v inertni atmosferi argona 17 ur pri 50 °C. DMF smo odparili, ostanku dodali vodo (500 mL) in ekstrahirali z EtOAc (3 x 600 mL). Združene organske faze smo sprali z prečiščeno vodo (3 x 600 mL) in 600 mL nasičene vodne raztopine NaCl, posušili z Na_2SO_4 in topilo odstranili pod znižanim tlakom (20).

Izgled	rumeno olje
M	371,41 g/mol
TLC	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,64
Izkoristek reakcije	98 %
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 1,43 (s, 9H), 3,71 (s, 3H), 5,05 (s, 2H), 5,25 (d, <i>J</i> = 7,1 Hz, 1H), 6,95 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 7,27 (d, <i>J</i> = 8,7 Hz, 2H), 7,33–7,43 (m, 6H) ppm.	

4.4 Sinteza (R)-1-(4-(benziloksi)fenil)-2-metoksi-2-oksoetan-1-amonijevega klorida (5a)

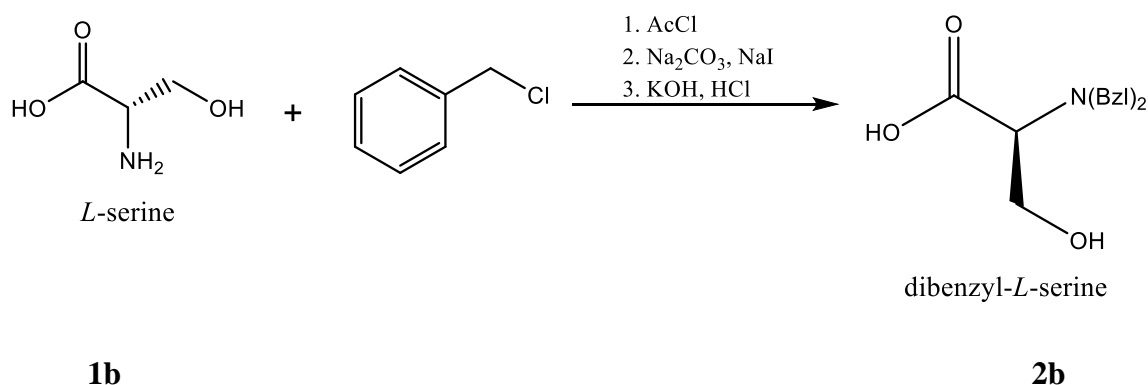


Slika 8: Sinteza (R)-1-(4-(benziloksi)fenil)-2-metoksi-2-oksoetan-1-amonijevega klorida

Spojino **4a** (89,14 g, 240,0 mmol) smo raztopili v 200 mL DKM in dodali CF_3COOH (277 mL, 3,60 mol). Reakcijsko zmes smo mešali 1 uro pri 0 °C in topilo odstranili pod znižanim tlakom. Ostanke smo dodali 20 mL koncentrirane HCl ter nastalo oborino odnučali. Produkt smo posušili v sušilniku (21).

Izgled	bel prašek
M	307,77 g/mol
T_{tal}	120 – 122°C
TLC	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,07
Izkoristek reakcije	93 %
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3,38 (s, 3H), 3,70 (s, 3H), 5,14 (s, 2H), 5,20 (s, 1H), 7,08 (d, <i>J</i> = 8,8 Hz, 2H), 7.27–7,45 (m, 7H) ppm.	

4.5 Sinteza (R)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanojske kisline (2b)

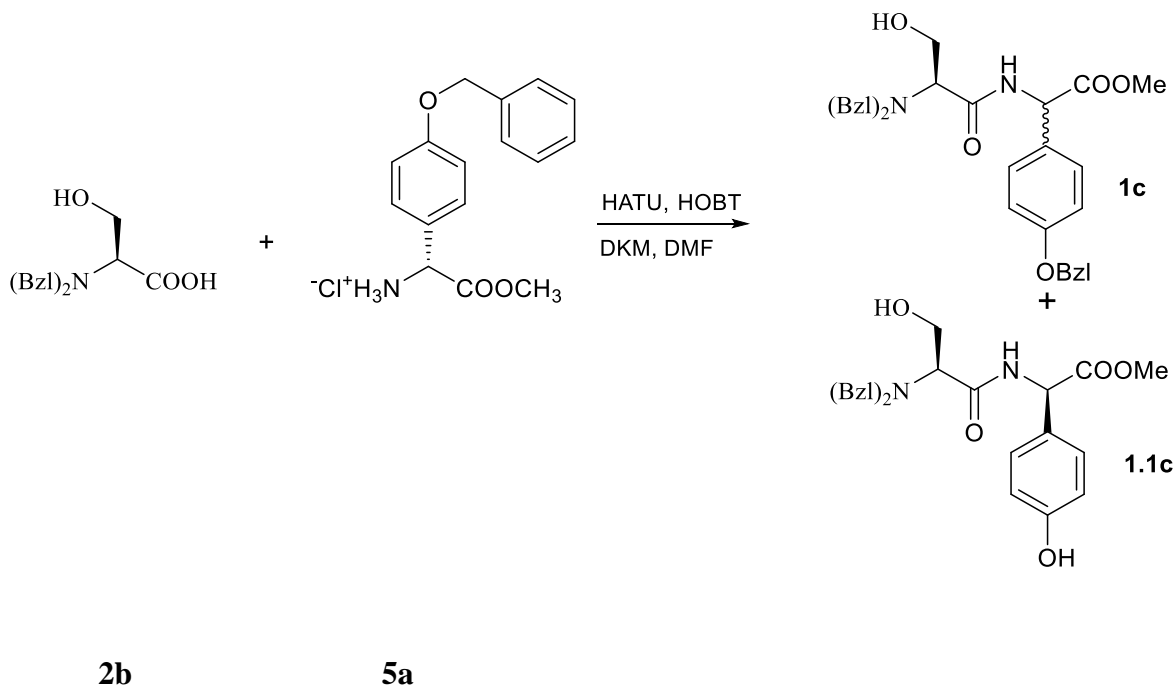


Slika 9: Sinteza (R)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanojske kisline

Raztopini L-serina (**1b**) (10,0 g, 0,09 mmol) v 65 mL MeOH smo ob hlajenju počasi dodajali acetil klorid (10,0 mL, 140,0 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 24 ur pod refluxom. Reakcijsko zmes smo ohladili na 0 °C ter dodali natrijev bikarbonat (30,0 g, 357,11 mmol), natrijev jodid (3,74 g, 24,95 mmol) in benzil klorid (23,59 mL, 205,0 mmol). Zmes smo mešali 12 ur pod refluxom in jo prefiltrirali skozi Celite filter, ter jo sprali z MeOH. Filtrat smo počasi dodajali vodni raztopini KOH (22,4 g, 399,24 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 20 ur pri 0 °C. Zmesi smo dodali 50 mL vode in jo nakisali z 30 % raztopino HCl do pH 3. Oborino smo prefiltrirali skozi nučo in jo sušili pri 50 °C 24 ur (21).

Izgled	bel prašek
M	285,34 g/mol
T_{tal}	299 – 300 °C
TLC	R _f (DKM/MeOH = 9/1) = 0
Izkoristek reakcije	72%
¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 3,28 (t, <i>J</i> = 6,2 Hz, 1H), 3,63–3,68 (m, 3H), 3,78–3,85 (m, 3H), 4,73 (bs, 1H), 7,21–7,25 (m, 2H), 7,29–7,33 (m, 4H), 7,36–7,38 (m, 4H), 12,49 (bs, 1H) ppm.	

