

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



SAMO KUZMIČ
MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO



SAMO KUZMIČ

**NAČRTOVANJE, SINTEZA IN VREDNOTENJE MIMETIKOV D-ALA-D-ALA Z
AZIRIDINSKIM GRADNIKOM**

**DESIGN, SYNTHESIS AND EVALUATION OF D-ALA-D-ALA MYMETICS WITH
AZIRIDINE BUILDING BLOCK**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem izdelal na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani, na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom doc. dr. Roka Frlana, mag. farm., in somentorstvom doc. dr. Martine Hrast, mag. farm. Spektroskopske meritve in biokemijska testiranja so bila opravljena na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

Zahvala

Iskreno se zahvaljujem mentorju doc. dr. Roku Frlanu, mag., farm. in somentorici doc. dr. Martini Hrast, mag. farm., za vse posredovano znanje in izkušnje ter za ustvarjanje prijetnega delovnega okolja.

Zahvalil bi se tudi svoji družini in prijateljem, ki so me tekom celotnega študija podpirali in motivirali.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo samostojno izdelal pod mentorstvom doc. dr. Roka Frlana, mag. farm. in somentorstvom doc. dr. Martine Hrast, mag. farm.

Samo Kuzmič

Predsednica komisije: izr. prof. dr. Barbara Ostanek, mag. farm.

Članica komisije: izr. prof. dr. Nina Kočever Glavač, mag. farm.

VSEBINA

POVZETEK	VI
ABSTRACT	VII
SEZNAM OKRAJŠAV	VIII
1. UVOD.....	1
1.1. Protibakterijske učinkovine	1
1.2. Odpornost bakterij na protibakterijske učinkovine.....	2
1.3. Mehanizmi bakterijske odpornosti.....	3
1.4. Bakterijska celična stena.....	4
1.5. Struktura peptidoglikana.....	5
1.6. Biosinteza peptidoglikana.....	6
1.7. Ligaza MurF	8
1.7.1. Mehanizem encimske reakcije.....	9
1.7.2. Znani zaviralci MurF	9
1.8. D-alanil-D-alanin ligaza (Ddl).....	12
1.8.1. Mehanizem encimske reakcije.....	13
1.8.2. Znani zaviralci Ddl	14
2. NAČRT DELA.....	16
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. Materiali.....	17
3.2. Metode	17
3.2.1. Kromatografske metode	17
3.2.2. Spektroskopske metode	18
3.2.3. Optična sučnost	18
3.2.4. Določanje tališča.....	18
3.2.5. Biološka testiranja	18

3.2.6.	Aparature in laboratorijska oprema	19
4.	EKSPERIMENTALNI DEL	20
4.1.	Sintezni načrt	20
4.2.	Splošni sintezni postopki	21
4.2.1.	Sintezni postopek A (reakcijski postopek za sintezo metilnih estrov)	21
4.2.2.	Sintezni postopek B (reakcijski postopek sklopitvenih reakcij).....	21
4.2.3.	Sintezni postopek C (reakcijski postopek odščite tritilne skupine).....	21
4.2.4.	Sintezni postopek D (reakcijski postopek odščite metilnih estrov).....	22
4.3.	Sinteza prve serije spojin (aziridin-D-aminokislina).....	22
4.3.1.	Sinteza (<i>R</i>)-3-hidroksi-1-metoksi-1-oksopropan-2-aminijevega klorida (1). 22	
4.3.2.	Sinteza (<i>R</i>)-1-metoksi-1-oksoheksan-2-aminijevega klorida (5)	22
4.3.3.	Sinteza (<i>R</i>)-1,5-dimetoksi-1,5-dioksopentan-2-aminijevega klorida (6).....	23
4.3.4.	Sinteza (<i>R</i>)-1-metoksi-4-metil-1-oksoptan-2-aminijev klorid (7)	23
4.3.5.	Sinteza metil tritil-D-serinata (2)	24
4.3.6.	Sinteza metil(<i>R</i>)-1-tritilaziridin-2-karboksilata (3)	24
4.3.7.	Sinteza kalijevega (<i>R</i>)-1-tritilaziridin-2-karboksilata (4)	25
4.3.8.	Sinteza metil ((<i>R</i>)-1-tritilaziridin-2-karbonil)-D-alaninata (8).....	26
4.3.9.	Sinteza metil (<i>R</i>)-3-(1-tritilaziridin-2-karboksamido) propanoata (9).....	26
4.3.10.	Sinteza metil ((<i>R</i>)-1-tritilaziridin-2-karbonil)-D-fenilalaninata (10).....	27
4.3.11.	Sinteza dimetil ((<i>R</i>)-1-tritilaziridin-2-karbonil)-D-glutamata (11)	28
4.3.12.	Sinteza metil (<i>R</i>)-2-((<i>R</i>)-1-tritilaziridin-2-karboksamido) heksanoata (12)	29
4.3.13.	Sinteza metil ((<i>R</i>)-1-tritilaziridin-2-karbonil)-D-valinata (13).....	29
4.3.14.	Sinteza metil ((<i>R</i>)-aziridin-2-karbonil)-D-alaninata (14).....	30
4.3.15.	Sinteza metil (<i>R</i>)-3-(aziridin-2-karboksamido) propanoata (15).....	31
4.3.16.	Sinteza metil ((<i>R</i>)-aziridin-2-karbonil)-D-fenilalaninata (16).....	31
4.3.17.	Sinteza dimetil ((<i>R</i>)-aziridin-2-karbonil)-D-glutamata (17).....	32

4.3.18.	Sinteza metil (<i>R</i>)-2-((<i>R</i>)-aziridin-2-karboksamido) heksanoata (18).....	33
4.3.19.	Sinteza metil ((<i>R</i>)-aziridin-2-karbonil)- <i>D</i> -valinata (19).....	33
4.3.20.	Sinteza ((<i>R</i>)-aziridin-2-karbonil)- <i>D</i> -alanina (20)	34
4.3.21.	Sinteza (<i>R</i>)-3-(aziridin-2-karboksamido) propanojske kisline (21).....	35
4.3.22.	Sinteza ((<i>R</i>)-aziridin-2-karbonil)- <i>D</i> -fenilalanina (22).....	35
4.3.23.	Sinteza (<i>R</i>)-2-((<i>R</i>)-aziridin-2-karboksamido) heksanojske kisline (23)	36
4.3.24.	Sinteza ((<i>R</i>)-aziridin-2-karbonil)- <i>D</i> -valina (24).....	37
4.4.	Sinteza druge serije spojin (<i>D</i> -aminokislina-aziridin).....	37
4.4.1.	Sinteza (<i>R</i>)-1-(benziloksi)-3-hidroksi-1-oksopropan-2-aminijevega klorida (25)	37
4.4.2.	Sinteza benzil tritil- <i>D</i> -serinata (26).....	38
4.4.3.	Sinteza benzil (<i>R</i>)-1-tritilaziridin-2-karboksilata (27).....	39
4.4.4.	Sinteza benzil (<i>R</i>)-aziridin-2-karboksilata (28).....	40
4.4.5.	Sinteza (<i>tert</i> -butoksikarbonil)- <i>D</i> -alanina (29).....	41
4.4.6.	Sinteza ((benziloksi)karbonil)- <i>D</i> -fenilalanina (30).....	41
4.4.7.	Sinteza benzil (<i>R</i>)-1-((<i>tert</i> -butoksikarbonil)- <i>D</i> -alanil)aziridin-2-karboksilata (31)	42
4.4.8.	Sinteza benzil (<i>R</i>)-1-(((benziloksi)karbonil)- <i>D</i> -fenilalanil)aziridin-2-karboksilata (32).....	43
4.4.9.	Sinteza (<i>R</i>)-aziridin-2-karboksilne kisline (33).....	44
4.5.	Neuspele reakcije.....	45
4.5.1.	Poskus sinteze ((<i>R</i>)-aziridin-2-karbonil)- <i>D</i> -glutaminske kisline (FDF 80) ...	45
4.5.2.	Poskus sinteze benzil (<i>R</i>)-1-(<i>D</i> -alanil)aziridin-2-karboksilata (FDF 98, FDF 99, FDF 100, FDF 113)	46
4.5.3.	Poskus sinteze benzil (<i>R</i>)-1-(tritil- <i>D</i> -fenilalanil)aziridin-2-karboksilata (FDF 110)	47
4.5.4.	Poskus sinteze (<i>R</i>)-1-(<i>D</i> -fenilalanil)aziridin-2-karboksilne kisline (FDF 117, FDF 118)	48

5.	REZULTATI IN RAZPRAVA	49
5.1.	Aziridinski gradnik	49
5.2.	Razprava o sinteznih postopkih	49
5.2.1.	Zaščita karboksilne kisline z metilnim estrom	49
5.2.2.	Zaščita amino skupine s tritilno zaščitno skupino	50
5.2.3.	Tvorba aziridina (3 in 27).....	51
5.2.4.	Hidroliza metilnega estra s KOH	52
5.2.5.	Sklopitvene reakcije	53
5.2.6.	Odstranitev tritilne zaščitne skupine	55
5.2.7.	Hidroliza metilnega estra z LiOH.....	57
5.2.8.	Sinteza benzil (<i>R</i>)-1-tritilaziridin-2-karboksilata (27) in sklopitev do končnih spojin 31 in 32	58
5.2.9.	Sinteza Boc-D-alanina (29).....	59
5.2.10.	Sinteza <i>N</i> -Cbz-D-fenilalanina (30).....	60
5.2.11.	Poskusne reakcije.....	61
5.3.	Rezultati in razprava bioloških testiranj	62
6.	SKLEP	66
7.	PRILOGA: ŠIFRANT SPOJIN	68
8.	LITERATURA	69

POVZETEK

Odpornost bakterij na protibakterijske učinkovine predstavlja enega izmed največjih zdravstvenih problemov, zato je odkritje novih razredov teh učinkovin nujno potrebno. Ena najpomembnejših razlik, ki loči bakterijsko celico od človeške, je njena toga in mehansko odporna celična stena, katere glavni gradnik je makromolekula peptidoglikana. Z zaviranjem biosinteze peptidoglikana močno oslabimo integriteto celične stene in s tem vplivamo na preživetje bakterij. Esencialna encima v biosintezi peptidoglikana sta ligaza MurF in D-alanil-D-alanin ligaza, ki predstavljata v veliki meri še neizkoriščeni tarči za razvoj novih protibakterijskih zdravil.

V okviru magistrske naloge smo s posnemanjem strukture substratov in produktov encimskih reakcij, ki jih katalizirata omenjena encima, sintetizirali 13 mimetikov dipeptida D-Ala-D-Ala z aziridinskim gradnikom. Pri sintezi smo izhajali iz D-serina, ki smo mu zaščitili karboksilno in amino skupino, nato pa izvedli ciklizacijo do aziridina. Iz aziridina smo v naslednjih korakih preko sklopitvenih reakcij z različnimi D-aminokislinami tvorili dipeptide aziridin-D-aminokislina, ki smo jim nato odstranili zaščitne skupine in tako prišli do produktov prve serije spojin. Drugo serijo spojin so predstavljali mimetiki s strukturo D-aminokislina-aziridin. Pri teh spojinah je predstavljala veliko težavo stabilnost, saj smo sintetizirali *N*-acil aziridine, ki imajo v molekuli aktiviran amid in elektrofilen aziridin. Z ustreznimi analiznimi postopki smo dokazali strukturno ustreznost in čistost končnih spojin ter izvedli biokemijske teste na encimih MurF in DdlB. Na encimu MurF smo izvedli dva različna testa. S testom zaviralne aktivnosti smo preverjali, ali sintetizirani dipeptidi zavirajo delovanje encima, s testom lažnega substrata pa, ali encim prepozna sintetizirane peptidne mimetike kot lasten substrat (D-Ala-D-Ala) in jih vgradi v nastajajoče peptidno zaporedje. Rezultati so pokazali, da nobena izmed sintetiziranih spojin ni zavirala aktivnosti encimov DdlB in MurF. Pri testu lažnega substrata se je kot učinkovita izkazala spojina **20**, ki jo je encim deloma prepoznal kot lasten substrat in jo vgradil v nastajajoči UDP-MurNAc-pentapeptid. Spojini **20** smo določili minimalno inhibitorno koncentracijo.

Sintetizirali smo nov tip spojin z aziridinskim gradnikom, kar odpira nove možnosti tudi v organski kemiji, kjer predstavljajo aziridini pomembne intermediate pri asimetrični sintezi aminokislin in peptidov.

Ključne besede: aziridin, Ddl, lažni substrat, MurF, protibakterijsko delovanje

ABSTRACT

Antibacterial drug resistance is rapidly becoming one of the biggest healthcare challenges therefore, there is an urgent need for the development of novel effective antibacterial drugs. One of the most important differences that distinguishes bacterial cell from the human cell is its thick and mechanically rigid cell-wall with the macromolecule of peptidoglycan as its key component. By interfering with the biosynthetic pathway of peptidoglycan we are able to alter its structure and weaken the integrity of the cell-wall and thus influence the survival rate of the bacteria. The essential enzymes in the peptidoglycan biosynthesis are MurF ligase and D-alanyl-D-alanine ligase, which represent thus far largely unexploited targets for the development of novel antibacterial drugs.

In the course of our research, we synthesized 13 mimetics of dipeptide D-Ala-D-Ala with aziridine building block by mimicking the structure of substrates and products of enzyme reaction catalysed by the MurF and Ddl enzymes. In the initial stages of synthetic procedure, we protected the carboxyl and amino group of D-serine and then performed cyclization to yield aziridine. In the first series of compounds, dipeptide aziridine-D-amino acid was formed via coupling reactions with various D-amino acids. In the final stages, we removed protecting groups from the dipeptide to yield products. The second series of compounds were mimics with D-amino acid-aziridine structure. A major problem we encountered with these compounds was their stability - they contained the unstable *N*-acyl aziridine group. Final compounds were tested for their inhibitory activity against MurF and DdlB enzymes. Two different tests were performed. By testing the inhibitory activity, we checked whether the synthesized dipeptides inhibit the activity of the enzyme and with the fake substrate test, we checked whether the enzyme recognizes synthesized peptide mimetics as its own substrate (D-Ala-D-Ala) and incorporates them into the emerging peptide sequence. The results showed that none of the synthesized compounds inhibited the activity of enzymes DdlB and MurF. In the fake substrate test, enzyme partially recognized compound **20** as its own substrate and incorporated it into the UDP-MurNAc-pentapeptide. Compound **20** was also tested for its antibacterial activity.

We have synthesized a new type of compound with an aziridine building block. That opens new synthetic possibilities in organic chemistry, where aziridines represent an important intermediate in the asymmetric synthesis of amino acids and peptides.

Key words: antibacterial, aziridine, Ddl, false substrate, MurF

SEZNAM OKRAJŠAV

ACN	acetonitril
ADP	adenozin difosfat
ATP	adenozin trifosfat
ATR	oslabljena popolna odbojnost (ang. <i>attenuated total reflectance</i>)
Boc	terc-butiloksikarbonil
Boc₂O	di-terc-butil dikarbonat
bs	širok singlet
CbzCl	benzil kloroformat
CDCl₃	devteriran kloroform
d	dublet
dd	dublet dubleta
ddd	dublet dubleta dubleta
DMF	<i>N,N</i> -dimetilformamid
DMSO-<i>d</i>₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
D₂O	devterijev oksid (devterirana voda)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ekv	ekvivalent
ESI	ionizacija z razprševanjem (ang. <i>electrospray ionisation</i>)
EtOAc	etilacetat
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
HATU	(1-(Bis(dimetilamino)metilen)-1 <i>H</i> -1,2,3-triazolo[4,5- <i>b</i>]piridinijev 3- oksid heksafluorofosfat
HOBt	1-hidroksibenzotriazol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke zmogljivosti (ang. <i>high performance/pressure liquid chromatography</i>)
HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti (ang. <i>high resolution mass spectrometry</i>)
IC₅₀	koncentracija zaviralca, pri kateri je inhibicija encima 50 %
J	sklopitvena konstanta
m	multiplet
M	molarna koncentracija

MeOD	devteriran metanol
MF	mobilna faza
MIK	minimalna inhibitorna koncentracija
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
MS	masna spektrometrija
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	jedrsko magnetna resonanca (ang. <i>nuclear magnetic resonance</i>)
PBP	penicilin vezoči proteini (ang. <i>penicillin-binding proteins</i>)
Pd/C	katalizator paladij, adsorbiran na aktivnem oglju
q	kvartet
qd	kvartet dubleta
qqd	kvartet kvarteta dubleta
RA	rezidualna aktivnost
Rf	retencijski faktor
RNA	ribonukleinska kislina
s	singlet
t	triplet
TBTU	<i>O</i> -(benzotriazol-1-il)- <i>N,N,N',N'</i> -tetrametiluronijev tetrafluoroborat
THF	tetrahidrofuran
TLC	tankoplastna kromatografija (ang. <i>thin layer chromatography</i>)
TMS	tetrametilsilan
UDP	uridin difosfat

1. UVOD

1.1. Protibakterijske učinkovine

Boj proti bakterijskim okužbam poteka že od nekdaj. Zapisi o protibakterijskem zdravljenju izvirajo iz Starega Egipta, kjer so na okužene rane polagali splesnel kruh [1]. Prvi antibiotik, izoliran iz naravnih virov, je bila mikofenolna kislina, ki jo je italijanski fiziolog in mikrobiolog B. Gosio leta 1893 izoliral iz glive *Penicillium glaucum* kot potencialno zdravilo za pelagro, za katero so v tistem času mislili, da je posledica bakterijske okužbe. Kasneje so ugotovili, da je pelagra posledica pomanjkanja niacina (vitamin B3), za mikofenolno kislino pa se je izkazalo, da učinkovito zavira rast bakterije *Bacillus anthracis*. Poznejše raziskave so pokazale, da izkazuje tudi protivirusno, antimikotično in protitumorno aktivnost. Leta 1909 je P. Ehrlich s sodelavci izdelal prvo sintezno protimikrobno zdravilo Salvarsan, ki je vsebovalo učinkovino arzenamin. To zdravilo je skoraj 40 let predstavljalo standardno terapijo za zdravljenje sifilisa, ki ga povzroča bakterija *Treponema pallidum*. Ehrlich je s tem odkritjem postavil temelje moderni kemoterapiji, saj je bil prvi, ki je uporabil popolnoma sintezno učinkovino za zdravljenje določene bolezni. Rojstvo dobe antibiotikov predstavlja Flemingovo odkritje penicilina leta 1928, ki mu je sledilo odkritje številnih novih spojin naravnega in sinteznega izvora [2, 3]. Med letoma 1940 in 1962 je na trg prišlo več kot 20 novih razredov antibiotikov, od leta 1962 naprej pa le še dva [4].

Leta 1947 je S. A. Waksman definiral pojem antibiotik na naslednji način: »Antibiotik je kemijska snov, ki jo proizvedejo mikroorganizmi in ima sposobnost zaviranja rasti ali uničenja bakterij in drugih mikroorganizmov« [3]. Glede na njegovo definicijo lahko protibakterijske učinkovine razdelimo na antibiotike in kemoterapevtike. Med antibiotike spadajo sekundarni presnovki različnih vrst organizmov (gliv, bakterij, lišajev, alg), ki lahko delujejo bakteriostatično ali bakteridicidno. V širšem smislu lahko med antibiotike uvrščamo tudi njihove polysintezne derivate. Izraz kemoterapevtik uporabljamo za sintezno pridobljene učinkovine [5].

Za učinkovito delovanje protibakterijskih učinkovin je ključnega pomena njihova selektivna toksičnost. Za doseg selektivne toksičnosti morajo učinkovine delovati na tarče, ki so prisotne le v bakterijah oziroma se mora tarča v bakterijski celici bistveno razlikovati od sesalske različice. Najpogostejši mehanizmi delovanja protibakterijskih učinkovin so zaviranje sinteze celične stene, sinteze proteinov, sinteze RNA, podvojevanja DNA in povečanje prepustnosti celične membrane [6, 7]. Nekatere učinkovine, kot so penicilini, delujejo učinkovito le proti določenim vrstam bakterij, zato jih uvrščamo med

ozkospektralne protibakterijske učinkovine. Po drugi strani deluje antibiotik ampicilin učinkovito proti širokemu spektru gramnegativnih in grampozitivnih bakterij, zato ga uvrščamo med širokospektralne protibakterijske učinkovine. Protimikrobne učinkovine lahko zavirajo rast bakterij (delujejo bakteriostatično) ali povzročajo njihovo smrt (baktericidno delovanje). Znani predstavniki prve skupine so tetraciklini, v drugo skupino pa spadajo penicilini [8].

1.2. Odpornost bakterij na protibakterijske učinkovine

Ahilova peta protibakterijskih učinkovin je razvoj bakterijske odpornosti. Bakterije se med seboj razlikujejo po hitrosti mutacij. Nekateri sevi bakterije *Neisseria meningitidis* so še vedno občutljivi na penicilin, medtem ko so pri bakteriji *Staphylococcus aureus* odpornost odkrili že okrog leta 1940. Odpornost na meticilin so pri nekaterih bakterijah zabeležili že eno leto po njegovem prihodu na tržišče [4].

Večina prisotne odpornosti izvira iz narave in je posledica evlucijskih pritiskov [9]. Bakterije bivajo na Zemlji že več kot 3 milijarde let in ves ta čas so bile izpostavljene vplivu antibiotikov, proizvedenih s strani drugih organizmov, zato so kot odgovor nanje razvile obrambne mehanizme, ki se izrazijo kot odpornost na enega ali več antibiotikov [8]. Obsežna raba antibiotikov ustvarja še dodaten selekcijski pritisk, ki favorizira bakterije s pridobljenimi mehanizmi odpornosti [10]. Ločimo naravno in pridobljeno odpornost. O naravni odpornosti govorimo, kadar bakterijske celice v svoji strukturi že po naravi ne vsebujejo tarč, na katere delujejo protibakterijske učinkovine, oziroma nimajo transportnih sistemov za njihov prenos v notranjost celice. Za pridobljeno odpornost je potrebna sprememba že obstoječega genetskega materiala ali pridobitev novega iz zunanjih virov. Ločimo vertikalno in horizontalno prenašanje genov za odpornost. Pri vertikalnem prenašanju pride do spontanij mutacij genov, ki se preko podvajanja DNA prenašajo naprej. Horizontalen prenos genov je proces, pri katerem poteka prenos genetskega materiala v obliki DNA med bakterijami iste ali različne vrste. Trije najpogostejši načini so konjugacija, transformacija in transdukcija. Pri procesu konjugacije pride do prenosa plazmidov, krožnih fragmentov DNA, preko direktnega stika med celicama. Transformacija je proces, pri katerem bakterija sprejme dele DNA iz okolice, ki so se tam znašli zaradi celične smrti ali lize drugih bakterij. Bakteriofagi v procesu transdukcije prenašajo DNA med dvema sorodnima bakterijama. Možna je akumulacija več različnih genov v eni bakterijski celici, posamezen gen pa običajno nosi odpornost le za določeno učinkovino [11].

1.3. Mehanizmi bakterijske odpornosti

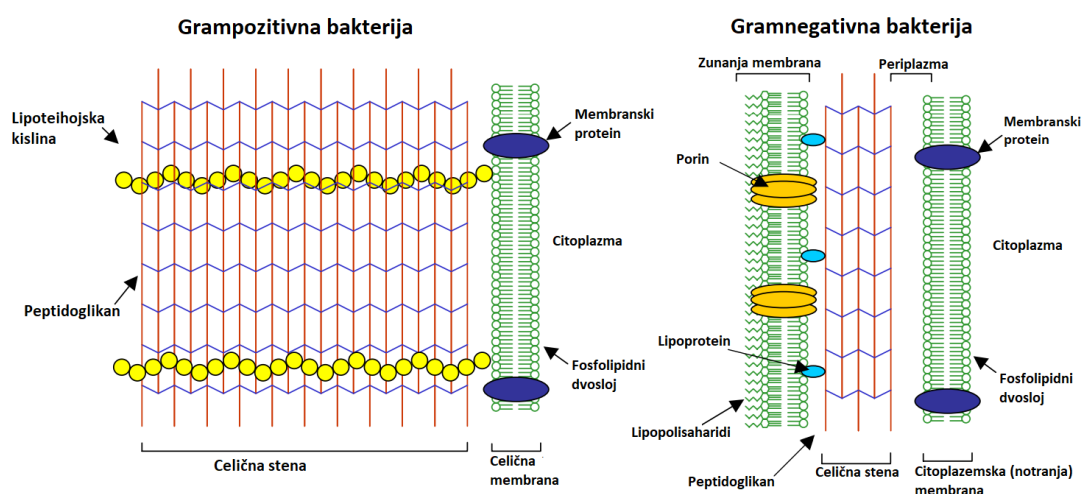
Bakterije so v letih svojega obstoja razvile različne mehanizme odpornosti. Med najpogostejše mehanizme sodijo: sprememba permeabilnosti zunanje celične membrane pri gramnegativnih bakterijah, aktivno črpanje učinkovin iz bakterijske celice, sprememba tarčne molekule oziroma receptorja in encimska inaktivacija protibakterijskih učinkovin [12].

Porini so membranske beljakovine, ki tvorijo kanalčke skozi zunanjo celično membrano pri gramnegativnih bakterijah. Majhne hidrofilne molekule, kot so β -laktami in kinoloni, lahko preidejo zunanjo celično membrano samo preko porinov. V bakterijah so, kot odgovor na protibakterijske učinkovine, opazili zmanjšano število porinov, kar vodi v zmanjšano permeabilnost zunanje celične membrane in posledično manjšo koncentracijo učinkovine v citoplazmi. Tako so nekatere bakterije razvile odpornost na določene razrede protibakterijskih učinkovin [6]. Drugi način zmanjšanja znotrajcelične koncentracije učinkovin je njihovo aktivno črpanje iz bakterijskih celic preko izlivnih črpalk (ang. *efflux pump*). Te črpalke se za razliko od porinov nahajajo na citoplazemski membrani in so prisotne pri grampozitivnih in gramnegativnih bakterijah. Večinoma delujejo kot prenašalci za več različnih razredov učinkovin in s tem pomembno pripomorejo k razvoju multirezistentnih bakterijskih sevov [6]. Pogost mehanizem so naravne variacije ali pridobljene spremembe tarčne molekule oziroma receptorja, do katerih pride najpogosteje zaradi spontanij mutacij genov. Vezava antibiotikov in kemoterapevtikov je zelo specifična, zato lahko že najmanjše spremembe v vezavnem mestu vplivajo na jakost vezave in posledično tudi na njihov učinek [6]. Nekatere bakterije so sposobne proizvesti encime, ki inaktivirajo učinkovine. Beta-laktamaza hidrolizira večino β -laktamov, ki imajo estrske ali amidne vezi. Med njih spadajo penicilini, cefalosporini, monobaktami in karbapenemi. Poznamo več kot 300 različnih β -laktamaz. Kloramfenikol-acetil-transferaza katalizira reakcijo acetilacije hidroksilne skupine kloramfenikola, ki se posledično ne more ustrezno vezati na ribosomalno podenoto 50S. Inaktivacija aminoglikozidov poteka preko fosforilacije, adenilacije in acetilacije, s tem se zmanjša njihova afiniteta do ribosomalne podenote 30S [6]. Boj med razvojem novih učinkovin ter odzivom bakterij z razvojem odpornosti poteka ves čas, zato je odkritje novih razredov protibakterijskih učinkovin nujno potrebno [13]. Vendar se moramo hkrati zavedati, da predstavlja odpornost kompleksen problem, ki zahteva celovit pristop. Potrebni so boljši nadzor nad širjenjem okužb, boljša

diagnostika ter racionalna uporaba učinkovin, tako v humani medicini kot tudi v veterini [12].

1.4. Bakterijska celična stena

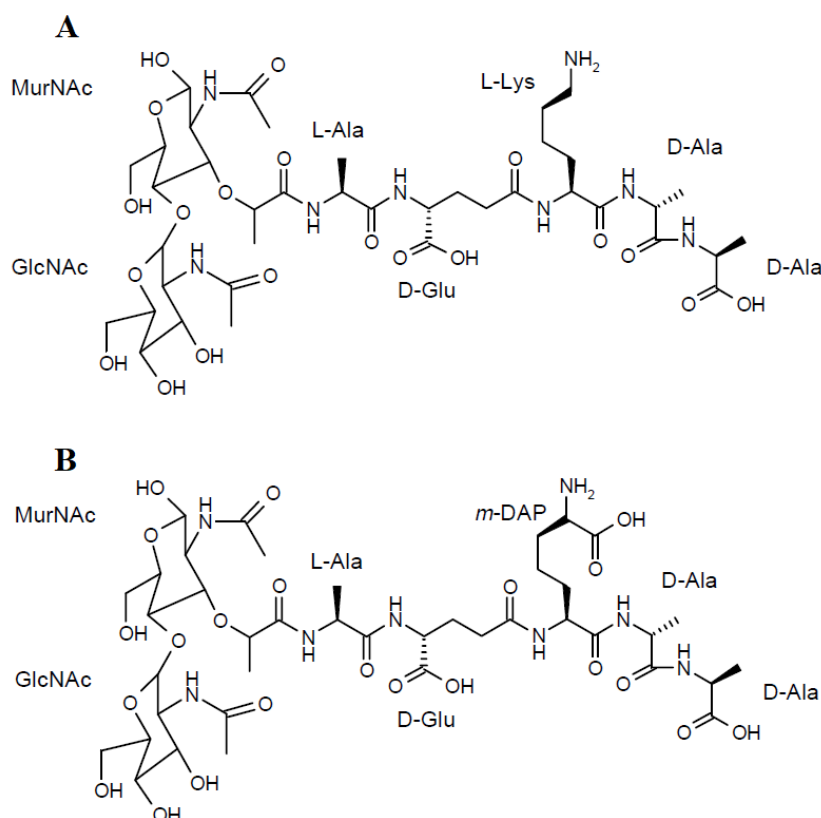
Bakterijska celična stena je makromolekulska struktura s kompleksno zgradbo, ki celici omogoča vzdrževanje osmotskega tlaka, jo varuje pred zunanjimi vplivi, ji daje obliko in omogoča selektivno izmenjavo hranilnih snovi z okolico [14]. Njeno najpomembnejšo strukturo predstavlja peptidoglikan, ki je sestavljen iz mreže linearnih aminopolisaharidnih verig. Z barvanjem po Gramu lahko bakterije na osnovi razlik v zgradbi celične stene razdelimo na grampozitivne, ki se obarvajo vijolično, in gramnegativne, ki se obarvajo rdeče [15]. Pri obeh tipih je celična stena zgrajena iz peptidoglikana, razlikujeta se le po številu njegovih plasti. Grampozitivne bakterije vsebujejo približno 20 dodatnih plasti peptidoglikana, ki ga prebadajo anionski polimeri (teihajska in teihuronska kislina) (slika 1). Ti delujejo kot ionskoizmenjevalni sistem za uravnavanje koncentracije ionov. Gramnegativne bakterije se od grampozitivnih razlikujejo tudi po dodatni zunanji membrani, ki jo sestavljajo fosfolipidi, proteini in lipopolisaharidi. Hidrofilni lipopolisaharidi nudijo bakterijam zaščito pred hidrofobnimi molekulami in predstavljajo glavno antigensko determinanto, na katero se običajno odzove imunski sistem gostitelja. Prenos molekul skozi zunanjo membrano poteka večinoma preko porinov, proteinskih kanalov, ki segajo skozi celotno zunanjo membrano. Med celično steno in notranjo membrano se nahaja gelu podobna periplazma, v kateri je veliko encimov in proteinov [14]. Bakterijska celična stena je nujna za preživetje bakterij, z delovanjem nanjo pa dosegamo tudi selektivno toksičnost, zato predstavlja idealno tarčo za protibakterijska zdravila [16].



Slika 1: Zgradba celične stene pri grampozitivnih in gramnegativnih bakterijah, prirejeno po [14].

1.5. Struktura peptidoglikana

Peptidoglikan ali murein je heteropolimer, zgrajen iz dolgih linearnih glikanskih verig, ki so med seboj prečno povezane z oligopeptidi. Glikanske verige so sestavljene iz ponavljajočih se diaminosaharidnih enot *N*-acetilmuraminske kisline (MurNAc) in *N*-acetilglukozamina (GlcNAc), povezanih z β -1,4-glikozidno vezjo (slika 2). Peptidno zaporedje na novo sintetiziranega pentapeptida sestavljajo aminokislina: L-alanin, D-glutaminska kislina, L-lizin ali *mezo*-diaminopimelična kislina ter dva zaporedna D-alanina. Po prečni povezavi glikanskih verig dobimo končen tetrapeptid, terminalni D-alanin se namreč med procesom transpeptidacije odcepi. Peptidoglikanska enota je podobna pri grampozitivnih in gramnegativnih bakterijah, razlikujejo se največkrat le v tretji aminokislini. Aminokislina, ki jo na tem mestu najdemo predvsem pri grampozitivnih bakterijah, je L-lizin, pri gramnegativnih pa *mezo*-diaminopimelična kislina. Ta aminokislina ima pomembno vlogo, saj sodeluje pri prečni povezavi med verigami peptidoglikana [14, 17].



Slika 2: Osnovna enota peptidoglikana. S črko A je označena struktura peptidoglikana, ki prevladuje pri grampozitivnih bakterijah in ima na tretjem mestu peptidnega zaporedja L-lizin. Črka B pa predstavlja peptidoglikan, prevladujoč pri gramnegativnih bakterijah, ki ima na tretjem mestu peptidnega zaporedja *mezo*-diaminopimelično kislino. Prirejeno po [14].