4.6 Sinteza metil (R)-2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((S)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) acetata (**1c**)



Slika 10: Sinteza metil (R)-2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((S)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) acetata

Mešanici spojini **2b** (10,0 g, 35,0 mmol) in **5a** (12,96 g, 42,0 mmol) smo dodali 300 mL DKM in 30 mL DMF ob mešanju pri 0°C. Zmesi smo dodali NMM (7,70 mL, 70,0 mmol), HOBt (5,20 g, 38,5 mmol) in HATU (14,63 g, 38,5 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 10 ur pri sobni temperaturi. Zmes smo sprali s prečiščeno vodo (2 x 200 mL), z 10 % vodno raztopino citronske kisline (2 x 200 mL) in 200 mL nasičene vodne raztopine NaCl, organsko fazo posušili z Na₂SO₄ in topilo odstranili pod znižanim tlakom. Produkt (**1c**) smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF= EtOAc/Hex = 2/1). Kot stranski produkt smo izolirali še spojino **1.1c**.

Izgled	oranžno olje
M	538,64 g/mol
TLC	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,31
Izkoristek reakcije	55 %

1c: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3,25–3,31 (m, 1H), 3,34 (dd, *J*₁ = 7,5 Hz, *J*₂ = 3,7 Hz, 0,5H), 3,40 (dd, *J*₁ = 7,5 Hz, *J*₂ = 4,0 Hz, 0,5H), 3,53 (d, *J* = 4,5 Hz, 1H), 3,57 (d, *J* = 4,1 Hz, 1H), 3,73 (s, 1,5H), 3,75 (s, 1,5H), 3,84 (d, *J* = 13,6 Hz, 1H), 3,93–4,03 (m, 2H), 4,04–4,08 (m, 0,5H), 4,14–4,17 (m, 0,5H), 5,02 (s, 1H), 5,05 (s, 1H), 5,42 (d, *J* = 2,2 Hz, 0,5H), 5,44 (d, *J* = 2,2 Hz, 0,5H), 6,89 (dd, *J*₁ = 13,2 Hz, *J*₂ = 8,7 Hz, 2H), 7,13 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,20 (d, *J* = 8,7 Hz, 1H), 7,27–7,42 (m, 15H), 8,37 (d, *J* = 7,4 Hz, 0,5H), 8,46 (d, *J* = 7,1 Hz, 0,5H) ppm.

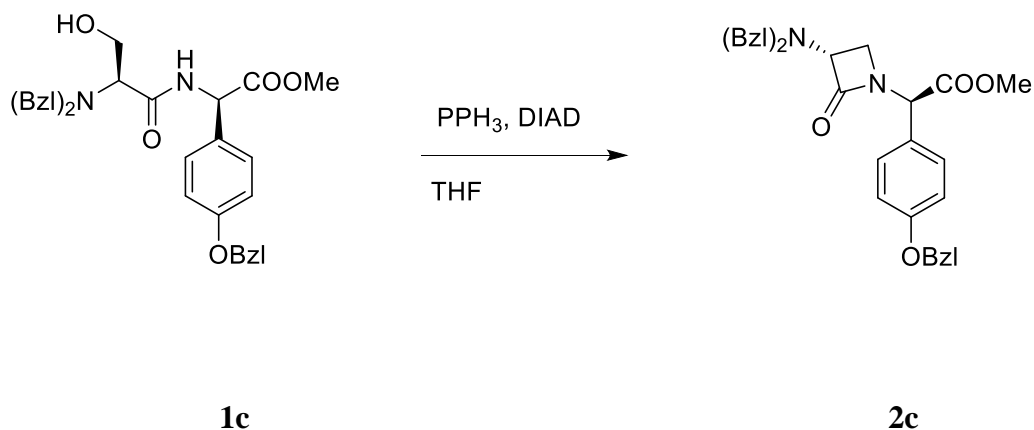
¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ 52,88; 54,82; 55,66; 57,83; 62,09; 70,10; 115,27; 127,53; 127,59; 128,15; 128,30; 128,42; 128,56; 128,79; 128,90; 136,73; 138,52; 158,99; 171,21; 173,62 ppm.

ESI-MS: izračunano za C₃₃H₃₄N₂O₅ [M+(H)]⁺ 538,25; izmerjena vrednost [M+(Na)]⁺ 561,07; [M-(H)]⁻ 537,16.

1.1c: ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3,35–3,43 (m, 1H), 3,57 (dd, *J*₁ = 13,6 Hz, *J*₂ = 5,8 Hz, 2H), 3,74 (s, 1,5H), 3,76 (s, 1,5H), 3,86 (d, *J* = 13,7 Hz, 1H), 3,97–4,04 (m, 2H), 4,07–4,19 (m, 1H), 5,08 (s, 1H), 5,41 (dd, *J*₁ = 7,3 Hz, *J*₂ = 4,4 Hz, 1H), 6,78 (dd, *J*₁ = 11,8 Hz, *J*₂ = 8,5 Hz, 2H), 7,06 (d, *J* = 8,6 Hz, 1H), 7,14 (d, *J* = 8,5 Hz, 1H), 7,30–7,46 (m, 10H), 8,37 (d, *J* = 7,3 Hz, 0,5H), 8,47 (d, *J* = 7,1 Hz, 0,5H) ppm.

ESI-MS: izračunano za C₂₆H₂₈N₂O₅ [M+(H)]⁺ 448,20; izmerjena vrednost [M+(Na)]⁺ 471,04; [M-(H)]⁻ 447,13.

4.7 Sinteza metil (R)-2-(4-benziloksi)fenil-2-((S)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)acetata (**2c**)

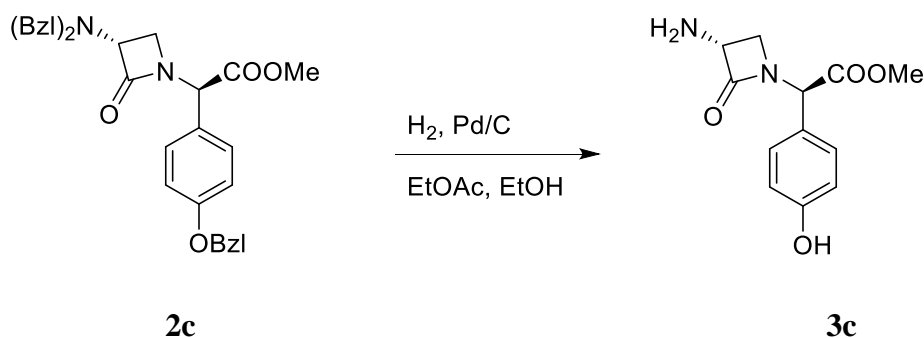


Slika 11: Sinteza metil (R)-2-(4-benziloksi)fenil-2-((S)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)acetata

Raztopini PPh₃ (9,12 g, 34,77 mmol) v 10 mL THF smo dodali DIAD (7,0 mL, 34,77 mmol) v argonovi atmosferi. Reakcijsko zmes smo mešali pri 0 °C in počasi dodajali spojino **1c** (12,49 g, 23,18 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 10 ur pri sobni temperaturi in odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt (**2c**) smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/Hex = 1/2).

Izgled	rumen gel
M	520,63 g/mol
TLC	R _f (EtOAc/Hex = 1/2) = 0,26
Izkoristek reakcije	32 %
¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 2,92 (t, <i>J</i> = 5,4 Hz, 0,6H), 3,02 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 0,4H), 3,46 (t, <i>J</i> = 5,2 Hz, 0,4H), 3,51 (d, <i>J</i> = 13,5 Hz, 2H), 3,55 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,7 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,3 Hz, 0,6H), 3,63–3,69 (m, 2H), 3,71–3,72 (m, 3H), 3,77–3,80 (m, 2H), 4,19 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,1 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 0,6H), 4,31 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,0 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 0,4H), 5,53 (s, 0,6H), 5,54 (s, 0,4H), 6,99–7,02 (m, 2H), 7,17–7,43 (m, 17H) ppm .	
¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ 43,85; 44,19; 53,17; 55,49; 55,66; 58,38; 58,53; 61,57; 69,15; 69,23; 71,05; 116,51; 116,53; 126,56; 127,03; 128,42; 128,44; 128,62; 129,01; 129,44; 129,59; 130,15; 130,18; 130,79; 138,43; 139,44; 139,65; 160,63; 171,13; 171,49 ppm.	
ESI-MS: izračunano za C ₃₃ H ₃₂ N ₂ O ₄ [M+(Na)] ⁺ (m/z) 543,23, izmerjeno 542,70.	

4.8 Sinteza metil (R)-2-((S)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)acetata (3c)

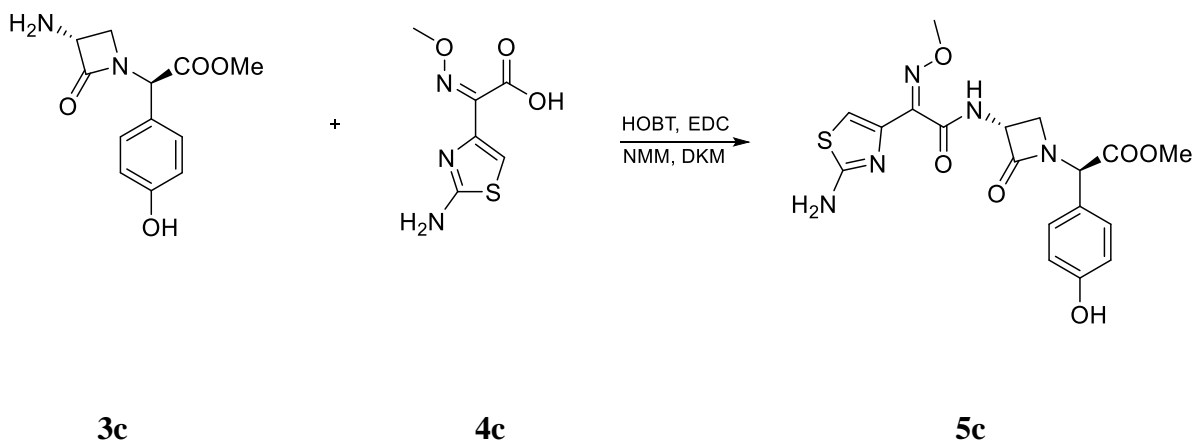


Slika 12: Sinteza metil (R)-2-((S)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)acetata

Raztopini spojine **2c** (3,85 g, 7,40 mmol) v 100 mL EtOAc in 50 mL EtOH smo dodali Pd na ogljiku (0,533 g, 5,01 mmol) v argonovi atmosferi. Zmes smo prepihali z vodikom in mešali 10 ur pri sobni temperaturi pri nadtlaku vodika. Paladij smo odfiltrirali s presesavanjem ter odstranili topilo pod znižanim tlakom. Produkt (**3c**) smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = (DKM/MeOH = 9/1)).

Izgled	rumen gel
M	250,25 g/mol
TLC	R _f (DKM/MeOH= 9/1) = 0,29
Izkoristek reakcije	78 %
¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 2,85–2,88 (m, 0,5H), 3,37–3,39 (m, 1H), 3,75 (s, 3H), 3,82 (t, <i>J</i> = 5,3 Hz, 0,5H), 4,06 (dd, <i>J</i> ₁ = 4,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,5 Hz, 0,5H), 4,18 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 0,5H), 5,48 (s, 1H), 6,81–6,84 (m, 2H), 7,13–7,17 (m, 2H) ppm.	
¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ 50,33; 53,11; 58,50; 59,60; 116,84; 125,23; 130,64; 130,84; 159,33; 171,73; 172,02 ppm.	
ESI-HRMS: izračunano za C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₄ [M+(H)] ⁺ (m/z) 251,1032, izmerjeno 251,1038.	

4.9 Sinteza metil (R)-2-((R)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)acetata (5c)

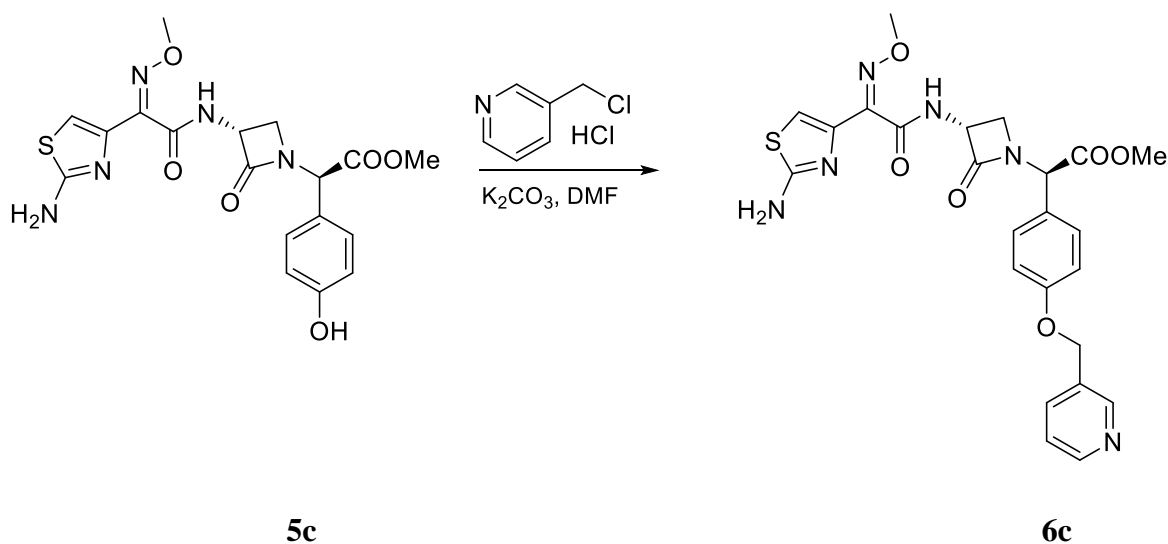


Slika 13: Sinteza metil (R)-2-((R)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)acetata

Raztopini spojine **3c** (1,112 g, 4,40 mmol) v 50 mL DKM in 20 mL DMF smo dodali spojino **4c** (0,97 g, 4,84 mmol) in NMM (0,97 mL, 8,80 mmol). Ko se je zmes raztopila smo dodali še HOBT (0,65 g, 4,84 mmol) in EDC (0,93 g, 4,84 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 10 ur pri sobni temperaturi. Topilo smo odstranili pod znižanim tlakom. Zmesi smo dodali 100 mL EtOAc in ekstrahirali s prečiščeno vodo (2 x 100 mL), 10 % vodno raztopino citronske kisline (2 x 100 mL), 200 mL nasičene vodne raztopine NaHCO₃ in 100 mL nasičene vodne raztopine NaCl. Organsko fazo smo posušili z Na₂SO₄ in topilo odstranili pod znižanim tlakom. Produkt (**5c**) smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM/MeOH = 9/1).

Izgled	rumen prašek
M	433,44 g/mol
T_{tal}	118 – 120 °C
TLC	R _f (DKM/MeOH = 9/1) = 0,33
Izkoristek reakcije	26 %
¹H NMR (400 MHz, MeOD) δ 3,24 (dd, $J_1 = 5,5$ Hz, $J_2 = 2,6$ Hz, 1H), 3,55 (t, $J = 5,6$ Hz, 1H), 3,70 (dd, $J_1 = 5,60$ Hz, $J_2 = 2,5$ Hz, 1H), 3,76 (s, 3H), 3,97 (s, 3H), 5,04-5,07 (m, 1H), 5,53 (s, 1H), 6,83 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H), 6,86 (s, 1H), 7,18 (d, $J = 8,6$ Hz, 2H) ppm.	
¹³C-NMR (100 MHz, MeOD) δ 47,64; 48,05; 53,12; 53,15; 56,11; 56,22; 58,81; 58,85; 63,12; 111,85; 116,87; 124,84; 125,15; 130,61; 130,81; 143,46; 149,57; 149,71; 159,33, 159,37; 156,32; 168,01; 117,31; 171,48; 171,58 ppm.	
ESI-MS: izračunano za C ₁₈ H ₁₉ N ₅ O ₆ S [M+(H)] ⁺ 433,11; izmerjena vrednost [M+(Na)] ⁺ 455,87; [M+(H)] ⁺ 431,82.	