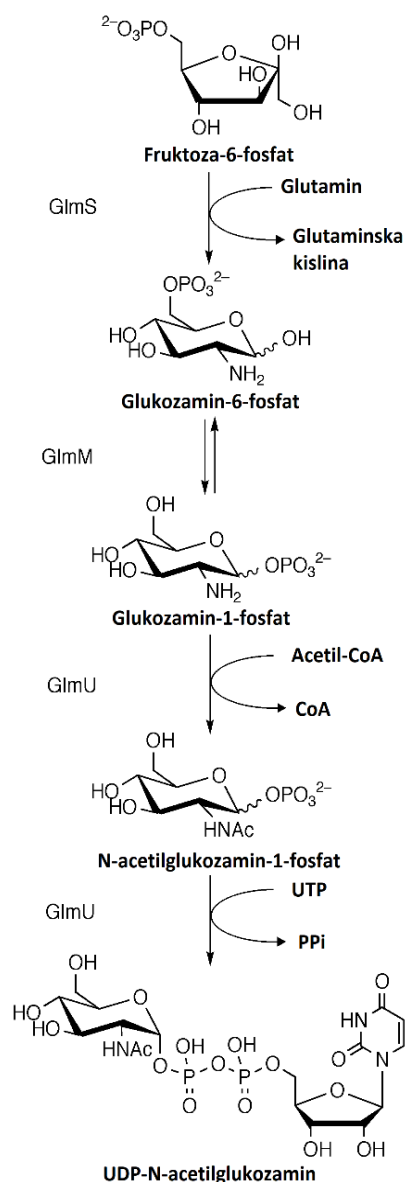
1.6. Biosinteza peptidoglikana

Biosinteza peptidoglikana se začne s sintezo predhodnikov v citoplazmi (slika 3 in slika 4), nadaljuje na notranji strani in konča na zunanji strani celične membrane. V prvem koraku se D-fruktoza-6-fosfat pretvori v glukozamin-6-fosfat. Reakcijo katalizira encim L-glutamin D-fruktoza-6-fosfat amidotransferaza (GlmS sintaza), kot vir dušika pa služi glutamin, ki se pri reakciji pretvori v glutaminsko kislino. Drugi korak vključuje pretvorbo glukozamin-6-fosfata v glukozamin-1-fosfat. Reakcijo katalizira encim GlmM (fosfoglukozamin mutaza) in poteka po pingpong mehanizmu, preko intermediata glukozamin-1,6-difosfata. Tretja stopnja je pretvorba glukozamin-1-fosfata v *N*-acetilglukozamin-1-fosfat. Reakcijo katalizira *C*-terminalna domena encima GlmU sintaza, acetyl-CoA služi kot donor acetilne skupine. V četrti stopnji poteka pretvorba *N*-acetilglukozamin-1-fosfata v UDP-*N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc), katalizira jo *N*-terminalna domena encima GlmU sintaze, kot drugi reagent v reakcijo vstopa UTP (uridine-5'-trifosfat), izstopa pa pirofosfat (PPi). UDP-*N*-acetilglukozamin je esencialen prekursor v sintezi peptidoglikana ter številnih drugih makromolekul v bakterijski celični steni, kot so teihojska kislina

pri grampozitivnih bakterijah ali lipopolisaharidi pri gramnegativnih [19].

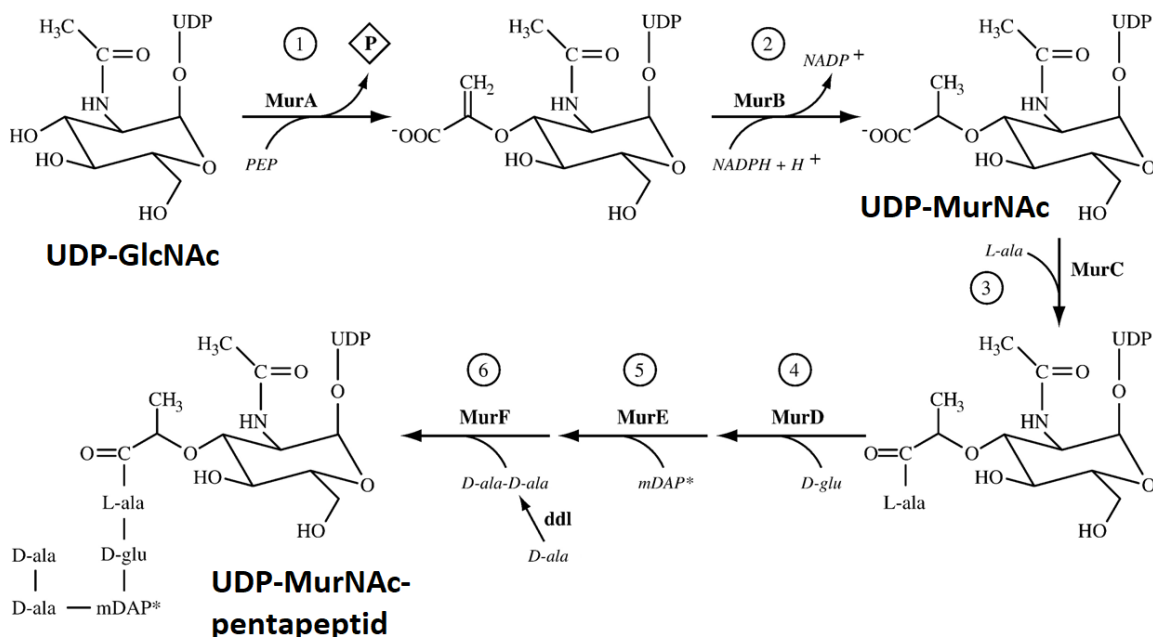
V naslednjih dveh stopnjah sledi pretvora do UDP-*N*-acetilmuraminske kisline (UDP-MurNAc). Prenos enolpiruvata s fosfoenolpiruvata (PEP) na 3'-hidroksilno skupino UDP-GlcNAc katalizira encim MurA transferaza. V drugem koraku poteče redukcija enolpiruvata do D-laktata z NADPH pod vplivom encima MurB reduktaza. Tako dobimo UDP-MurNAc [19].

Tvorba UDP-MurNAc-pentapeptida poteka po korakih s pripenjanjem posameznih aminokislin na D-laktoilno skupino UDP-MurNAc. Pripenjanje aminokislin poteka v



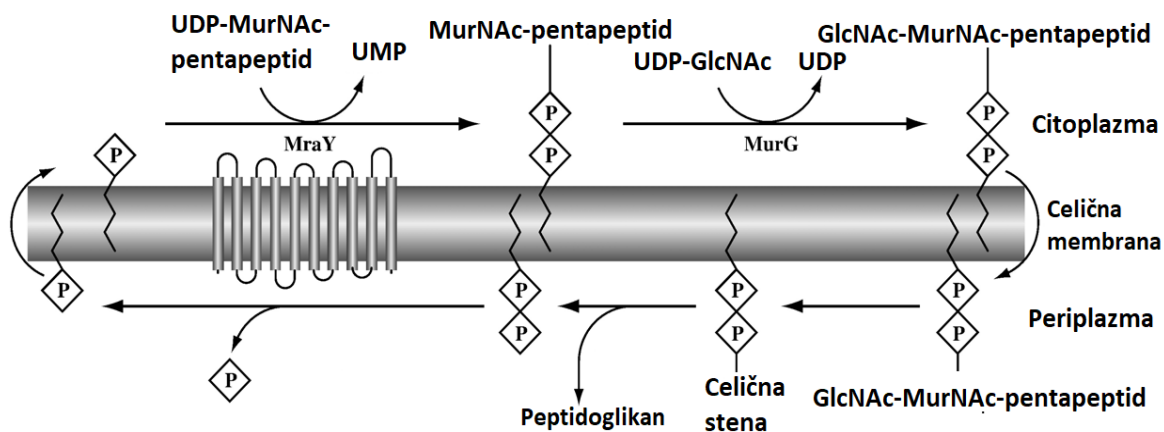
Slika 3: Biosinteza UDP-GlcNAc, prirejeno po [19].

naslednjem zaporedju: L-alanin, D-glutaminska kislina, L-lizin ali diaminopimelična kislina ter dipeptid D-alanin-X, kjer X običajno predstavlja D-alanin, pri nekaterih bakterijah pa sta na tem mestu možna tudi D-laktat ali D-serin. Sintezo dipeptida D-alanil-D-alanin katalizira encim D-alanil-D-alanin ligaza (Ddl), posamezne korake pripenjanja aminokislin pa specifični citoplazemski encimi Mur ligaze, v zaporedju MurC, MurD, MurE in MurF, ki za svoje delovanje potrebujejo ATP in Mg^{2+} [19].



Slika 4: Biosinteza UDP-MurNAc-pentapeptida pri gramnegativnih bakterijah, prirejeno po [20].

Proces biosinteze peptidoglikana se v naslednjih korakih seli iz citoplazme na notranjo stran celične membrane (slika 5). Encim fosfo-*N*-acetilmuramoil-pentapeptid transferaza (MraY) katalizira prenos fosfo-MurNAc-pentapeptida, ki izvira iz UDP-MurNAc-pentapeptida, na lipidni prenašalec undekaprenil fosfat in tako nastane MurNAc-(pentapeptid)-pirofosforil undekaprenol (lipid I). V naslednjem koraku katalizira encim *N*-acetilglukozamin transferaza (MurG) prenos *N*-acetilglukozamina na lipid I, tako dobimo GlcNAc-MurNAc-(pentapeptid)-pirofosforil undekaprenol (lipid II). Lipid II se nato prenese na zunanjo stran celične membrane, kjer se s procesom transglikozilacije in transpeptidacije vgradi v celično steno. Povezovanje disaharidnih enot v daljše glikanske verige katalizirajo encimi transglikozilaze. Biosinteza peptidoglikana se zaključi s prečno povezavo linearnih gradnikov, pripetih na lipidni prenašalec, z že obstoječimi verigami peptidoglikana v procesu transpeptidacije. Ta proces katalizirajo encimi transpeptidaze, med katerimi so najbolj znani penicilin vezoči proteini [19, 20].

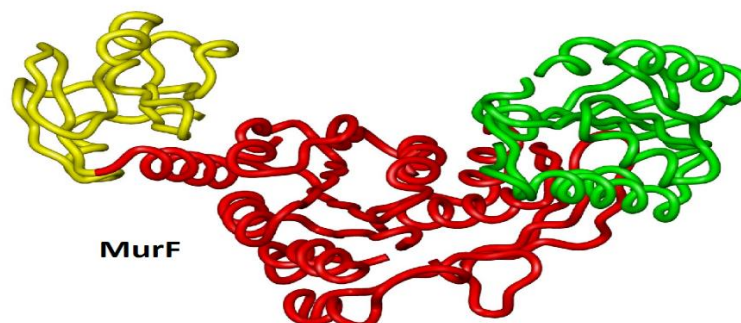


Slika 5: Zaključne stopnje biosinteze peptidoglikana pri gramnegativnih bakterijah, prirejeno po [20].

1.7. Ligaza MurF

Ligaze Mur (MurC, MurD, MurE in MurF) so od ATP odvisni bakterijski znotrajcelični encimi, ki katalizirajo adicijo aminokislin L-Ala, D-Glu, L-Lys ali mezo-DAP in dipeptida D-Ala-D-Ala na UDP-MurNAc, da dobimo produkt UDP-MurNAc-pentapeptid. Ker je podobnost teh encimov v aminokislinskem zaporedju in mehanizmu kataliziranih reakcij med posameznimi bakterijskimi vrstami zelo visoka, lahko sklepamo, da bo imel dober zaviralec teh encimov širok spekter delovanja [21].

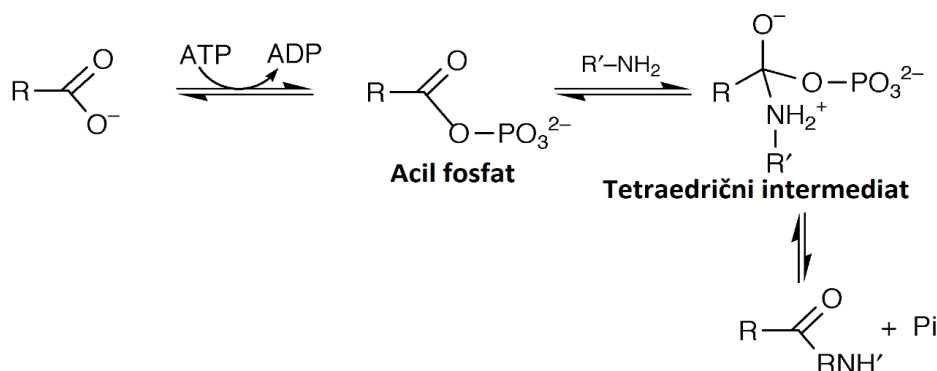
Ligaza MurF ali sintetaza MurF je encim, ki katalizira vezavo dipeptida D-Ala-D-Ala na UDP-MurNAc-tripeptid, tako dobimo produkt UDP-MurNAc-pentapeptid. Pri nekaterih sevih, odpornih na vankomicin, se namesto dipeptida D-Ala-D-Ala pojavljata D-Ala-D-Ser in D-Ala-D-Lac [22]. Za svoje delovanje potrebuje ATP in Mg^{2+} . MurF ligaza je sestavljena iz N-terminalne, centralne in C-terminalne domene (slika 6). Na N-terminalno domeno se veže UDP-MurNAc-tripeptid, centralna domena je odgovorna za vezavo ATP, C-terminalna domena pa za vezavo dipeptida D-Ala-D-Ala [20].



Slika 6: Shematični prikaz tridimenzionalne strukture MurF. Rumena barva predstavlja N-terminalno domeno, rdeča centralno domeno in zelena barva C-terminalno domeno. Prirejeno po [23].

1.7.1. Mehanizem encimske reakcije

Vse ligaze Mur imajo enak reakcijski mehanizem (slika 7). Po vezavi UDP-MurNAc-tripeptida na *N*-terminalno domeno encima MurF pride do aktivacije karboksilne kisline z γ -fosfatno skupino molekule ATP. Nastane intermedinat acil fosfat in ADP. Sledi nukleofilni napad amino skupine dipeptida D-Ala-D-Ala na acil fosfat, pri čemer se tvori nestabilen tetraedrični intermedinat, iz katerega dobimo po odcepu fosfata produkt UDP-MurNAc-pentapeptid [22].



Slika 7: Mehanizem reakcije ligaze MurF, prirejeno po [19].

1.7.2. Znani zaviralci MurF

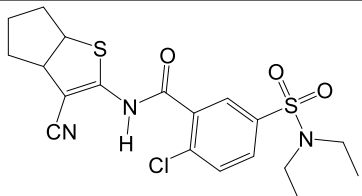
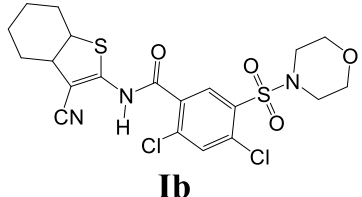
Prvi reverzibilni kompetitivni zaviralci MurF so bile psevdotripeptidne in psevdotetrapeptidne aminoalkilfosfinske kisline, ki so delovale kot mimetiki prehodnega stanja [24]. Zelo vzpodbudno je bilo odkritje zaviralcev s cianotiofensko strukturo, med katere spadata spojini **Ia** in **Ib**, ki sta imeli IC_{50} vrednosti $8 \mu\text{M}$ in $1 \mu\text{M}$ (preglednica I). Z optimizacijo njune strukture so prišli do spojine **Ic**, ki je imela IC_{50} 22 nM . Kljub relativno nizkim vrednostim IC_{50} pa nobena izmed teh spojin tudi v prisotnosti snovi, ki povečajo permeabilnost celice, ni imela merljive protibakterijske aktivnosti. Zaviralno aktivnost teh spojin so testirali na encimu MurF iz bakterije *Streptococcus pneumoniae*, protibakterijsko aktivnost pa na bakterijah *Escherichia coli* in *S. aureus*, zato bi bilo v prihodnosti ustrezno izvesti teste protibakterijske aktivnosti tudi na bakteriji *S. pneumoniae*, da bi dobili odgovore o protibakterijski aktivnosti teh spojin. Pomanjkanje aktivnosti je lahko tudi posledica tega, da se spojine cianotiofenskega strukturnega tipa vežejo neselektivno na druge proteine v notranjosti bakterijskih celic ali pa encim MurF katalizira reakcijsko stopnjo, ki ne omejuje hitrosti v biosintezi peptidoglikana. Z nadaljnjimi strukturnimi modifikacijami spojin **Ib** in **Ic** so dobili serijo nanomolarnih zaviralcev encima MurF iz bakterije *S. pneumoniae* in mikromolarnih zaviralcev MurF iz bakterij *E. coli* in *S. aureus* (spojino **Id**). Nekateri izmed teh zaviralcev so kazali tudi protibakterijsko aktivnost proti *S. pneumoniae*, noben pa ni bil

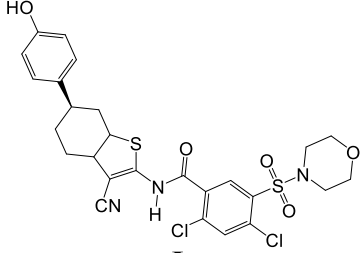
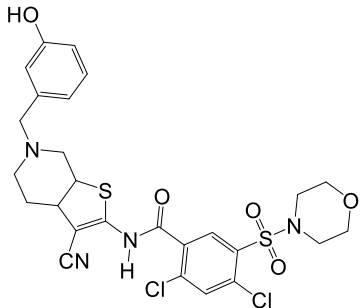
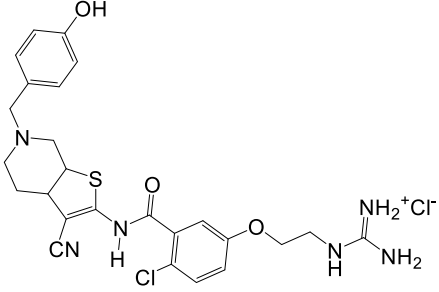
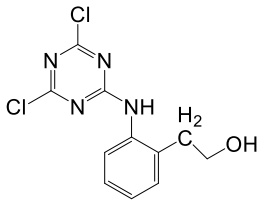
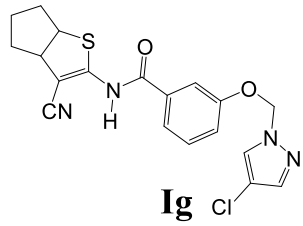
aktiven proti *E. coli* in *S. aureus*. Sledil je razvoj druge generacije cianotiofenskih derivatov, ki so bili v primerjavi s prvo generacijo bolj polarni. Najboljše spojine iz te serije so dobri zaviralci encima MurF iz *S. pneumoniae* in *E. coli* (spojina **Ie**). Spojina **Ie** ima obetavno protibakterijsko aktivnost proti grampozitivnim in gramnegativnim bakterijam, vendar so dokazali, da je vsaj del njenega protibakterijskega delovanja posledica poškodbe celične membrane [25].