4.10 Sinteza metil (R)-2-((R)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-(piridin-3-ilmetoksi)fenil)acetata (6c)

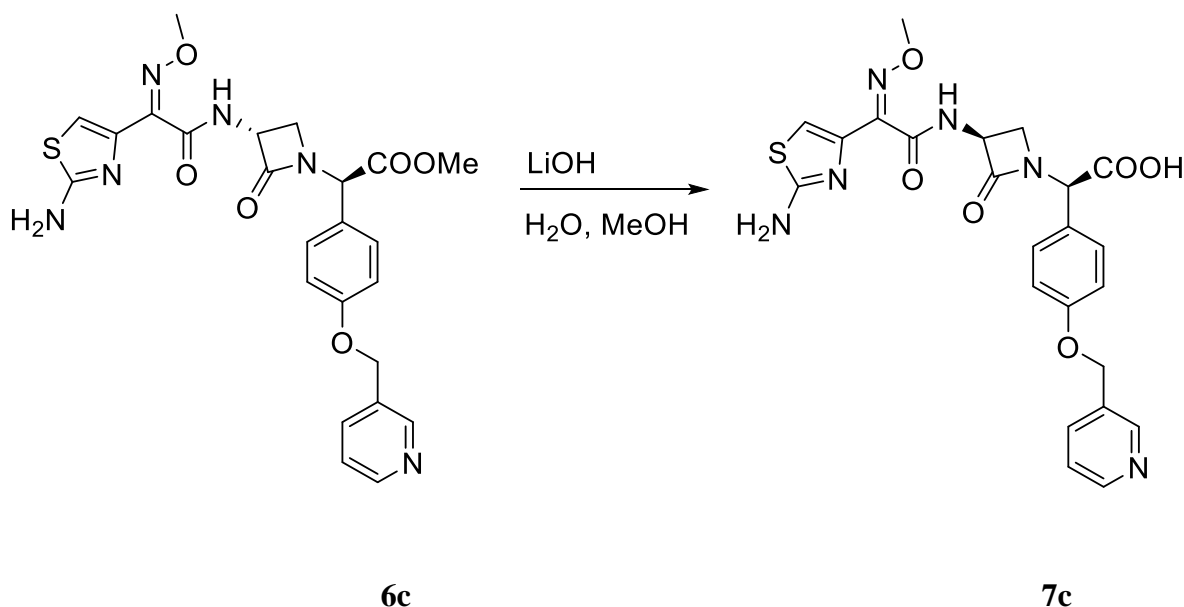


Slika 14: Sinteza metil (R)-2-((R)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-(piridin-3-ilmetoksi)fenil)acetata

Raztopini spojine **5c** (0,500 g, 1,15 mmol) v 5 mL DMF smo dodali K_2CO_3 (0,190 g, 2,76 mmol) in 3-piridinil klorid (0,227 g, 1,38 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 10 ur pri $60^\circ C$. Topilo smo odstranili pod znižanim tlakom in produkt (**6c**) očistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM/MeOH = 9/1).

Izgled:	oranžen gel
M	538,58 g/mol
TLC	R _f (DKM/MeOH = 9/1) = 0,32
Izkoristek reakcije	21 %
ESI-MS: izračunano za $C_{224}H_{24}N_6O_6S$ $[M+(H)]^+$ 524,15; izmerjena vrednost $[M+(Na)]^+$ 547,44	

4.11 Poizkus sinteze metil (R)-2-((R)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-(piridin-3-ilmetoksi)fenil)ocetne kisline (7c)

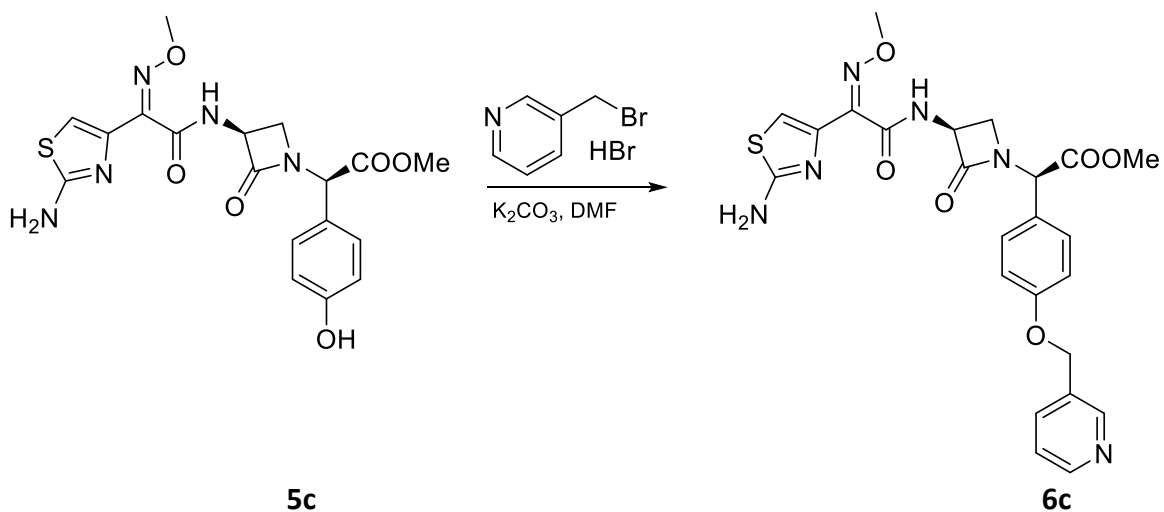


Slika 15: Poizkus sinteze metil (R)-2-((R)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-(piridin-3-ilmetoksi)fenil)ocetne kisline

Spojini **6c** (0,133 g, 0,25 mmol) smo dodali 1 M LiOH (12,35 mL, 1,23 mmol) in 12,35 mL MeOH. Reakcijsko zmes smo mešali 10 ur pri sobni temperaturi. Zmes smo nakisali z 1 M HCl do pH 5 in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Zmes smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc/MeOH/H₂O = 4/2/1), vendar nam identitete produkta ni uspelo potrditi z NMR.

Izgled	rumen gel
M	524,58 g/mol
TLC	R _f (DKM/MeOH = 9/1) = 0,19

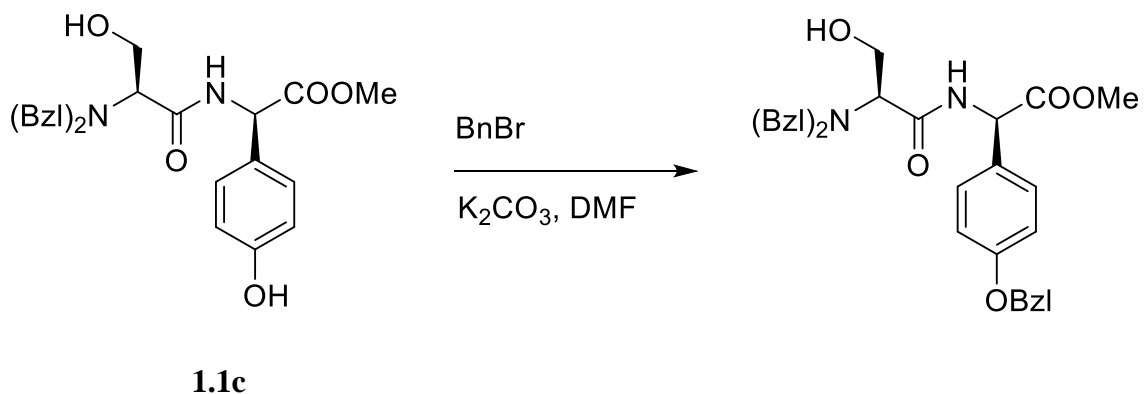
4.12 Poizkus sinteze metil (R)-2-((S)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-(piridin-3-ilmetoksi)fenil)acetata (6c)



Slika 16: Poizkus sinteze metil (R)-2-((S)-3-((Z)-2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-(piridin-3-ilmetoksi)fenil)acetata

Raztopini spojine **5c** (0,151 g, 0,33 mmol) v 6 mL DMF smo dodali K_2CO_3 (0,090 g, 0,65 mmol) in 3-piridinil bromid (0,107 g, 0,42 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 10 ur pri $60^\circ C$. Topilo smo odstranili pod znižanim tlakom in zmes očistili s kolonsko kromatografijo (MF = DKM/MeOH = 9/1), ampak nam produkta ni uspelo izolirati.