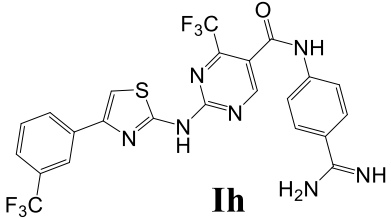
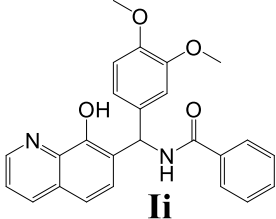
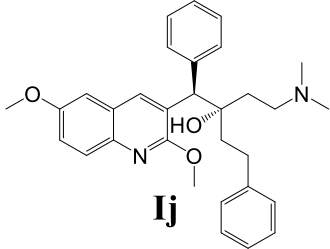
Z virtualnim rešetanjem na osnovi strukture aktivnega mesta MurF in optimizacije spojin zadetkov so odkrili zaviralce iz skupine 1,3,5-triazinov (spojina **If**) [26]. S pomočjo virtualnega rešetanja na osnovi liganda pa so prišli do spojine **Ig**, ki izkazuje mikromolarno aktivnost proti encimu MurF iz *S. pneumoniae* in *E. coli* [27]. Tudi spojine iz serije tiazolilaminopirimidinov so izkazovale dobro aktivnost, najboljši zaviralec, spojina **Ih**, je imela IC₅₀ 2,5 μM. Vendar nobena izmed zgoraj naštetih spojin ni pokazala protibakterijske aktivnosti [28].

Spojina **Ii**, iz serije 8-hidroksikinolinov, je izkazovala dobro aktivnost na MurF iz *E. coli* in dobro protibakterijsko aktivnost [29]. Z optimizacijo na podlagi njenega farmakoforja so prišli do spojine **Ij**, ki dobro zavira encim MurF in izkazuje zelo dobro protibakterijsko delovanje proti bakterijam *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium* in *S. aureus* [30].

Preglednica I: Zaviralci MurF.

Spojina	IC ₅₀	MIC	Vir
 <p style="text-align: center;">Ia</p>	8 μM (<i>E. coli</i> MurF)	nima protibakterijske aktivnosti	[25]
 <p style="text-align: center;">Ib</p>	1 μM (<i>E. coli</i> MurF)	nima protibakterijske aktivnosti	[25]

 <p style="text-align: center;">Ic</p>	<p>22 nM (<i>E. coli</i> MurF)</p>	<p>nima protibakterijske aktivnosti</p>	<p>[25]</p>
 <p style="text-align: center;">Id</p>	<p>420 nM (<i>S.</i> <i>pneumoniae</i> MurF) 81 μM (<i>E. coli</i> MurF) 91 μM (<i>S. aureus</i> MurF)</p>	<p>16 μg/mL (<i>S.</i> <i>pneumoniae</i>)</p>	<p>[25]</p>
 <p style="text-align: center;">Ie</p>	<p>20 μM (<i>S.</i> <i>pneumoniae</i> MurF) 25 μM (<i>E. coli</i> MurF)</p>	<p>4 μg/mL (<i>S.</i> <i>aureus</i>) 64 μg/mL (<i>E. coli</i>)</p>	<p>[25]</p>
 <p style="text-align: center;">If</p>	<p>450 μM (<i>E. coli</i> MurF)</p>	<p>nima protibakterijske aktivnosti</p>	<p>[26]</p>
 <p style="text-align: center;">Ig</p>	<p>126 nM (<i>S.</i> <i>pneumoniae</i> MurF) 56 μM (<i>E. coli</i> MurF)</p>	<p>nima protibakterijske aktivnosti</p>	<p>[27]</p>

 <p>Ih</p>	2,5 μM (<i>E. coli</i> MurF)	nima protibakterijske aktivnosti	[28]
 <p>Ii</p>	16 μM (<i>E. coli</i> MurF)	32 $\mu\text{g/mL}$ (<i>S. aureus</i>)	[29]
 <p>Ij</p>	29 μM (<i>E. coli</i> MurF)	8 $\mu\text{g/mL}$ (<i>S. aureus</i>) 8 $\mu\text{g/mL}$ (<i>E. faecalis</i>) 8 $\mu\text{g/mL}$ (<i>E. faecium</i>)	[30]

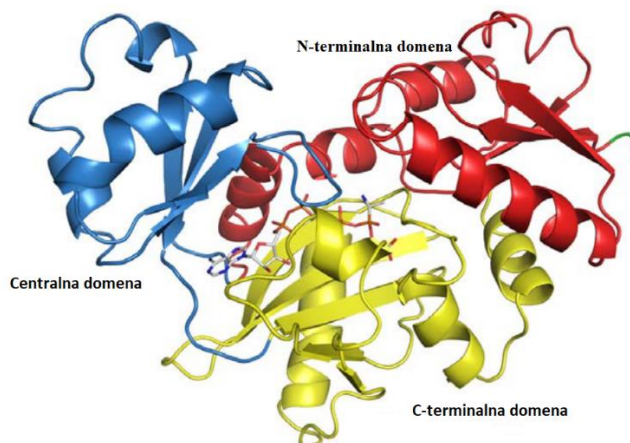
1.8.D-alanil-D-alanin ligaza (Ddl)

Ddl je esencialen encim pri biosintezi peptidoglikana. Katalizira reakcijo dimerizacije D-alanina v dipeptid D-alanil-D-alanin, ki predstavlja terminalni del UDP-MurNAc-pentapeptida in ima ključno vlogo pri premreženju peptidoglikanskih verig. Skupaj z encimoma alanin-racemazo (alr), ki pretvori L-alanin v D-alanin, in MurF ligazo sestavlja D-alaninski segment pri biosintezi peptidoglikana. Zaviranje biosinteze dipeptida bi vodilo v oslabitev bakterijske celične stene in posledično lizo celic, zato predstavlja Ddl privlačno tarčo za nove protibakterijske učinkovine [31, 32].

Ddl za svoje delovanje potrebuje ATP in dva Mg^{2+} kationa. Encim sestavljajo tri domene: C-terminalna, centralna in N-terminalna domena (slika 8). Vezavno mesto za ATP se nahaja med centralno in C-terminalno domeno, bimolekulsko vezavno mesto za D-alanin pa med N-terminalno in C-terminalno domeno. V središču sta dva Mg^{2+} kationa. Obstajata dve izoformi encima Ddl, DdlA in DdlB, ki imata 35 % aminokislinskega zaporedja enakega, izražata pa tudi podobno substratno specifičnost in občutljivost na zaviralce [31].

V nekaterih bakterijah sta dipeptid D-Ala-D-Ala zamenjala depsipeptid D-alanil-D-laktat in dipeptid D-alanil-D-serin. S to prilagoditvijo so bakterije dosegle odpornost na

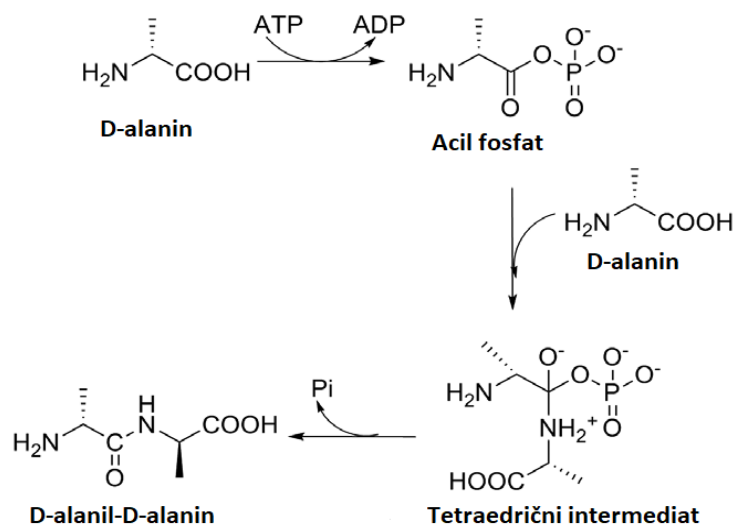
nekatero glikopeptidne antibiotike, med katerimi je najbolj znan vankomicin [19]. V teh bakterijah so se kot nadomestek za Ddl pojavili encimi VanA, VanB in VanC ligaze. VanA in VanB ligaza katalizirata nastanek depsipeptida D-alanil-D-laktat, VanC ligaza pa katalizira nastanek dipeptida D-alanil-D-serin. Poimenovanje Van izhaja iz odpornosti na vankomicin [33].



Slika 8: Tridimenzionalna struktura Ddl v kompleksu z molekulo ADP in fosfonatnim zaviralcem, prirejeno po [34].

1.8.1. Mehanizem encimske reakcije

Kemijski mehanizem nastanka dipeptida D-Ala-D-Ala je dvostopenjski proces (slika 9). V prvi stopnji pride do prenosa γ -fosfatne skupine z molekule ATP na D-alanin, nastane D-alanil fosfatni intermedat. V naslednji stopnji sledi nukleofilni napad amino skupine drugega D-alanina na aktivirano karboksilno skupino prvega D-alanina, nastane nestabilen tetraedrični intermedat. Po eliminaciji fosfata dobimo dipeptid D-Ala-D-Ala. Reakcija poteka po principu negativne povratne zanke, saj produkt D-Ala-D-Ala močno zavira aktivnost Ddl [19].

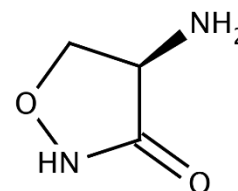


Slika 9: Reakcijski mehanizem encima Ddl, prirejeno po [34].

1.8.2. Znani zaviralci Ddl

Zaviralce encima Ddl lahko razvrstimo v štiri kategorije: analogi D-Ala, analogi reakcijskega produkta, mimetiki prehodnega stanja in novejši zaviralci, odkriti s pomočjo virtualnega rešetanja [34].

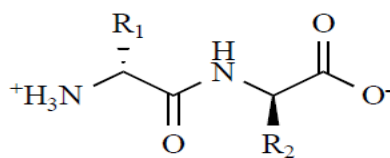
Prvi odkriti in hkrati tudi najpomembnejši zaviralec Ddl je D-cikloserin (slika 10), strukturni analog naravnega substrata, aminokislina D-Ala. D-cikloserin je edini zaviralec Ddl, ki je prišel tudi v klinično uporabo. V kombinaciji z nekaterimi drugimi antibiotiki se je uporabljal za zdravljenje tuberkuloze,



Slika 10: D-cikloserin, prirajeno po [31].

vendar so njegovo uporabo zaradi visoke minimalne inhibitorne koncentracije (MIK) in nevroloških stranskih učinkov skoraj v celoti opustili [34].

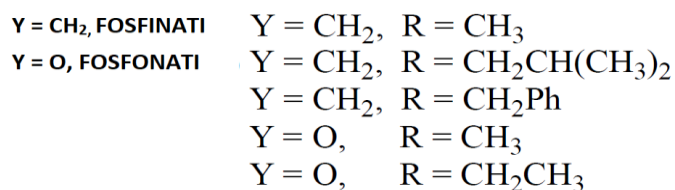
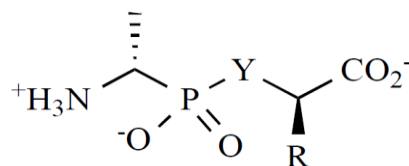
Reakcijski produkt D-Ala-D-Ala močno zavira delovanje encima Ddl, zato so poskušali s sintezo številnih dipeptidnih analogov in nekateri so se izkazali za boljše zaviralce od naravnega reakcijskega produkta (slika 11) [34].



R ₁ = CH ₃	R ₂ = CH ₃	D-Ala-D-Ala	(1.2 mM)
	R ₂ = CH ₂ CH ₃	D-Ala-D-butyr	(0.6 mM)
	R ₂ = (CH ₂) ₂ CH ₃	D-Ala-D-norval	(0.55 mM)
	R ₂ = CH(CH ₃) ₂	D-Ala-D-Val	(2.61 mM)
	R ₂ = CH ₂ OH	D-Ala-D-Ser	(0.91 mM)
	R ₂ = CH(CH ₃)OH	D-Ala-D-Thr	(3.3 mM)
R ₁ = CH ₂ CH ₃	R ₂ = CH ₃	D-butyr-D-Ala	(6 mM)

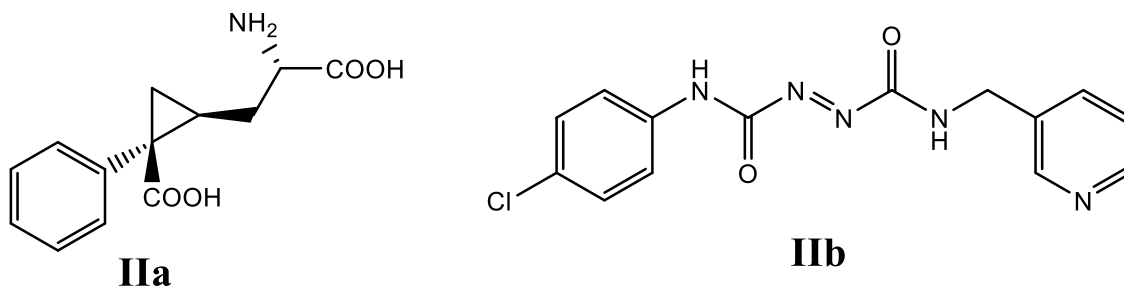
Slika 11: Analogi dipeptida D-Ala-D-Ala. Številke v oklepajih predstavljajo konstanto inhibicije (K_i) za posamezno spojino. Najmočnejši zaviralec med zgoraj naštetimi spojinami je dipeptid D-alanin-D-norvalin. Prirajeno po [35].

Fosfinatni in fosfonatni dipeptidi so mimetiki D-Ala-D-Ala, ki imajo namesto amidne skupine fosfinatno oziroma fosfonatno skupino (slika 12). Spadajo med reverzibilne, kompetitivne zaviralce encima Ddl, ki po vezavi v aktivno mesto stabilizirajo encim v prehodnem stanju. Vendar kljub močnem zaviranju encima Ddl, niso pokazali protibakterijskega delovanja, kar je najverjetneje posledica njihovega slabega prehajanja v notranjost bakterijske celice [36, 37].



Slika 12: Strukturne formule nekaterih fosfinatnih in fosfonatnih dipeptidov, ki spadajo med mimetike prehodnega stanja. Prirejeno po [35].

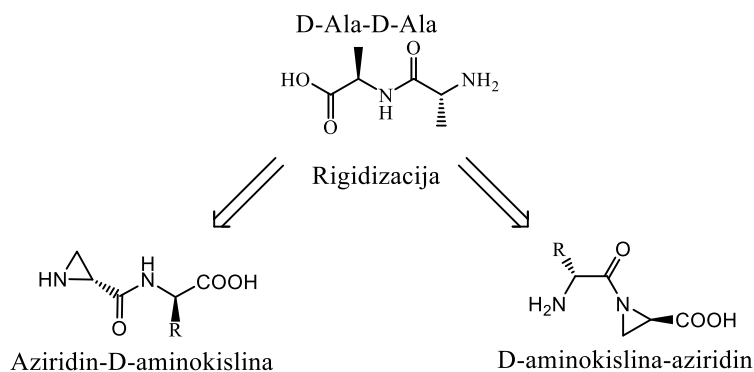
Novejše zaviralce Ddl so odkrili s pomočjo virtualnega reševanja, z reaktanti, produkti ali intermediati encimske reakcije pa ne kažejo nobene strukturne podobnosti (slika 13). Fishwick in sodelavci so leta 2005 sintetizirali ciklopropilni derivat (spojina **IIa**) kot zaviralec DdlB iz *E. coli*. V letu 2007 so Kovač in sodelavci sintetizirali večje število diazendikarboksamidov (spojina **IIb**), med katerimi so nekateri izkazali celo do 30-krat močnejšo inhibicijo DdlB v primerjavi z D-cikloserinom [33, 38].



Slika 13: **IIa** predstavlja ciklopropilni derivat, **IIb** pa diazendikarboksamidni derivat.

2. NAČRT DELA

V okviru magistrske naloge bomo s posnemanjem strukture substratov in produktov encimskih reakcij, ki jih katalizirata encima MurF in Ddl, sintetizirali mimetike dipeptida D-Ala-D-Ala z aziridinskim gradnikom kot potencialne zaviralce teh dveh encimov (slika 14). Sintetizirane spojine bomo ovrednotili z in vitro testi na izoliranih encimih.



Slika 14: Načrt sinteze aziridinov kot mimetikov D-ala-D-ala.

Sintetizirali bomo mimetike aziridin-D-aminokislina in mimetike D-aminokislina-aziridina. Za prve predvidevamo, da bodo bolje zavirali encim MurF, za druge pa, da bodo bolje zavirali Ddl. Mimetiki aziridin-D-aminokislina bi lahko delovali protibakterijsko po dveh različnih mehanizmih. Prva možnost je, da jih bo encim MurF prepoznal kot lasten substrat in bo prišlo po vezavi v aktivno mesto do zaviranja delovanja encima. Pri drugem potencialnem mehanizmu bo encim vgradil mimetik v nastajajoči UDP-MurNAc-pentapeptid, tak gradnik pa ne bo funkcionalen, saj ne bo mogel tvoriti peptidnih mostičkov med verigami peptidoglikana. Potencialno bi lahko aziridinski gradnik znotraj UDP-MurNAc-pentapeptida reagiral tudi s transpeptidazami, saj le-te v aktivnem mestu vsebujejo aminokislino serin. Predvidevamo, da bi lahko prišlo do nukleofilnega napada OH skupine serina na aziridin in posledično do kovalentne inhibicije.

Reakcijski produkt D-Ala-D-Ala močno zavira delovanje encima Ddl, zato bomo z rigidnim mimetikom D-aminokislina-aziridina poskusili doseči še močnejšo inhibicijo encima. Ddl je selektiven predvsem za prvo aminokislino, zato pričakujemo največjo zaviralno aktivnost od mimetikov, ki bodo imeli na prvem mestu aminokislino D-Ala, na drugem mestu pa aziridinski obroč.

3. MATERIALI IN METODE

Za risanje struktur in reakcijskih shem smo uporabili računalniški program ChemDraw Professional 16.0 podjetja Perkin Elmer. Za obdelavo NMR spektrov smo uporabili program NMR notebook podjetja NMRTEC. Vse meritve smo izvedli na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.

3.1. Materiali

V okviru izdelave magistrske naloge smo uporabili kemikalije proizvajalcev Acros Organics, Sigma-Aldrich, Merck, Kemika in Fluka. Brezvodni THF in CH₂Cl₂ smo pripravili tik pred uporabo z destilacijo v argonovi atmosferi. Sintetizirane spojine z aziridinskim gradnikom smo zaradi potencialne nestabilnosti shranjevali v argonovi atmosferi.

3.2. Metode

3.2.1. Kromatografske metode

Za tankoplastno kromatografijo (TLC) smo uporabljali aluminijaste plošče s silikagelom 60 F₂₅₄ (0,25 mm) in plošče z aluminijevim oksidom 60 F₂₅₄ (tip E), oboje od proizvajalca Merck. Za detekcijo spojin na kromatografskih ploščah smo uporabljali UV svetilko ($\lambda = 254$ nm) in orositvena reagenta ninhidrin ter KMnO₄. Uporabljene mobilne faze so navedene pri vsaki spojini posebej.

Za kolonsko kromatografijo smo kot stacionarno fazo uporabljali silikagel 60 (premer delcev: 0,04–0,063 mm) in aluminijev oksid 90 (premer delcev: 0,063–0,200 mm), od proizvajalca Merck. Reverznofazno kolonsko kromatografijo smo izvedli z instrumentom Biotage Isolera™ Prime z UV detektorjem ($\lambda = 220$ nm). Uporabili smo kolono Biotage® SNAP Ultra C18 (velikost delcev: 25 μ m).

HPLC analize smo izvedli na instrumentu HPLC Dionex UltiMate 3000. Uporabili smo tri različne metode:

- Metoda 1: Kolona: Phenomenex Luna® 5 μ m C18 100 Å; volumen injiciranja: 10 μ L; pretok: 1,5 mL/min; detekcija pri $\lambda = 210$ nm, 220 nm, 254 nm in 280 nm; temperatura: 25 °C; mobilna faza: 40 % acetonitrila (ACN) v H₂O do 100 % ACN v 10 minutah, nato 5 minut 100 % ACN.
- Metoda 2: Kolona: Supelco SUPELCOSIL™ LC-1 HPLC; volumen injiciranja: 1 μ L; pretok: 1 mL/min; detekcija pri $\lambda = 195$ nm, 210 nm, 220 nm in 254 nm;

temperatura: 25 °C; mobilna faza: 5 % ACN v fosfatnem pufru (pH = 2,11; c = 20 mM) 10 minut, nato do 60 % ACN v 5 minutah, na koncu še 5 minut 60 % ACN.

- Metoda 3: Kolona: Agilent ZORBAX Extend-C18; volumen injiciranja: 5 µL; pretok: 1 mL/min; detekcija pri $\lambda = 210$ nm, 220 nm, 254 nm in 280 nm; temperatura: 25 °C; mobilna faza: 40 % ACN v H₂O do 100 % ACN v 15 minutah, nato 5 minut 100 % ACN.

3.2.2. Spektroskopske metode

¹H in ¹³C NMR spektre smo posneli z instrumentom Bruker AVANCE III 400 pri 400 oziroma 100 MHz in temperaturi 295 K, s tetrametilsilanom (TMS) kot internim standardom. Uporabljali smo devterirana topila: DMSO-d₆, CDCl₃, D₂O in MeOD. Infrardeče (IR) spektre smo posneli s spektrometrom Perkin Elmer 1600 FTIR 1600. Masni spektri so bili posneti na spektrometru Thermo Scientific Q EXACTIVE PLUS.

3.2.3. Optična sučnost

Optično sučnost spojin smo izmerili s polarimetrom Perkin Elmer 1241MC pri valovni dolžini 589,3 nm v kiveti dolžine 10 cm. Kot topila smo uporabili etilacetat (EtOAc) in metanol (MeOH).

3.2.4. Določanje tališča

Tališča smo sintetiziranim spojinam določili na mikroskopu Cambridge instruments z grelno ploščo Reichert.

3.2.5. Biološka testiranja

Sintetiziranim spojinam smo s testom z malahitno zelenim ovrednotili zaviralno aktivnost na encimih MurF in DdlB. Osnova testa je tvorba fosfomolibdatnega kompleksa med fosfatom, ki nastane pri hidrolizi ATP, in barvilom malahitno zelenim. Kompleks kvantificiramo spektrofotometrično pri valovnih dolžinah 650 nm, saj je pri teh valovnih dolžinah absorbanca kompleksa premo sorazmerna s koncentracijo prostega fosfata. Katalitično aktivnost encimov Ddl in MurF ovrednotimo na podlagi množine prostega fosfata, ki nastane kot stranski produkt pri encimski reakciji. Ob dodatku zaviralca se katalitična aktivnost zniža, zato je množina nastalega fosfata manjša v primerjavi s kontrolo brez zaviralca in posledično je manjša tudi absorbanca. Pri testu lažnega substrata, pa se ob predpostavki, da encim spojino prepozna kot lasten substrat, katalitična aktivnost encima ne spremeni, zato sta množina nastalega fosfata in absorbanca v primerjavi s kontrolo enaki.

Razmere testiranja:

- MurF: 50 mM Hepes (pufer), pH 8,0; 50 mM MgCl₂; 0,005% Triton X-114 (površinsko aktivna snov); 600 μM D-Ala-D-Ala; 500 μM ATP; 100 μM UDP-MurNAc-tripeptid; encim MurF (*E. coli*) in 1 mM posamezne spojine, ki smo jo predhodno raztopili v vodi. Pri testu lažnega substrata smo naredili vse na enak način, le da nismo dodali dipeptida D-Ala-D-Ala, uporabili pa smo tudi višje koncentracije spojin (2,5 mM).
- DdlB: 50 mM Hepes (pufer), pH 8,0; 5 mM MgCl₂; 6,5 mM (NH₄)₂SO₄; 10 mM KCl; 0,005% Triton X-114 (površinsko aktivna snov); 700 μM D-Ala; 500 μM ATP; encim DdlB (*E. coli*) in 2,5 mM posamezne spojine, ki smo jo predhodno raztopili v vodi.

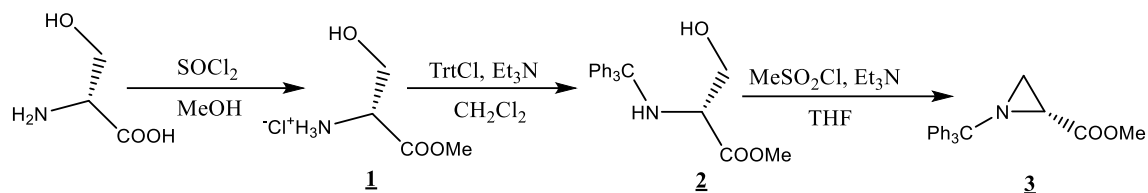
3.2.6. Aparature in laboratorijska oprema

Pri vsakdanjem laboratorijskem delu smo uporabljali rotavapor Buchi, magnetna mešala, laboratorijsko tehtnico Mettler Toledo, analitsko tehtnico Mettler Toledo, membransko vakuumsko črpalko Vacuubrand in standardno laboratorijsko opremo (bučke, čaše, erlenmajerice, spatule, žličke ...).

4. EKSPERIMENTALNI DEL

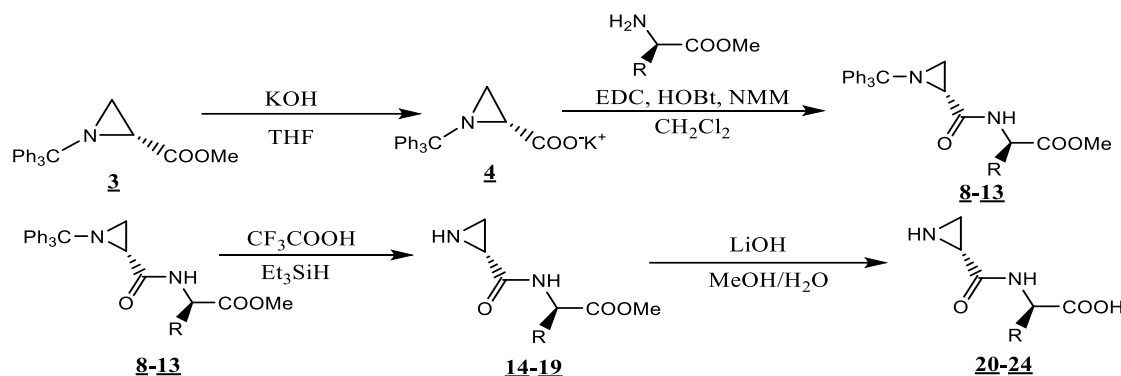
4.1. Sintezni načrt

Pri sintezi smo izhajali iz D-serina, ki smo mu v prvih dveh stopnjah zaščitili karboksilno (**1**) in amino skupino (**2**). Sledila je ciklizacija do osnovnega aziridina (**3**) (slika 15).



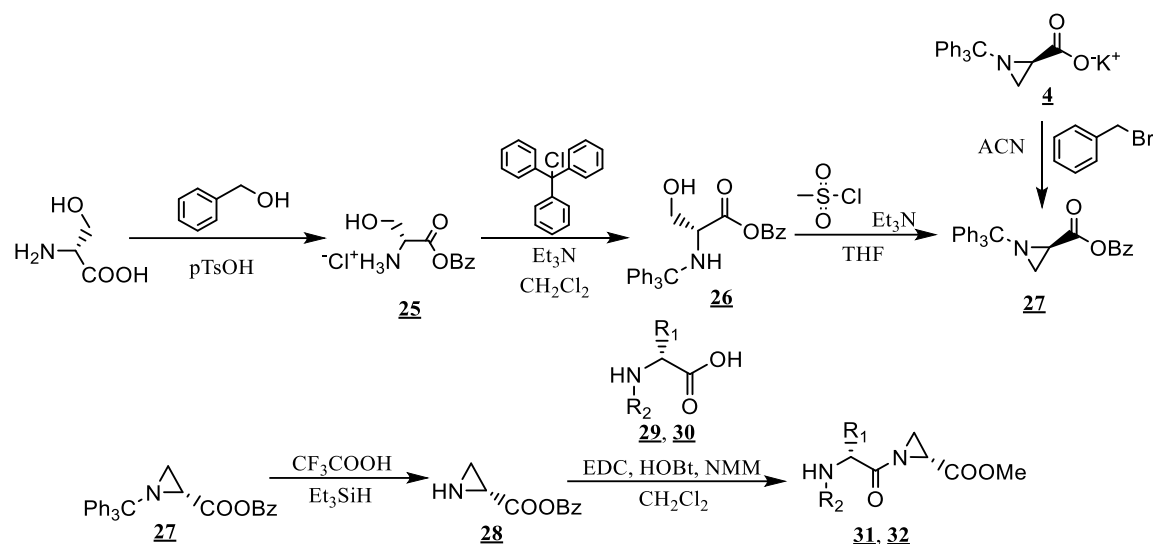
Slika 15: Sinteze aziridina.

Pri sintezi mimetikov aziridin-D-aminokislina smo v prvi stopnji izvedli hidrolizo metilnega estra (**4**) in nato s sklopitvenimi reakcijami na karboksilno kislino vezali različne D-aminokislina (**8–13**). V tretji in četrti stopnji smo najprej odščitili amino (**14–19**) ter nato še karboksilno skupino (**20–24**). Tako smo dobili mimetike D-Ala-D-Ala, ki imajo na prvem mestu aziridinski gradnik, na drugem pa različne D-aminokislina (slika 16).



Slika 16: Sinteze mimetikov aziridin-D-aminokislina.

Pri sintezi mimetikov D-aminokislina-aziridina smo karboksilno skupino zaščitili z benzilnim estrom. Spojino **27** smo pripravili po dveh različnih sinteznih postopkih. Pri prvem smo izhajali iz D-serina, ki smo mu v prvih dveh stopnjah zaščitili karboksilno (**25**) in amino skupino (**26**), nato pa izvedli ciklizacijo do aziridina (**27**). Pri drugem sinteznem postopku smo izhajali iz spojine **4**, ki smo ji prosto karboksilno skupino zaščitili z benzilnim estrom s pomočjo BzBr in tako dobili spojino **27**. V naslednjih stopnjah smo izvedli odščito tritilne skupine (**28**) ter nato na aziridinski amin pripeli D-aminokislina, ki smo jim predhodno zaščitili amino skupino, ter tako dobili produkta **31** in **32** (slika 17). V naslednjih dveh stopnjah smo poskusili odstraniti obe zaščitni skupini in tako dobiti produkt D-aminokislina-aziridin, vendar reakcije niso bile uspešne.



Slika 17: Načrt sinteze mimetikov D-aminokislina-aziridina.

4.2. Splošni sintezni postopki

4.2.1. Sintezni postopek A (reakcijski postopek za sintezo metilnih estrov)

Izhodno spojino (1,00 ekv) smo raztopili v MeOH in raztopino postavili na ledeno kopel. Ohlajeni reakcijski zmesi smo po kapljicah dodajali SOCl_2 . Po dodatku celotne količine SOCl_2 smo reakcijsko zmes segreli do temperature refluxa ($80\text{ }^\circ\text{C}$) in jo pustili refluktirati. Po končani reakciji (potek smo spremljali s TLC) smo raztopino skoncentrirali pod znižanim tlakom, dodali dietil eter (da se znebimo HCl) in topilo uparili pod znižanim tlakom.

4.2.2. Sintezni postopek B (reakcijski postopek sklopitvenih reakcij)

Izhodno spojino (1,00 ekv) smo raztopili v CH_2Cl_2 , dodali zaščiteno D-aminokislino (1,10 oziroma 1,00 ekv) in postavili reakcijsko zmes na ledeno kopel. Ohlajeni reakcijski zmesi smo dodali HOBt (1,10 ekv), NMM (3,00 ekv) in na koncu EDC (1,10 ekv). Reakcijsko zmes smo čez noč pustili mešati na ledeni kopeli (temperatura reakcijske zmesi je postopoma dosegla sobno temperaturo). Po zaključku reakcije (potek smo spremljali s TLC) smo naredili ekstrakcijo z 10-odstotno citronsko kislino ($3 \times 50\text{ mL}$), nasičeno raztopino NaHCO_3 ($3 \times 50\text{ mL}$) in nasičeno raztopino NaCl ($1 \times 50\text{ mL}$). Organsko fazo smo sušili nad brezvodnim Na_2SO_4 , sušilno sredstvo filtrirali in filtratu uparili topilo pod znižanim tlakom.