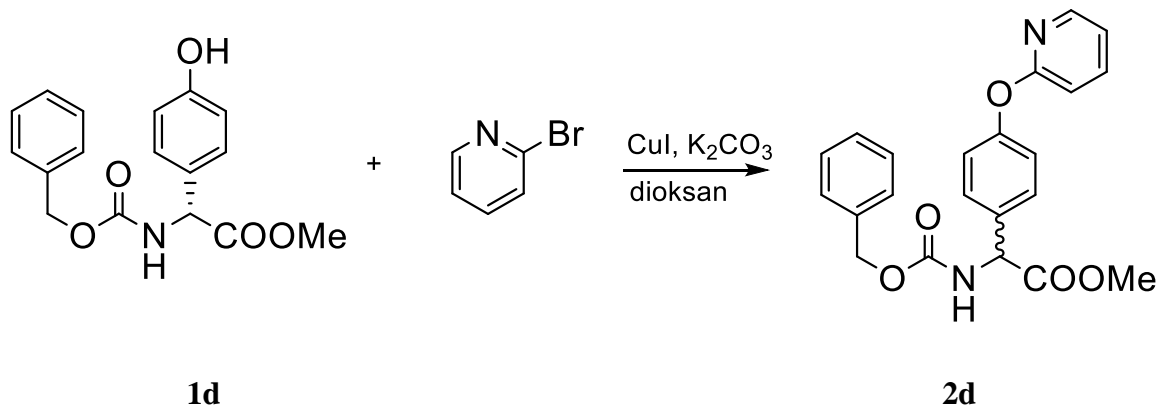
4.13 Poizkus sinteze metil (R)-2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((S)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) acetata



Slika 17: Poizkus sinteze metil (R)-2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((S)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) acetata

Raztopini spojine **1.1c** (3,78 g, 8,43 mmol) v 20 mL DMF smo dodali K_2CO_3 (2,33 g, 16,86 mmol) in benzil bromid (1,50 mL, 12,60 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali čez noč pri 60°C. Topilo smo odstranili pod znižanim tlakom in zmes očistili s kolonsko kromatografijo (MF= EtOAc/hex= 1/1). Produkta nismo uspeli izolirati.

4.14 Sinteza metil 2-(((benziloksi)D-karbonil)amino)-2-(4-(piridin-2-iloksi)fenil)acetata (2d)



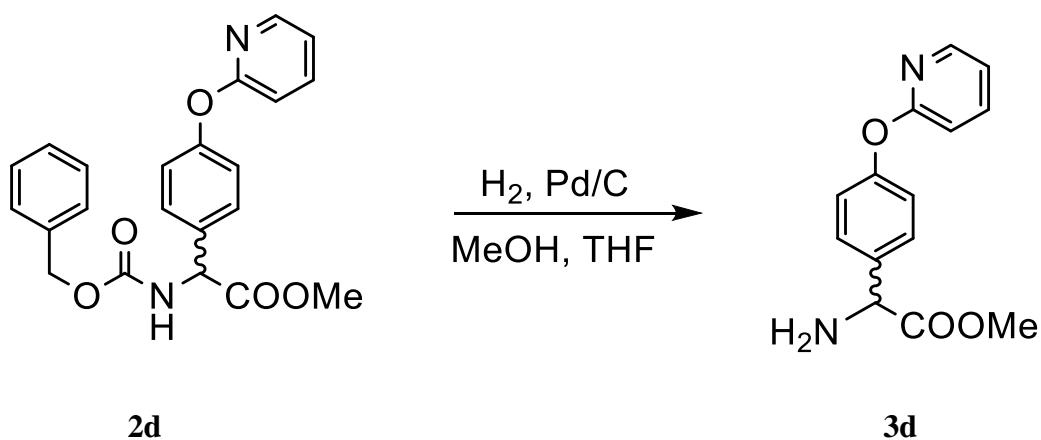
Slika 18: Sinteza metil 2-(((benziloksi)D-karbonil)amino)-2-(4-(piridin-2-iloksi)fenil)acetata

Raztopini spojine **1d** (3,0 g, 9,51 mmol) v 40 mL dioksana smo dodali K_2CO_3 (2,63 g, 19,03 mmol), dimetilglicin (0,294 g, 2,85 mmol), CuI (0,18 g, 0,95 mmol) in 2-bromopiridin (1,18 mL, 12,36 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 10 ur pri 110°C. Topilo smo odstranili pod znižanim tlakom, ostanek raztopili v EtOAc in ekstrahirali s prečiščeno vodo (2 x 200 mL) in 200 mL nasičene vodne raztopine NaCl, organsko fazo posušili z Na_2SO_4 ter odstranili topilo pod znižanim tlakom.

Izgled	rumen gel
M	392,42 g/mol
TLC	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,63
Izkoristek reakcije	78 %

1H NMR (400 MHz, $CDCl_3$) δ 3,74 (s, 3H), 5,06–5,14 (m, 2H), 5,39 (d, $J = 7,4$ Hz, 1H), 5,85 (d, $J = 7,6$ Hz, 1H), 6,93 (d, $J = 8,1$ Hz, 1H), 7,01 (dd, $J_1 = 7,3$ Hz, $J_2 = 5,0$ Hz, 1H), 7,12 (d, $J = 8,5$ Hz, 2H), 7,29–7,40 (m, 7H), 7,70 (ddd, $J_1 = 8,4$ Hz, $J_2 = 7,2$ Hz, $J_3 = 2,0$ Hz, 1H), 8,19 (dd, $J_1 = 4,9$ Hz, $J_2 = 2,1$ Hz, 1H) ppm.

4.15 Sinteza metil 2-amino-2-(4-(piridin-2-iloksi)fenil)acetata

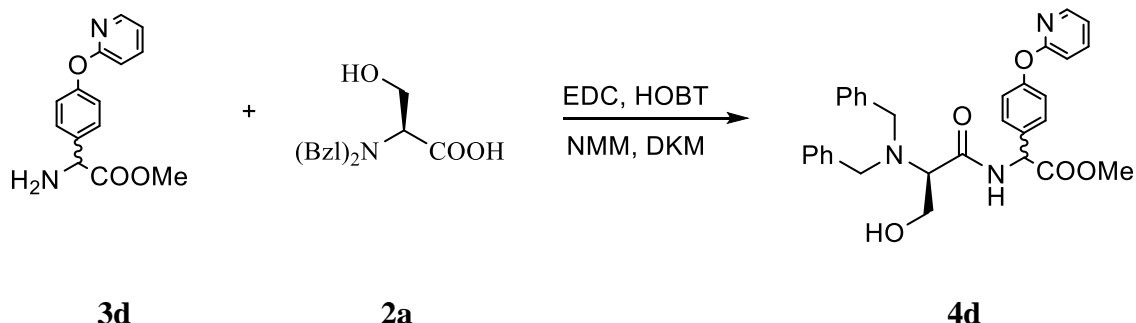


Slika 19: Sinteza metil 2-amino-2-(4-(piridin-2-iloksi)fenil)acetata

Raztopini spojine **2d** (2,9 g, 7,39 mmol) v 50 mL MeOH in 50 mL THF smo dodali Pd/C (0,347 g, 3,26 mmol) v argonovi atmosferi. Zmes smo prepihali z vodikom in mešali 10 ur pri sobni temperaturi pri nadtlaku vodika. Paladij smo odfiltrirali s presesavanjem in odstranili topilo pod znižanim tlakom. Surov produkt smo uporabili v naslednji stopnji brez čiščenja.