4.2.3. Sintezni postopek C (reakcijski postopek odščite tritilne skupine)

Izhodno spojino (1,00 ekv) smo raztopili v CH_2Cl_2 in raztopino postavili na ledeno kopel. Ohlajeni reakcijski zmesi smo dodali trietilsilan (1,75 ekv) in po kapljicah CF_3COOH (3,50 ekv). Reakcijsko zmes smo mešali 30 minut pri temperaturi $0\text{ }^\circ\text{C}$. Po koncu reakcije

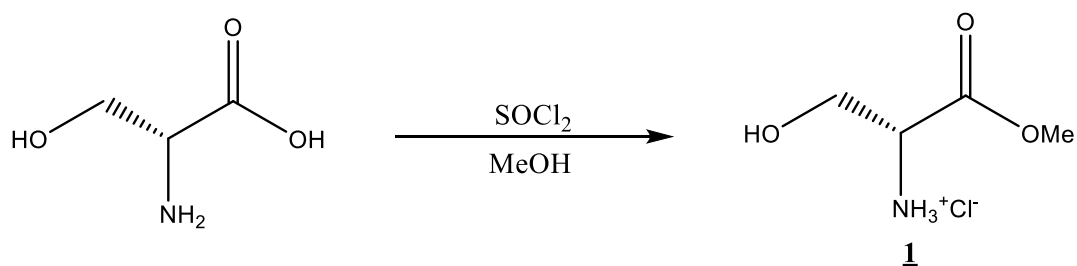
(potek smo spremljali s TLC) smo uparili topilo pod znižanim tlakom ter ekstrahirali trdni preostanek z dietil etrom (25 mL) in vodo (25 mL). Vodni fazi smo najprej dodali NaHCO₃, da smo dobili raztopino s pH 10. Za zmanjšanje topnosti produkta (izsoljevanje) smo dodali še NaCl, nato pa vodno fazo ekstrahirali z EtOAc (6 × 25 mL). Zbrane organske faze smo ekstrahirali z nasičeno vodno raztopino NaCl (1 × 50 mL), jih sušili nad brezvodnim Na₂SO₄, sušilno sredstvo filtrirali in filtratu uparili topilo pod znižanim tlakom.

4.2.4. Sintezni postopek D (reakcijski postopek odščite metilnih estrov)

Izhodno spojino (1,00 ekv) smo raztopili v MeOH in raztopino postavili na ledeno kopel. Ohlajeni reakcijski zmesi smo s pomočjo kapalnika po kapljicah dodajali 0,1-molarno raztopino LiOH (5,00 ekv). Po poteku reakcije smo uravnali pH reakcijske zmesi na pH = 7 z 0,1-molarno raztopino HCl in uparili topilo pod znižanim tlakom. pH smo uravnali zato, da smo produkt pretvorili v ion dvojček, saj je v tej obliki najbolj stabilen.

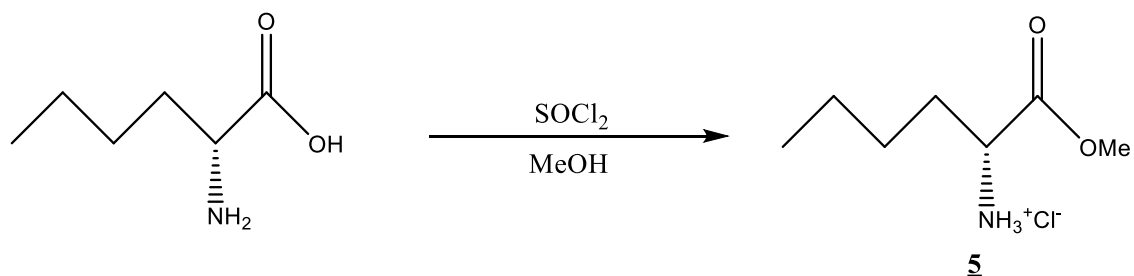
4.3. Sinteza prve serije spojin (aziridin-D-aminokislina)

4.3.1. Sinteza (*R*)-3-hidroksi-1-metoksi-1-oksopropan-2-aminijevega klorida (**1**)



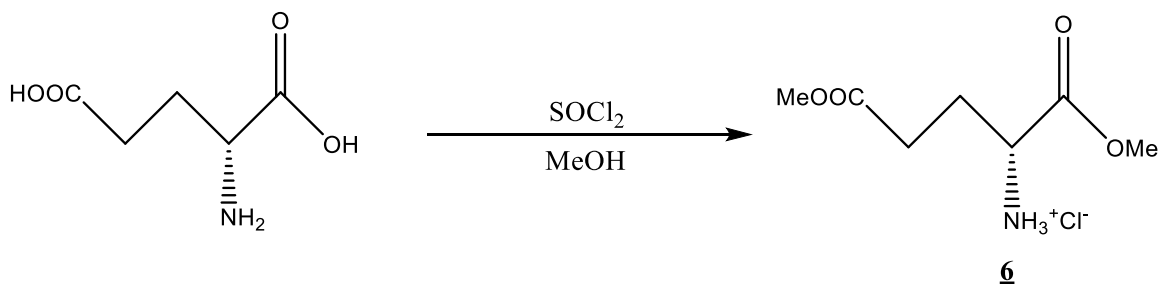
Spojino **1** smo sintetizirali po sinteznem postopku **A**. Uporabili smo: izhodno spojino D-serin (20,00 g; 190,3 mmol; 1,00 ekv), MeOH (500 mL) in SOCl₂ (24,90 mL; 342,6; 1,80 ekv). Reakcijske zmesi nismo segreli do temperature refluxa ampak smo jo čez noč pustili mešati na ledeni kopeli (temperatura reakcijske zmesi je postopoma dosegla sobno temperaturo). Izolirali smo 28,95 g produkta v obliki svetlo rjavih kristalov. **Izkoristek:** 97,78 %. **Rf:** 0,11 (MF: CH₂Cl₂: MeOH = 7 : 1 + 3 % Et₃N). **Temperatura tališča:** 163,1–164,0 °C.

4.3.2. Sinteza (*R*)-1-metoksi-1-oksoheksan-2-aminijevega klorida (**5**)



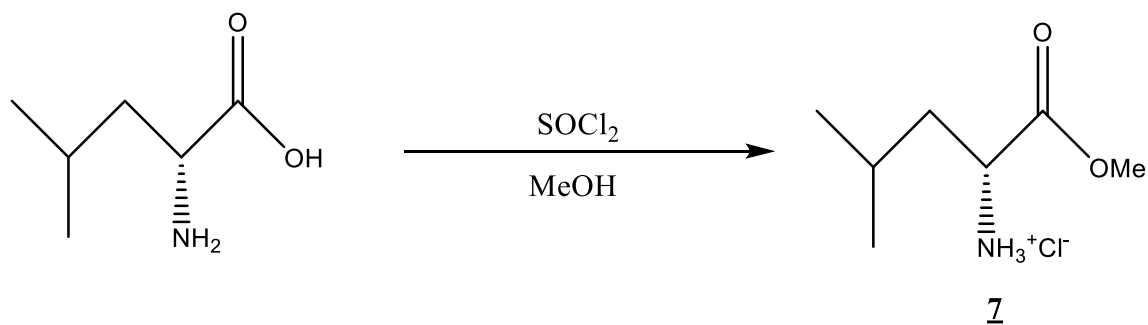
Spojino **5** smo sintetizirali po sinteznem postopku **A**. Uporabili smo: izhodno spojino D-norlevcin (1,00 g; 7,62 mmol; 1,00 ekv), MeOH (50 mL) in SOCl₂ (829 μL; 11,4 mmol; 1,50 ekv). Po dodatku celotne količine SOCl₂ smo reakcijsko zmes segreli do temperature refluxa (80 °C) in jo čez noč pustili refluktirati. Izolirali smo 1,37 g belih kristalov. **Izkoristek:** 98,9 %. **Rf:** 0,69 (MF: EtOAc : MeOH : H₂O = 4 : 2 : 1). **Temperatura tališča:** 116,0–119,0 °C.

4.3.3. Sinteza (*R*)-1,5-dimetoksi-1,5-dioksoptan-2-aminijevega klorida (**6**)

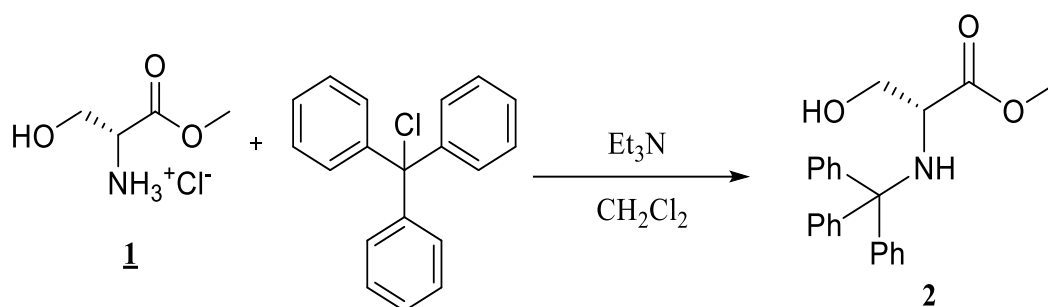


Spojino **6** smo sintetizirali po sinteznem postopku **A**. Uporabili smo: izhodno spojino D-glutaminsko kislino (1,00 g; 6,80 mmol; 1,00 ekv), MeOH (50 mL) in SOCl₂ (1,48 mL; 20,4 mmol; 3,00 ekv). Reakcija je potekla po štirih urah. Izolirali smo 1,39 g prozornega viskoznega olja, ki se je čez noč strdilo v bele kristale. **Izkoristek:** 96,6 %. **Rf:** 0,51 (MF: EtOAc : MeOH : H₂O = 4 : 2 : 1). **Temperatura tališča:** 90,0–93,0 °C.

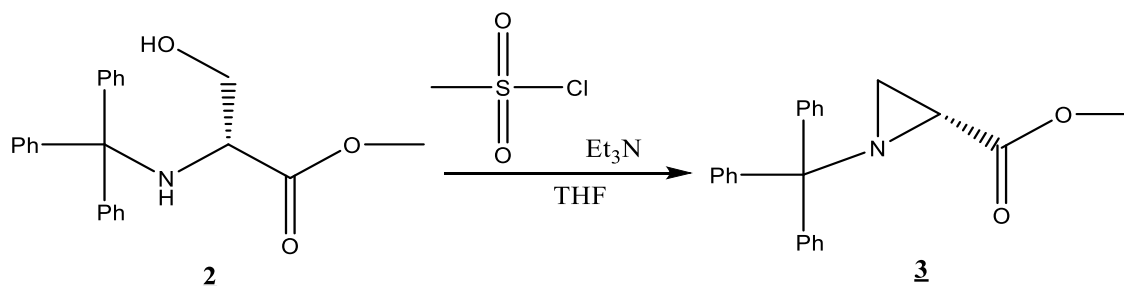
4.3.4. Sinteza (*R*)-1-metoksi-4-metil-1-oksopentan-2-aminijev klorid (**7**)



Spojino **7** smo sintetizirali po sinteznem postopku **A**. Uporabili smo: izhodno spojino D-levcin (1,00 g; 7,62 mmol; 1,00 ekv), MeOH (50 mL) in SOCl₂ (829 μL; 11,4 mmol; 1,50 ekv). Reakcija je potekla po štirih urah. Izolirali smo 1,38 g snežno belih kristalov. **Izkoristek:** 99,4 %. **Rf:** 0,60 (MF: EtOAc : MeOH : H₂O = 4 : 2 : 1). **Temperatura tališča:** 146,2–148,1 °C.

4.3.5. Sinteza metil tritil-D-serinata (**2**)

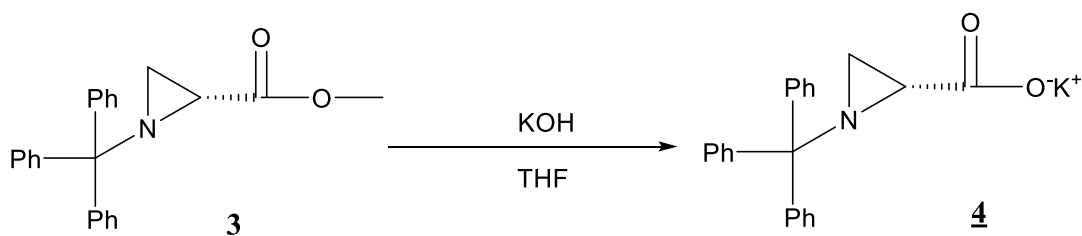
Izhodno spojino **1** (29,27 g; 188,1 mmol; 1,00 ekv) smo raztopili v CH_2Cl_2 (500 mL), ji dodali Et_3N (55,10 mL; 396,1 mmol; 2,11 ekv), preverili pH, ki je bil bazičen, in zmes postavili na ledeno kopel ter počakali, da se ohladi. Nato smo dodali tritil klorid (52,45 g, 188,1 mmol; 1,00 ekv) in mešali dve uri pri 0°C (potek reakcije smo spremljali s TLC). Po poteku reakcije smo organsko fazo ekstrahirali z 10-odstotno citronsko kislino (3×150 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (150 mL). Organsko fazo smo sušili nad brezvodnim Na_2SO_4 , jo filtrirali in filtratu uparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: heksan : EtOAc = 2 : 1). Izolirali smo gosto viskozno zmes, ki se je čez noč strdila v belo praškasto snov (55,70 g). **Izkoristek:** 81,92 %. **Rf:** 0,27 (MF: heksan : EtOAc = 2 : 1). **$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):** δ 2.29 (dd, $J = 6.2$ Hz, 6.0 Hz 1H, OH), 2.97 (bs, 1H, NH), 3.30 (s, 3H, CH_3), 3.50–3.61 (m, 2H, $\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}$ in CH), 3.65–3.75 (m, 1H, $\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}$), 7.16–7.32 (m, 9H, CPh_3), 7.43–7.51 (m, 6H, CPh_3) ppm. **Temperatura tališča:** $143,8\text{--}146,5^\circ\text{C}$.

4.3.6. Sinteza metil(R)-1-tritilaziridin-2-karboksilata (**3**)

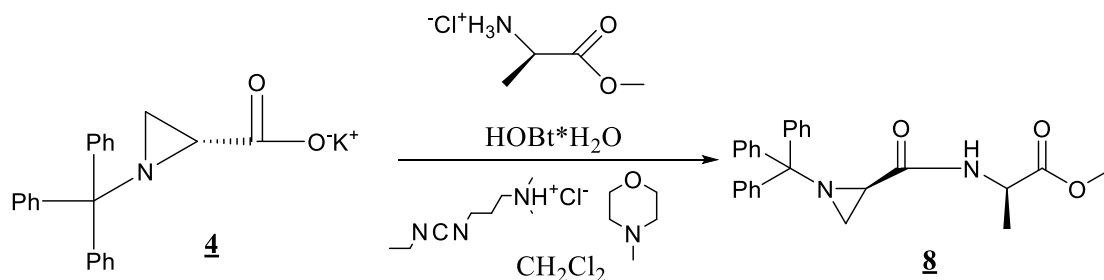
Metil tritil-D-serinat (**2**; 5,01 g; 13,9 mmol; 1,00 ekv) smo raztopili v brezvodnem THF (40 mL), po delih dodali Et_3N (4,25 mL; 30,5 mmol; 2,20 ekv) in reakcijsko zmes ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodajali metansulfonil klorid (1,08 mL; 14,0 mmol; 1,01 ekv) in pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Temperaturo smo nato dvignili na 65°C (temperatura refluxa) in refluktirali 48 ur. Po zaključku reakcije (potek smo spremljali s TLC) smo uparili topilo pod znižanim tlakom, trdni preostanek raztopili v

EtOAc (40 mL) in ekstrahirali z 10-odstotno citronsko kislino (3×10 mL), nasičeno raztopino NaHCO_3 (3×10 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (1×10 mL). Organsko fazo smo sušili nad brezvodnim Na_2SO_4 , sušilno sredstvo filtrirali in filtratu uparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: heksan : EtOAc = 4 : 1). Izolirali smo 3,42 g belih kristalov. Kemijski premiki in sklopitvene konstante signalov se ujemajo s podatki iz literature [39]. **Izkoristek:** 71,9 %. **Rf:** 0,36 (MF: EtOAc = 4 : 1). **$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):** δ 1.41 (dd, $J = 6.3$ Hz, 1.7 Hz, 1H, CH_AH_B), 1.89 (dd, $J = 6.3$ Hz, 2.7 Hz, 1H, CH), 2.26 (dd, $J = 2.7$ Hz, 1.7 Hz, 1H, CH_AH_B), 3.76 (s, 3H, CH_3), 7.19–7.31 (m, 9H, CPh_3), 7.47–7.52 (m, 6H, CPh_3) ppm. **IR (ATR):** ν 3705, 3467, 2973, 1742, 1596, 1489, 1445, 1394, 1328, 1234, 1181, 1011, 893, 843, 756, 697 cm^{-1} . **Temperatura tališča:** 127,0–128,0 $^\circ\text{C}$.

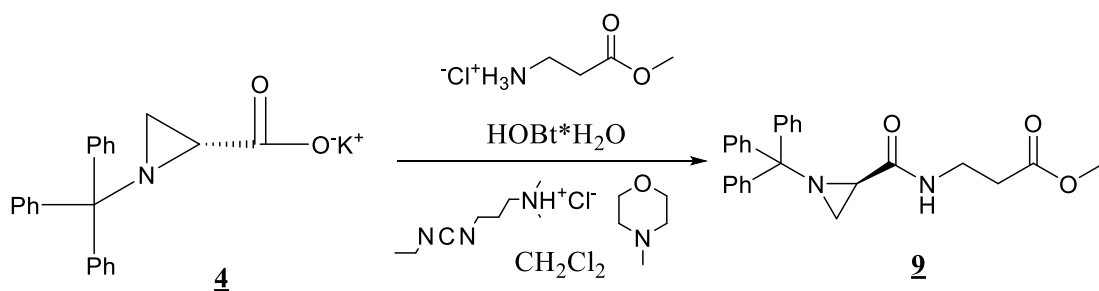
4.3.7. Sinteza kalijevega (*R*)-1-tritilaziridin-2-karboksilata (**4**)



Izhodno spojino **3** (5,78 g; 16,8 mmol; 1,00 ekv) smo raztopili v THF-u (17 mL) in postavili raztopino na ledeno kopel. Ohlajeni reakcijski zmesi smo dodali 1-molarno raztopino KOH (16,84 mL; 16,84 mmol; 1,00 ekv) in jo pustili mešati 24 ur (temperatura reakcijske zmesi je postopoma dosegla sobno temperaturo). Po zaključku reakcije (potek spremljamo s TLC) smo odstranili topilo pod znižanim tlakom. Ekstrakcije nismo delali, ker je produkt v obliki kisline nestabilen (stabilen je v obliki soli). Izolirali smo 6,15 g svetlorumenih kristalov. **Izkoristek:** 99,4 %. **Rf:** 0,30 (MF: heksan : EtOAc = 1 : 1 + CH_3COOH). **$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):** δ 1.80–1.88 (m, 2H, CH_2), 3.71–3.78 (m, 1H, CH), 7.18–7.33 (m, 15H, CPh_3) ppm. **$^{13}\text{C NMR}$ (100 MHz, CDCl_3):** δ 28.82, 34.95, 74.28, 126.67–128.36 (signali se prekrivajo), 129.51, 144.32, 178.15 ppm. **MS (ESI):** 327,7 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100 %). **IR (ATR):** ν 3366, 3060, 2972, 2167, 1960, 1580, 1488, 1423, 1325, 1217, 1155, 1057, 1013, 900, 847, 750, 699 cm^{-1} . **Temperatura tališča:** Termični razpad pri $T > 250,0$ $^\circ\text{C}$. **Specifična sučnost:** $[\alpha]_D^{20} = +184,0$ (0,31; EtOAc).

4.3.8. Sinteza metil ((*R*)-1-tritilaziridin-2-karbonil)-*D*-alaninata (**8**)

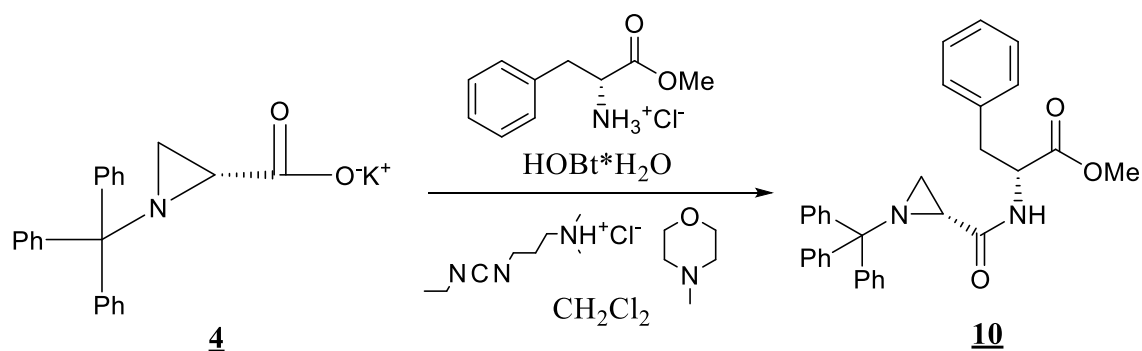
Spojino **8** smo sintetizirali po sinteznem postopku **B**. Uporabili smo: izhodno spojino **4** (2,00 g; 5,44 mmol; 1,00 ekv), CH₂Cl₂ (55 mL), metilni ester *D*-alanina (836 mg; 5,99 mmol; 1,10 ekv), HOBt (917 mg; 5,99 mmol; 1,10 ekv), NMM (1,80 mL; 16,3 mmol; 3,00 ekv) in EDC (1,15 g; 5,99 mmol; 1,10 ekv). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot začetno MF smo uporabili CH₂Cl₂ : heksan = 2 : 1 in jo postopoma zamenjali za heksan : EtOAc = 1 : 1. Izolirali smo 1,198 g belih kristalov. **Izkoristek**: 53,11 %. **Rf**: 0,48 (MF: heksan : EtOAc = 1 : 1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 1.44–1.51 (m, 4H, CHCH₃ in aziridinski CH_AH_B), 1.98–2.02 (m, 2H, aziridinski CH in aziridinski CH_AH_B), 3.81 (s, 3H, OCH₃), 4.69 (qd, *J* = 7.5 Hz, 7.2 Hz, 1H, NHCH₃), 7.20–7.34 (m, 10H, CPh₃ in CONH), 7.41–7.48 (m, 6H, CPh₃) ppm. **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)**: δ 18.79, 30.12, 34.17, 47.61, 52.79, 74.82, 127.34, 128.00, 129.60, 143.45, 170.74, 173.46 ppm. **MS (ESI)**: 436,85 ([M+Na]⁺, 100 %); 412,89 ([M-H]⁻, 20 %). **IR (ATR)**: ν 3705, 3293, 2972, 2869, 1746, 1645, 1532, 1491, 1448, 1359, 1276, 1206, 1165, 1056, 1009, 956, 905, 857, 771, 747, 703 cm⁻¹. **Temperatura tališča**: 146,0–150,2 °C. **HPLC**: Metoda 1; t_r: 6,25 min (93,3 % pri 220 nm). **Specifična sučnost**: [α]_D²⁰ = +132,1 (0,33; EtOAc).

4.3.9. Sinteza metil (*R*)-3-(1-tritilaziridin-2-karboksamido) propanoata (**9**)

Spojino **9** smo sintetizirali po sinteznem postopku **B**. Uporabili smo: izhodno spojino **4** (1,75 g; 4,76 mmol; 1,00 ekv), CH₂Cl₂ (50 mL), metilni ester β-alanina (664 mg; 4,76 mmol; 1,00 ekv), HOBt (801 mg; 5,23 mmol; 1,10 ekv), NMM (1,57 mL; 14,3 mmol; 3,00 ekv) in EDC (1,00 g; 5,23 mmol; 1,10 ekv). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot začetno MF smo uporabili heksan : EtOAc = 2 : 1 in jo postopoma

zamenjali za heksan : EtOAc = 1 : 1. Izolirali smo 1,24 g brezbarvne viskozne tekočine, ki se je čez noč strdila v bele kristale. **Izkoristek:** 62,9 %. **Rf:** 0,32 (MF: heksan : EtOAc = 1 : 1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 1.45 (dd, *J* = 6.6 Hz, 0.7 Hz, 1H, aziridinski CH_AH_B), 1.96 (dd, *J* = 2.7 Hz, 0.7 Hz, 1H, aziridinski CH_AH_B), 1.99 (dd, *J* = 6.6 Hz, 2.7 Hz, 1H, aziridinski CH), 2.57–2.71 (m, 2H, NHCH₂CH₂COO), 3.44–3.55 (m, 1H, NHCH_AH_BCH₂COO), 3.65–3.79 (m, 4H, NHCH_AH_BCH₂COOCH₃), 7.20–7.30 (m, 9H, CPh₃), 7.33 (dd, *J* = 6.2 Hz, 6.2 Hz, 1H, CONH), 7.38–7.44 (m, 6H, CPh₃) ppm. **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 29.94, 34.15, 34.29, 34.61, 52.10, 74.73, 127.30, 127.91, 129.48, 143.47, 171.12, 172.99 ppm. **MS (ESI):** 436,7 ([M+Na]⁺, 100 %); 412,5 ([M-H]⁻, 100 %). **IR (ATR):** ν 3706, 3333, 2949, 1733, 1663, 1522, 1442, 1365, 1256, 1180, 1059, 1009, 901, 858, 749, 702 cm⁻¹. **Temperatura tališča:** 50,0–52,0 °C. **HPLC:** Metoda 1; t_r: 5,69 min (99,4 % pri 220 nm). **Specifična sučnost:** [α]_D²⁰ = +109,4 (0,33; EtOAc).

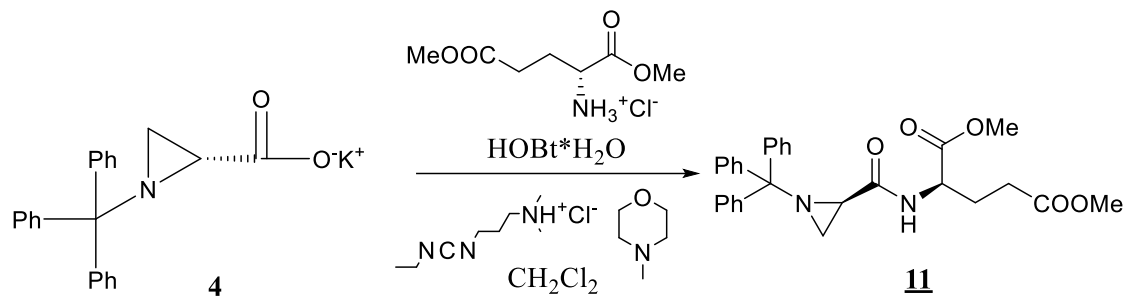
4.3.10. Sinteza metil ((*R*)-1-tritilaziridin-2-karbonil)-*D*-fenilalaninata (**10**)



Spojino **10** smo sintetizirali po sinteznem postopku **B**. Uporabili smo: izhodno spojino **4** (1,76 g; 4,80 mmol; 1,00 ekv), CH₂Cl₂ (50 mL), metilni ester *D*-fenilalanina (1,04 g; 4,80 mmol; 1,00 ekv), HOBt (809 mg; 5,28 mmol; 1,10 ekv), NMM (1,58 mL; 14,4 mmol; 3,00 ekv) in EDC (1,01 g; 5,28 mmol; 1,10 ekv). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: heksan : EtOAc = 2 : 1). Izolirali smo 1,480 g belih kristalov. **Izkoristek:** 62,81 %. **Rf:** 0,23 (MF: heksan : EtOAc = 2 : 1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 1.37 (dd, *J* = 6.7 Hz, 0.7 Hz, 1H, aziridinski CH_AH_B), 1.69 (dd, *J* = 2.7 Hz, 0.7 Hz, 1H, aziridinski CH_AH_B), 1.95 (dd, *J* = 6.7 Hz, 2.7 Hz, 1H, aziridinski CH), 3.18 (dd, *J* = 13.9 Hz, 6.2 Hz, 1H, CHCH_CH_DPh), 3.21 (dd, *J* = 13.9 Hz, 6.0 Hz, 1H, CHCH_CH_DPh), 3.80 (s, 3H, OCH₃), 4.93 (ddd, *J* = 8.7 Hz, 6.2 Hz, 6.0 Hz, 1H, CHCH_CH_DPh), 7.15–7.39 (m, 21H, CPh₃, CH_CH_DPh in CONH) ppm. **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 30.04, 33.99, 38.06, 52.08, 52.66, 74.64, 127.25, 127.50, 127.90 (se delno prekrivajo), 128.91, 129.46, 135.98, 143.35, 170.54, 171.99 ppm. **MS (ESI):** 488,6 ([M-H]⁻, 100 %). **IR (ATR):** ν 3709, 3360, 3281,

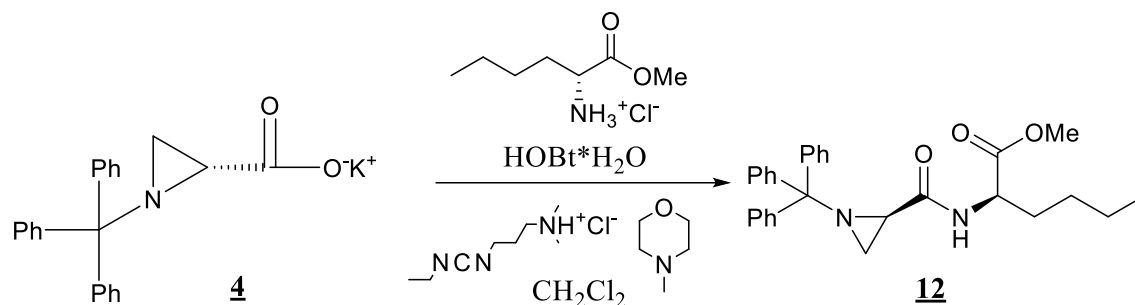
2974, 2037, 1743, 1679, 1596, 1501, 1446, 1356, 1277, 1197, 1164, 1129, 1057, 1009, 903, 858, 808, 748, 703 cm^{-1} . **Temperatura tališča:** 105,5–107,0 °C. **HPLC:** Metoda 1; t_r : 7,69 min (99,5 % pri 220 nm). **Specifična sučnost:** $[\alpha]_D^{20} = +74,9$ (0,31; EtOAc).

4.3.11. Sinteza dimetil ((*R*)-1-tritilaziridin-2-karbonil)-*D*-glutamata (**11**)



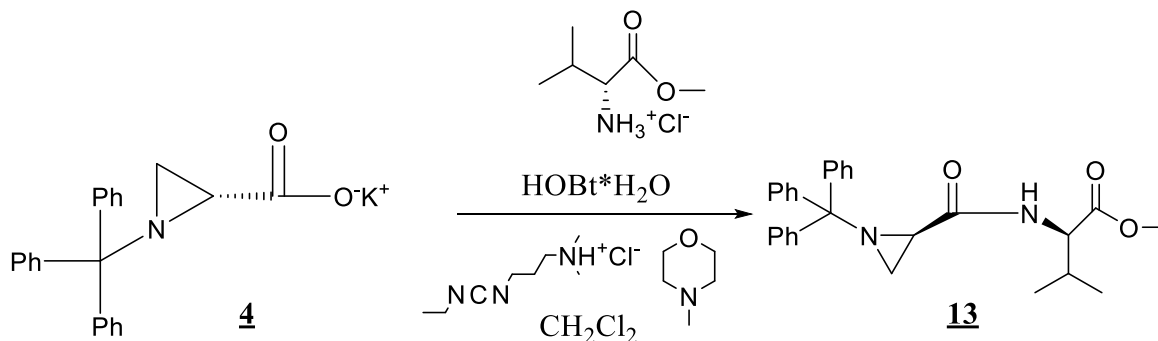
Spojino **11** smo sintetizirali po sinteznem postopku **B**. Uporabili smo: izhodno spojino **4** (1,76 g; 4,78 mmol; 1,00 ekv), CH₂Cl₂ (50 mL), dimetilni ester *D*-glutaminske kisline (**6**, 1,01 mg; 4,78 mmol; 1,00 ekv), HOBT (805 mg; 5,26 mmol; 1,10 ekv), NMM (1,58 mL; 14,3 mmol; 3,00 ekv) in EDC (1,01 g; 5,26 mmol; 1,10 ekv). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: heksan : EtOAc = 2 : 1). Izolirali smo 555 mg belih kristalov. **Izkoristek:** 23,9 %. **Rf:** 0,23 (MF: heksan : EtOAc = 2 : 1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 1.49 (dd, $J = 6.0$ Hz, 1.5 Hz, 1H, aziridinski CH_AH_B), 1.96–2.00 (m, 2H, aziridinska CH_AH_B in aziridinski CH), 2.05–2.16 (m, 1H, CHCH_CH_DCH₂), 2.23–2.34 (m, 1H, CHCH_CH_DCH₂), 2.36–2.54 (m, 2H, CHCH_CH_DCH₂), 3.67 (s, 3H, CH₂COOCH₃), 3.82 (s, 3H, CHCOOCH₃), 4.68 (ddd, $J = 8.3$ Hz, 8.3 Hz, 5.1 Hz, 1H, CHCOOCH₃), 7.21–7.32 (m, 9H, CPh₃), 7.44–7.50 (m, 7H, CPh₃ in CONH) ppm. **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 27.30, 30.05, 30.37, 34.13, 51.44, 52.13, 52.82, 74.84, 127.29, 127.95, 129.59, 143.44, 171.33, 172.23, 173.59 ppm. **MS (ESI):** 508,7 ([M+Na]⁺, 80 %); 484,5 ([M-H]⁻, 70 %). **IR (ATR):** ν 3696, 3362, 3059, 2956, 2068, 1977, 1738, 1670, 1596, 1509, 1441, 1373, 1344, 1312, 1205, 1181, 1129, 1098, 1065, 1013, 904, 869, 820, 768, 747, 705 cm^{-1} . **Temperatura tališča:** 136,5–137,5 °C. **HPLC:** Metoda 1; t_r : 6,33 min (100,0 % pri 220 nm). **Specifična sučnost:** $[\alpha]_D^{20} = +119,4$ (0,32; EtOAc).