Izgled	rumen gel
M	258,10 g/mol
TLC	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,12
Izkoristek reakcije	72 %

4.16 Sinteza metil 2-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)-2-(4-piridin-2-iloksi)fenil)acetata



Slika 20: Sinteza metil 2-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)-2-(4-piridin-2-iloksi)fenil)acetata

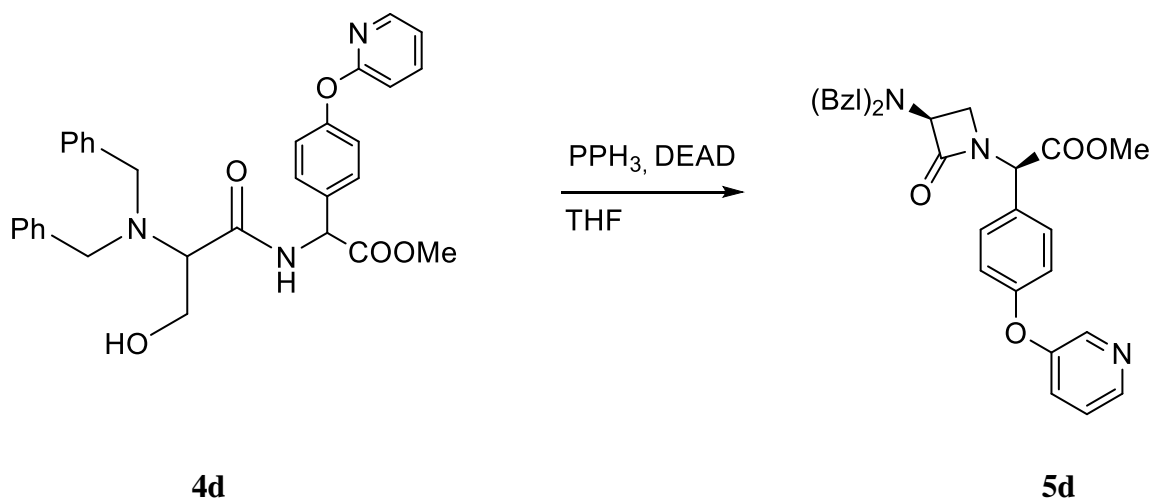
Raztopini spojine **3d** (3,0 g, 9,51 mmol) v 30 mL DKM in 20 mL DMF smo dodali spojino **2a** (1,34 g, 4,69 mmol) in NMM (2,09 mL, 19,03 mmol). Ko se je zmes raztopila smo dodali HOBT (1,41 g, 10,47 mmol) in EDC (2,01 g, 10,47 mmol). Reakcijsko zmes smo mešali 10 ur pri sobni temperaturi. Topilo smo odstranili pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo.

Izgled	rumen gel
M	525,61 g/mol
TLC	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,26
Izkoristek reakcije	24 %

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 3,35 (dq, *J*₁ = 7,4 Hz, *J*₂ = 4,2 Hz, 0,5H), 3,42 (dq, *J*₁ = 7,5 Hz, *J*₂ = 4,4 Hz, 0,5H), 3,54 (d, *J* = 4,2 Hz, 1H), 3,58 (d, *J* = 4,0 Hz, 1H), 3,73 (s, 1,5H), 3,74 (s, 1,5H), 3,86 (d, *J* = 14,1 Hz, 1H), 3,97–4,02(m, 2H), 4,07 (dd, *J*₁ = 11,3 Hz, *J*₂ = 7,5 Hz, 0,5H), 4,15 07 (dd, *J*₁ = 11,3 Hz, *J*₂ = 7,5 Hz, 0,5H), 5,49 (dd, *J*₁ = 7,3 Hz, *J*₂ = 5,5 Hz, 1H), 7,20–7,41 (m, 18H, Ar-H), 8,45 (d, *J* = 7,9 Hz, 0,5H), 8,52 (d, *J* = 7,1 Hz, 0,5H) ppm.

¹³C-NMR (100 MHz, CDCl₃) δ 52,94; 54,82; 56,19; 56,36; 57,70; 57,81; 61,93; 62,12; 126,99; 127,14; 127,61; 128,58; 128,65; 128,72; 128,79; 128,93; 129,01; 129,13; 136,13; 136,64; 138,31; 138,48; 170,95; 170,99; 173,40; 173,60 ppm.

4.17 Poizkus sinteze metil (R)-2-((S)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-piridin-3-iloksi)fenil) acetata



Slika 21: Poizkus sinteze metil (R)-2-((S)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-piridin-3-iloksi)fenil) acetata

Mešanico spojine **4d** (0,648 g, 1,23 mmol) in PPH_3 (0,48 g, 1,85 mmol) smo raztopili v 10 mL THF in dodali DEAD (0,045 mL, 0,28 mmol) v argonovi atmosferi. Reakcijsko zmes smo mešali 10 ur pri 80°C . Topilo smo odstanili pod znižanim tlakom in zmes očistili s kolonsko kromatografijo. Po koloni smo izolirali le izhodno spojino.

Izgled	rumen gel
M	493,61 g/mol
TLC	R_f (EtOAc/hex= 1/1) = 0,50

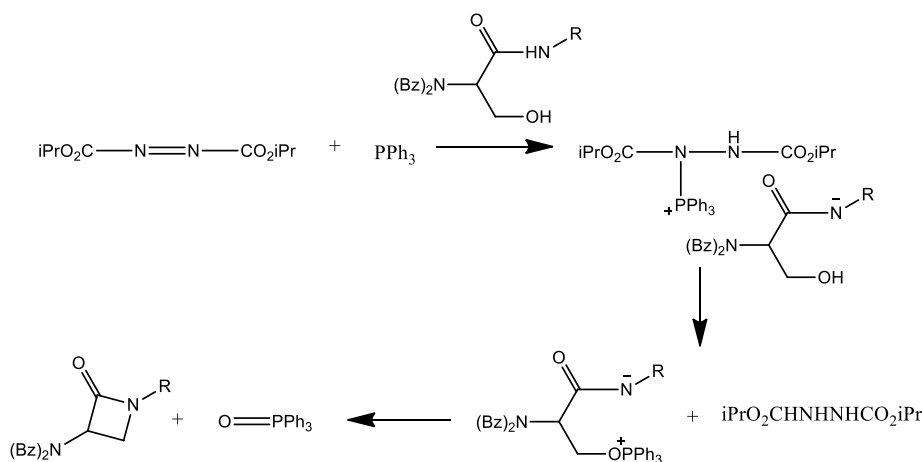
5 RAZPRAVA

Spojino **5a** smo pripravili v štirih korakih tako, da smo najprej D-4-hidroksifenil glicinu (**1a**) uvedli ester na karboksilno kislino. Amino skupino smo zaščitili z Boc anhidridom zato, da ne zreagira z benzil bromidom, ki smo ga dodali v naslednjem koraku. Benzilno skupino smo pripeli na OH skupino ob dodatku K_2CO_3 in v zadnji stopnji še odstranili Boc zaščito s pomočjo trifluoroocetne kisline. Nastane spojina (**5a**) v obliki soli, verjetno pa je tudi prišlo do racemizacije, saj K_2CO_3 lahko odcepi proton na stereogenem centru.

Spojino **2b** smo pripravili tako, da smo L-serinu (**1b**) na amino skupino pripeli dve benzilni skupini.

V naslednjem koraku smo združili spojini **5a** in **2b** tako, da smo v reakcijsko zmes dodali bazo *N*-metilmorfolin ter sklopitvena reagenta HOBt in HATU. HOBt smo uporabili zato, da bi zmanjšali vpliv racemizacije in izboljšali učinkovitost reakcije, HATU pa služi kot reagent, ki pretvori karboksilno kislino v aktivni ester. Reakcijo smo spremljali s TLC in ugotovili smo, da nam je uspelo sintetizirati spojino **1c**.

Spojino **2c** smo pripravili s pomočjo Mitsunobu reakcije (Slika 22) tako, da smo spojini **1c** dodali mešanico PPh_3 in DIAD-a, ki pretvori OH skupino v ester in privede do nastanka β -laktamskega obroča. Pri tem se DIAD reducira, saj služi kot akceptor protonov, PPh_3 pa se oksidira v Ph_3PO . Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo, vendar smo s pomočjo TLC opazili prisotne tudi druge lise. Pri reakciji nastanejo številni stranski produkti, kot so hidrazidi DIAD-a in fosfinski oksidi iz PPh_3 , kar smo tudi potrdili z masno spektroskopijo.



Slika 22: Mehanizem Mitsunobujeve reakcije (22)

V nadaljevanju smo izvedli katalitsko hidrogeniranje tako, da smo spojino **2c** raztopljeno v EtOH in EtOAc prepihali z argonom, da bi zagotovili inertno atmosfero, saj smo v nadaljevanju v bučko uvajali vodik. Reakcijo smo tudi pospešili, saj smo v zmes dodali paladij, ki deluje kot katalizator. Namen reakcije je bila odstranitev vseh prisotnih benzilnih skupin tako, da dobimo prosto amino skupino na β -laktamskem obroču in OH skupino na benzenu. Po filtriranju paladija in čiščenju s kolonsko kromatografijo, smo s pomočjo NMR in masne spektroskopije ugotovili, da smo dobili čisto spojino **3c**, saj nam je uspelo odstraniti tudi DIAD, ki je bil prisoten v prejšnji stopnji.

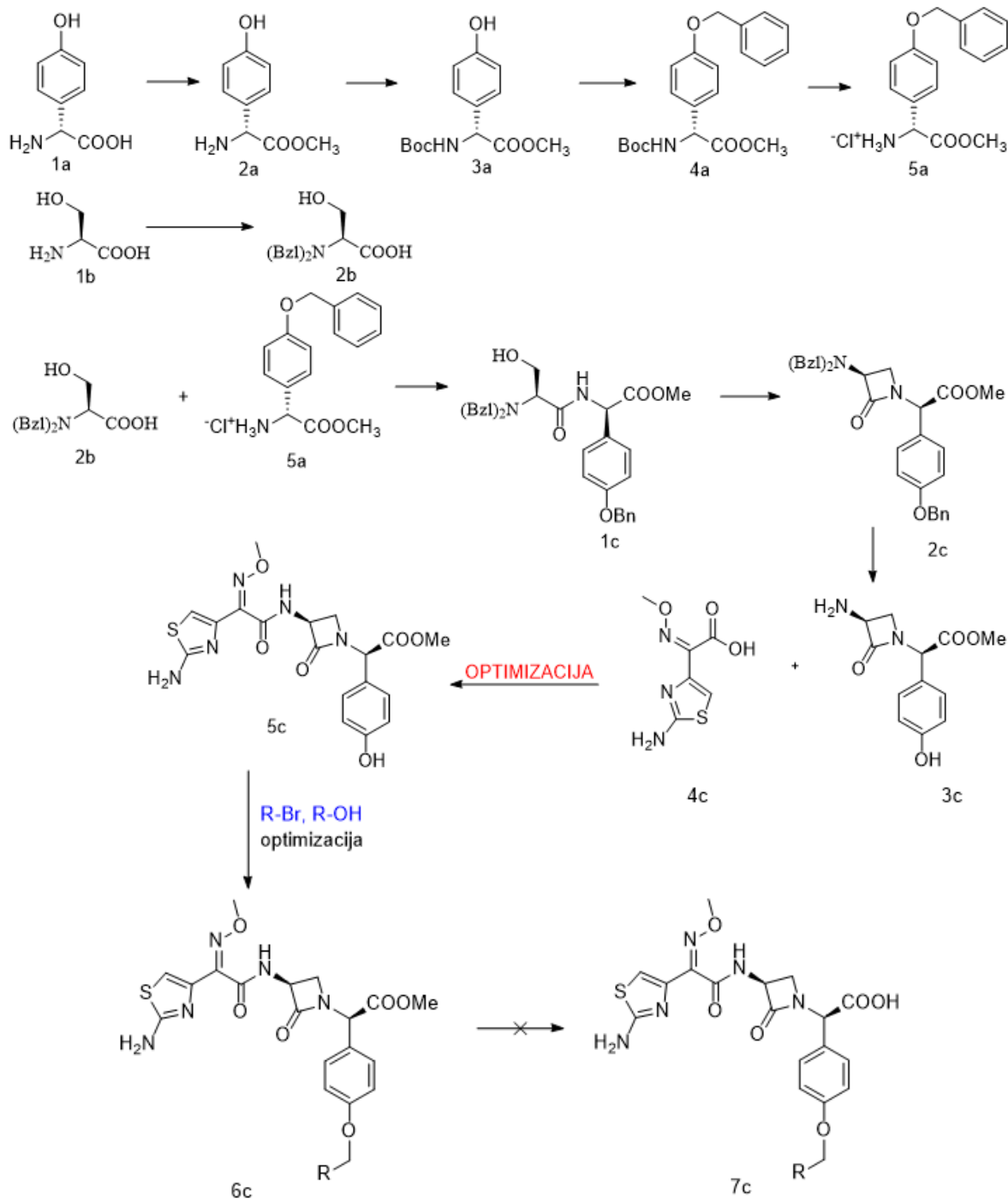
Spojino **3c** smo združili s spojino **4c** s sklopitveno reakcijo, kar privede do nastanka dipeptida (**5c**). Reakcija mora potekati v bazičnem okolju, zato smo uporabili bazo NMM. Dodali smo tudi HOBt, da bi preprečili racemizacijo in izboljšali učinkovitost reakcije, ter EDC, ki je potreben pri sintezi peptidov za nastanek peptidne vezi. Peptidna vez nastane med amino skupino spojine **3c** in karboksilno skupino spojine **4c**, pri tem pa izstopi voda. Spojino smo očistili s kolonsko kromatografijo in dobili čisto spojino **5c**.

V zadnji stopnji smo spojino **5c** sintetizirali tako, da smo dodali K_2CO_3 in 2-pikolilklorid. Reakcija poteče na OH mestu, kamor se veže pikolilni fragment. Z masno spektroskopijo in NMR smo potrdili, da smo dobili željen produkt (spojina **6c**). Poskusili smo tudi odstraniti metilno skupino in pretvoriti ester v karboksilno kislino, da bi dobili spojino **7c**, vendar nam to ni uspelo, verjetno zaradi tega, ker lahko ta spojina v bazičnih pogojih razpade, saj se β -laktamski obroč odpre.

Ker nam je ostalo še dovolj spojine **5a** in **2b**, smo sintezni postopek ponovili s tem namenom, da bi v tokratnem primeru spojino **5c** v zadnji stopnji optimizirali z 2-bromometilpiridinom namesto 2-pikolilkloridom ter primerjali dobljene rezultate. S tankoplastno kromatografijo smo v primeru 2-bromometilpiridina opazili več lis, ki smo jih s kolonsko kromatografijo izolirali. Izolirane produkte smo analizirali z masno spektroskopijo in ugotovili, da nismo dobili želenega produkta (spojina **6c**) tako kot v primeru pikolilklorida. Reakcija verjetno ni uspela, ker je prišlo do racemizacije zaradi baze, poleg tega pa ima brom visoko reaktivnost in je verjetno potekla dimerizacija osnovnega reagenta.

Spojino **1c** smo zaradi zadostne količine izhodnih reagentov ponovno sintetizirali, vendar pa je tokrat nastal stranski produkt (spojina **1.1c**), ki ima prosto aromatsko OH skupino.

Oba produkta smo uspešno ločili s kolonsko kromatografijo (**1c** in **1.1.c**). Ker smo želeli čim večji izkoristek smo OH skupino poskušali pretvoriti v benzilno skupino tako, da smo spojini **1.1c** dodali benzil bromid in K_2CO_3 , vendar nam ni uspelo sintetizirati želenega produkta.



Slika 23: Skupna shema kemijskih reakcij

V želji da bi dobili še kakšen podoben analog, smo poskusili izvesti še Ullmanovo sintezo etra katalizirano z Cu, kjer smo predhodno pripravljene spojini **1d** dodali 2-bromopiridin, CuI in K₂CO₃, ki zagotovi bazične pogoje, da reakcija lahko poteče. Na ta način nam je na OH mesto uspelo pripeti piridin (spojina **2d**). Čeprav smo izhajali iz čiste D-aminokisljine, pa je zaradi visoke temperature in prisotnosti baze na stereogenem centru potekla popolna racemizacija.

V naslednji stopnji smo izvedli katalitsko hidrogeniranje tako, da smo raztopino spojine **2d** prepihali z vodikom. Kot katalizator smo uporabili paladij. Reakcija je potekala v inertni atmosferi, ki smo jo zagotovili z argonom. Reakcijo smo izvedli uspešno, saj smo karbamat pretvorili v prosto amino skupino (spojina **3d**).

Spojino **3d** smo združili s spojino **2a** in **4c** ob prisotnosti NMM. Z namenom boljše učinkovitosti reakcije smo dodali še HOBt in EDC. Reakcija je potekla uspešno, saj nam je uspelo amino skupino pretvoriti v amid (spojina **4d**).

V zadnji stopnji smo želeli z dodatkom mešanice PPh₃ in DEAD-a OH skupino pretvoriti v ester, da bi prišlo do nastanka β-laktamskega obroča, saj bi tako dobili spojino (**5d**), ki je podobna spojini **6c**. NMR analiza je pokazala, da do tvorbe β-laktamskega obroča ni prišlo. Reakcija verjetno ni potekla zaradi sterične oviranosti, ker je spojina **4d** zelo rigidna.

6 SKLEPI

Načrtovali smo sintezno pot za razvoj 4-hidroksifenil glicinskih derivatov monobaktamov, ki bi oponašali β -laktamski antibiotik ceftobiprol. Izhajali smo iz D-4-hidroksifenil glicina, ki smo ga v posameznih korakih uspeli pretvoriti v ustrezno zaščiteno aminokislino (**5a**) in L-serina, kateremu smo pripeli dve benzilni skupini (**2b**).

V okviru sklopitvene in Mitsunobu reakcije nam je uspelo sintetizirati spojino (**2c**), ki vsebuje β -laktamski obroč. V nadaljevanju smo s sklopitveno reakcijo uspeli doseči nastanek dipeptida (**5c**) in na ta način že dobili strukturo, ki je že podobna strukturi ceftobiprola. V zadnji stopnji smo spojino **5c** optimizirali na dva načina. V prvem primeru smo uporabili 2-pikolilklorid in dobili zelene rezultate, saj nam je uspelo sintetizirati spojino (**6c**), ki bi lahko oponašala delovanje ceftobiprola. V drugem primeru smo uporabili 2-bromometilpiridin, vendar nam ni uspelo izolirati zelenega produkta.

Do podobnih analogov smo poskušali priti še na drugačen način tako, da smo uspešno izvedli Ullmanovo sintezo etra in sklopitveno reakcijo, vendar nam v tokratnem primeru ni uspelo sintetizirati β -laktamskega obroča z Mitsunobu reakcijo.

Zaradi bakterijske odpornosti bo v prihodnosti še kako pomemben razvoj novih sinteznih poti za pripravo izboljšanih β -laktamskih antibiotikov, saj bi brez njih tudi manjša infekcija lahko postala smrtonosna.

7 VIRI

1. Schneider T, Sahl H. G. An oldie but a goodie – cell wall biosynthesis as antibiotic target pathway. *International Journal of Medical Microbiology* 2010; 300: 161-169
2. Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 32: 168–207
3. Deketelaere S, Van Nguyen T, Stevens C.V, D’hooghe M. Synthetic Approaches toward Monocyclic 3-Amino-bactams. *Chemistry Open* 2017, 6: 301 – 319
4. Singh S. G, Sudheesh S. Advances in synthesis of monocyclic β -lactams. *ARKIVOC* 2014, (i): 337-385
5. Pitts C. R, Lectka T. Chemical Synthesis of β -Lactams: Asymmetric Catalysis and Other Recent Advances. *Chem. Rev.* 2014, 114: 7930–7953
6. Zaman S. B, Hussain M. A, Nye R, Mehta V, Mamun K. T, Hossain N. A review of Antibiotic Resistance: Alarm Bells are Ringing. *Cureus*. 2017 Jun; 9 (6): e1403. Published online 2017 Jun 28. doi: [10.7759/cureus.1403](https://doi.org/10.7759/cureus.1403), dostop: 12.06.2018
7. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/antibiotic-resistance>, dostop: 12.06.2018
8. Waglechner N, Wright G. D. Antibiotic resistance: it’s bad, but why isn’t it worse?. *BMC Biol.* 2017; 15: 84. Published online 2017 Sep 15. doi: [10.1186/s12915-017-0423-1](https://doi.org/10.1186/s12915-017-0423-1), dostop: 12.06.2018
9. <https://www.cdc.gov/drugresistance/index.html>, dostop: 12.06.2018
10. Liu Y, Breukink E. The Membrane Steps of Bacterial Cell Wall Synthesis as Antibiotic Targets. *Antibiotics (Basel)*. 2016; 5 (3): 28. Published online 2016 Aug 26. doi:[10.3390/antibiotics5030028](https://doi.org/10.3390/antibiotics5030028), dostop: 12.06.2018
11. Zapun A, Noirclerc-Savoie M, Helassa N, Vernet T. Peptidoglycan Assembly Machines: The Biochemical Evidence. *Microbial Drug Resistance* 2012; 18 (3): 256-260

12. Buggl T. D.H, Braddick D, Dowson C. G, Roper D. I. Bacterial cell wall assembly: still an attractive antibacterial target. *Trends in Biotechnology* 2011; 29, (4): 167 - 173
13. Sauvage E, Terrak M. Glycosyltransferases and Transpeptidases/Penicillin-Binding Proteins: Valuable Targets for New Antibacterials. *Antibiotics (Basel)* 2016; 5 (1): 12. Published online 2016 Feb 17. doi: [10.3390/antibiotics5010012](https://doi.org/10.3390/antibiotics5010012), dostop: 12.06.2018
14. Frere J. M., Malcolm G.P. Penicillin-binding proteins: evergreen drug targets. *Current Opinion in Pharmacology* 2014; 18: 112–119
15. 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: 12478-12505
16. Sauvage E, Kerff F, Terrak M, Ayala J. A, Charlier P. The penicillin-binding proteins: structure and role in peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol Rev* 2008; 234–258
17. Kisgen J, Whitney D. Ceftobiprole, a Broad-Spectrum Cephalosporin With Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Drug Forecast* 2008; 33 (11): 631-641
18. Chen Y . T, Seto C. T. Divalent and Trivalent α -Ketocarboxylic Acids as Inhibitors of Protein Tyrosine Phosphatases. *Journal of Medicinal Chemistry* 2002; 45 (18): 3946-3952
19. Liao, L, Zhang F, Dmitrenko O, Bach R. D, Fox J. M. A. A Reactivity/Affinity Switch for Parallel Kinetic Resolution: α -Amino Acid Quasienantiomers and the Resolution of Cyclopropene Carboxylic Acids. *Journal of the American Chemical Society* 2004, 126 (14): P4490-4491, CAPLUS
20. Bello C, Cea M, Dal Bello G, Garuti A, Rocco I, Cirmena G, Moran E, Nahimana A, Duchosal MA, Fruscione F, Pronzato P, Grossi F, Patrone F, Ballestrero A, Dupuis M, Sordat B, Nencioni A, Vogel P. Novel 2-[(benzylamino) methyl] pyrrolidine-3,4-diol derivatives as alpha-mannosidase inhibitors and with antitumor

- activities against hematological and solid malignancies. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 2010; 18 (9): 3320-3334
21. Duo M, Wei Z, Yingxia L. Improved Enantioselective Synthesis of Protected (3S,4S)-4-Amino-3,5-dihydroxypentanoic Acid (ADPA) *Synthetic Communications* 2010; 40 (8): 1099-1105
22. <https://www.organic-chemistry.org/namedreactions/mitsunobu-reaction.shtm> ,
dostop 12.8.2018