4.3.12. Sinteza metil (*R*)-2-((*R*)-1-tritilaziridin-2-karboksamido) heksanoata (**12**)



Spojino **12** smo sintetizirali po sinteznem postopku **B**. Uporabili smo: izhodno spojino **4** (1,75 g; 4,76 mmol; 1,00 ekv), CH₂Cl₂ (50 mL), metilni ester D-norlevcina (**5**, 864 mg; 4,76 mmol; 1,00 ekv), HOBt (801 mg; 5,23 mmol; 1,10 ekv), NMM (1,57 mL; 14,3 mmol; 3,00 ekv) in EDC (1,00 g; 5,23 mmol; 1,10 ekv). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: heksan : EtOAc = 4 : 1). Izolirali smo 1,42 g belih kristalov. **Izkoristek**: 65,5 %. **Rf**: 0,26 (MF: heksan : EtOAc = 4 : 1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 0.92 (t, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH₂CH₃), 1.27–1.43 (m, 4H, CH₂CH₂CH₃), 1.50 (dd, *J* = 6.2 Hz, 1.2 Hz, 1H, aziridinski CH_AH_B), 1.67–1.81 (m, 1H, CHCH_CH_DCH₂CH₂), 1.85–1.96 (m, 1H, CHCH_CH_DCH₂CH₂), 1.98–2.02 (m, 2H, aziridinski CH_AH_B in aziridinski CH), 3.81 (s, 3H, COOCH₃), 4.62–4.71 (m, 1H, CHCOOCH₃), 7.21–7.33 (m, 10H, CPh₃ in CONH), 7.42–7.48 (m, 6H, CPh₃) ppm. **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃)**: δ 14.15, 22.51, 27.72, 30.24, 32.49, 34.20, 51.68, 52.63, 74.81, 127.32, 127.97, 129.57, 143.45, 170.82, 173.04 ppm. **MS (ESD)**: 478,7 ([M+Na]⁺, 50 %); 454,6 ([M-H]⁻, 100 %). **IR (ATR)**: ν 3364, 2955, 1741, 1671, 1512, 1445, 1345, 1209, 1152, 1010, 905, 861, 749, 702 cm⁻¹. **Temperatura tališča**: 46,5–47,4 °C. **HPLC**: Metoda 1; t_r: 7,87 min (100,0 % pri 220 nm). **Specifična sučnost**: [α]_D²⁰ = +173,7 (0,36; EtOAc).

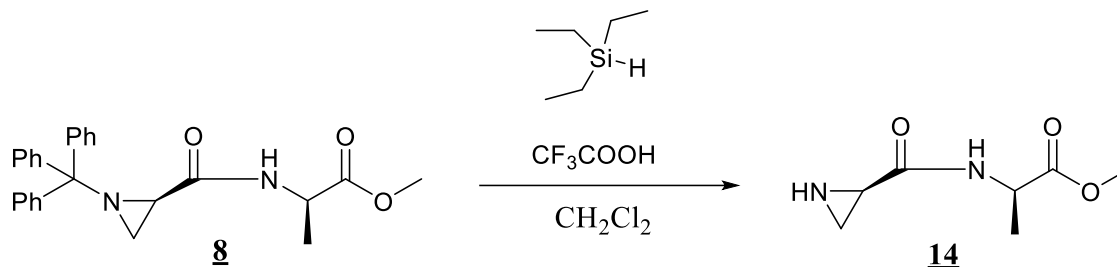
4.3.13. Sinteza metil ((*R*)-1-tritilaziridin-2-karbonil)-D-valinata (**13**)



Spojino **13** smo sintetizirali po sinteznem postopku **B**. Uporabili smo: izhodno spojino **4** (1,50 g; 4,08 mmol; 1,00 ekv), CH₂Cl₂ (45 mL), metilni ester D-valina (**7**, 683 mg;

4,08 mmol; 1,00 ekv), HOBt (687 mg; 4,48 mmol; 1,10 ekv), NMM (1,34 mL; 12,2 mmol; 3,00 ekv) in EDC (860 mg; 4,48 mmol; 1,10 ekv). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo. Kot MF smo na začetku uporabili heksan : EtOAc = 4 : 1, nato pa gradientno prešli v heksan : EtOAc = 3 : 1. Izolirali smo 1,17 g prozorne viskozne tekočine, ki se je čez noč v hladilniku strdila v bel kristaliničen produkt. **Izkoristek:** 64,7 %. **Rf:** 0,34 (MF: heksan : EtOAc = 3 : 1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 0.97 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 0.98 (d, *J* = 6.8 Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 1.51 (dd, *J* = 6.2 Hz, 1.0 Hz, 1H, aziridinski CH_AH_B), 1.99–2.03 (m, 2H, aziridinski CH_AH_B in aziridinski CH), 2.25 (qqd, *J* = 6.8 Hz, 6.8 Hz, 5.0 Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 3.81 (s, 3H, COOCH₃), 4.59 (dd, *J* = 9.3 Hz, 5.0 Hz, 1H, CHCOOCH₃), 7.21–7.32 (m, 9H, CPh₃), 7.34 (d, *J* = 9.3 Hz, 1H, CONH), 7.42–7.47 (m, 6H, CPh₃) ppm. **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ 17.95, 19.39, 30.33, 31.50, 34.28, 52.45, 56.53, 74.77, 127.32, 127.99, 129.54, 143.44, 170.93, 172.39 ppm. **MS (ESI):** 440,6 ([M-H]⁻, 100 %). **IR (ATR):** ν 3273, 2965, 1742, 1649, 1554, 1490, 1444, 1314, 1264, 1210, 1150, 1011, 902, 749, 701, 634 cm⁻¹. **Temperatura tališča:** 96,0–98,0 °C. **HPLC:** Metoda 1; t_r: 7,32 min (100,0 % pri 220 nm). **Specifična sučnost:** [α]_D²⁰ = +145,0 (0,32; EtOAc).

4.3.14. Sinteza metil ((*R*)-aziridin-2-karbonil)-D-alaninata (**14**)

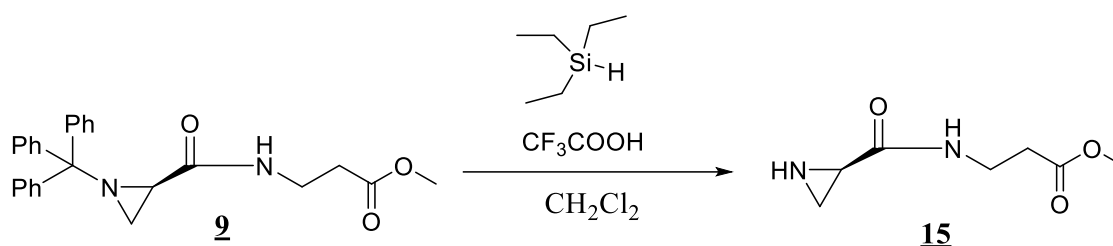


Spojino **14** smo sintetizirali po sinteznem postopku C. Uporabili smo: izhodno spojino **8** (640 mg; 1,54 mmol; 1,00 ekv), CH₂Cl₂ (26 mL), trietilsilan (429 μL; 2,70 mmol; 1,75 ekv) in CF₃COOH (414 μL; 5,40 mmol; 3,50 ekv). Produkt je bil po ekstrakciji relativno čist, zato ga nismo dodatno čistili s kolonsko kromatografijo. Izolirali smo 140 mg belih kristalov. **Izkoristek:** 52,7 %. **Rf:** 0,45 (MF: CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + 3 % Et₃N). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ 1.39 (d, *J* = 7.3 Hz, 3H, CHCH₃), 1.79–1.86 (m, 2H, aziridinska CH_AH_B), 2.55 (dd, *J* = 5.7 Hz, 3.2 Hz, 1H, aziridinski CH), 3.70 (s, 3H, OCH₃), 4.44 (q, *J* = 7.3 Hz, 1H, CHCH₃) ppm. **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 17.65, 26.28, 30.42, 52.95, 172.73, 174.55 ppm, en signal se verjetno prekrije s signalom topila pri 48.32–49.77 ppm. **MS (ESI):** 171,3 ([M-H]⁻, 50 %). **HRMS:** 173,0920 ([M+H]⁺); izračunana za C₇H₁₂N₂O₃: 172,0848. **IR (ATR):** ν 3701, 3286, 3196, 2973, 1732, 1665, 1560, 1451, 1405, 1374, 1344,

1211, 1137, 1058, 1011, 932, 826, 713 cm^{-1} . **Temperatura tališča:** 84,5–87,3 °C. **HPLC:** Metoda 2; t_r : 4,29 min (94,6 % pri 195 nm).

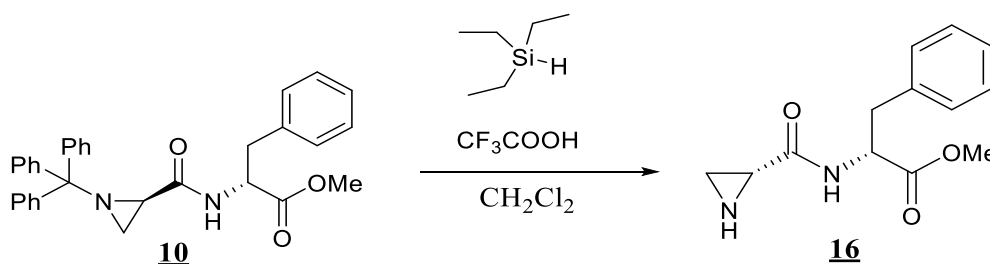
Majhno količino produkta **14** smo poskusili pretvoriti v obliko soli (klorida). Produkt **14** (31 mg) smo raztopili v dietil etru (1 mL) in raztopini med mešanjem na ledeni kopeli dodali 2-molarno raztopino HCl v dietil etru (90 μL). Topilo smo uparili pod znižanim tlakom. Z ^1H NMR eksperimentom smo ugotovili, da je produkt razpadel (najverjetneje se je odprl aziridinski obroč). Iz tega smo sklepali, da je produkt v obliki klorida nestabilen.

4.3.15. Sinteza metil (*R*)-3-(aziridin-2-karboksamido) propanoata (**15**)



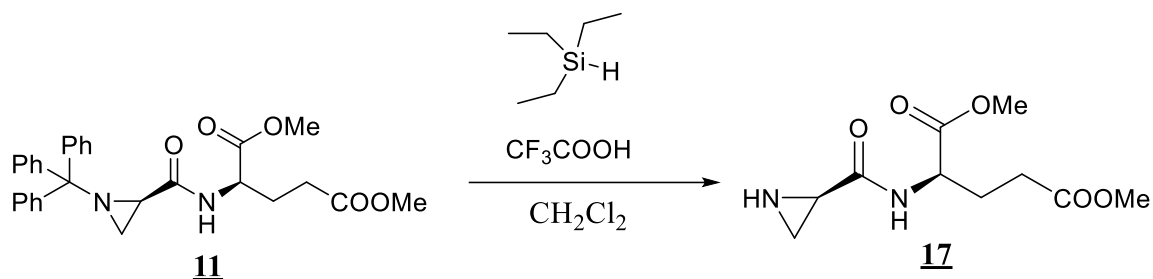
Spojino **15** smo sintetizirali po sinteznem postopku C. Uporabili smo: izhodno spojino **9** (956 mg; 2,31 mmol; 1,00 ekv), CH_2Cl_2 (35 mL), trietilsilan (641 μL ; 4,04 mmol; 1,75 ekv) in CF_3COOH (618 μL ; 8,07 mmol; 3,50 ekv). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo s suhim nanosom. Kot stacionarno fazo smo uporabili Al_2O_3 (aluminijev oksid), saj je na silikagelu prišlo do racemizacije (MF: CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1). Izolirali smo 173 mg belih kristalov. **Izkoristek:** 43,6 %. **Rf:** 0,26 (MF: CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1 + 3 % Et_3N). **^1H NMR (400 MHz, CDCl_3):** δ 1.70–2.00 (m, 2H, aziridinska $\text{CH}_\text{A}\text{H}_\text{B}$), 2.46 (bs, 1H, aziridinski CH), 2.56 (t, $J = 6.1$ Hz, 2H, CH_2COO), 3.49–3.60 (m, 2H, NHCH_2CH_2), 3.71 (s, 3H, OCH_3), 7.09 (bs, 1H, CONH) ppm. **^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3):** δ 26.33, 30.34, 33.80, 34.98, 51.87, 171.11, 172.77 ppm. **HRMS:** 173,0924 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); izračunana za $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$: 172,0848. **IR (ATR):** ν 3704, 3272, 3212, 2958, 2841, 1723, 1657, 1577, 1440, 1407, 1371, 1295, 1266, 1227, 1195, 1172, 1112, 1056, 1017, 978, 909, 884, 841, 740 cm^{-1} . **Temperatura tališča:** 78,8–80,8 °C. **HPLC:** Metoda 2; t_r : 4,23 min (97,6 % pri 210 nm). **Specifična sučnost:** $[\alpha]_D^{20} = +32,9$ (0,33; MeOH).

4.3.16. Sinteza metil (*R*)-aziridin-2-karbonil)-D-fenilalaninata (**16**)



Spojino **16** smo sintetizirali po sinteznem postopku C. Uporabili smo: izhodno spojino **10** (1,310 g; 2,67 mmol; 1,00 ekv), CH₂Cl₂ (40 mL), trietilsilan (742 μL; 4,67 mmol; 1,75 ekv) in CF₃COOH (715 μL; 9,35 mmol; 3,50 ekv). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1). Izolirali smo 450 mg belih kristalov. **Izkoristek:** 67,9 %. **Rf:** 0,24 (MF: CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ 1.82 (bs, 2H, aziridinska CH_AH_B), 2.53 (dd, *J* = 5.5 Hz, 3.2 Hz, 1H, aziridinski CH), 3.01 (dd, *J* = 13.8 Hz, 8.8 Hz, 1H, CH_CH_DPh), 3.20 (dd, *J* = 13.8 Hz, 5.6 Hz, 1H, CH_CH_DPh), 3.71 (s, 3H, OCH₃), 4.73 (dd, *J* = 8.8 Hz, 5.6 Hz, 1H, CHCH_CH_DPh), 7.19–7.34 (m, 5H, Ph) ppm. **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 26.18, 30.24, 38.45, 52.77, 55.31, 127.98, 129.54, 130.23, 137.98, 172.72, 173.17 ppm. **MS (ESI):** 271,24 ([M+Na]⁺, 100 %). **HRMS:** 249,1230 ([M+H]⁺); izračunana za C₁₃H₁₆N₂O₃: 248,1161. **IR (ATR):** ν 3703, 3208, 2945, 1736, 1661, 1543, 1446, 1401, 1362, 1219, 1164, 1110, 1055, 1012, 954, 914, 827, 699 cm⁻¹. **Temperatura tališča:** 80,7–83,2 °C. **HPLC:** Metoda 2; t_r: 14,84 min (99,3 % pri 210 nm). **Specifična sučnost:** [α]_D²⁰ = +18,7 (0,31; MeOH).

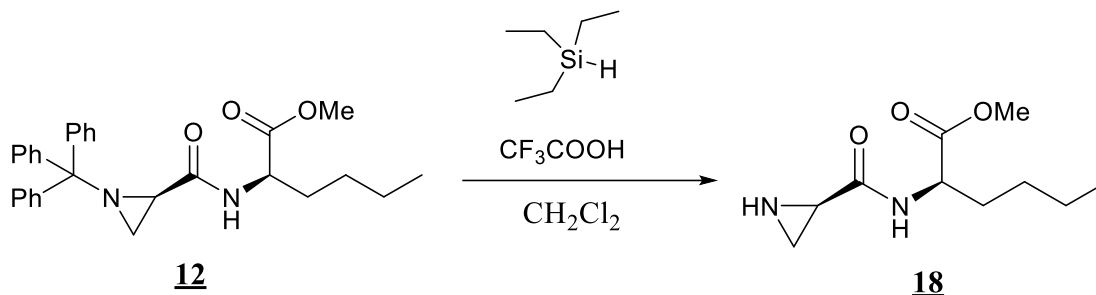
4.3.17. Sinteza dimetil ((*R*)-aziridin-2-karbonil)-*D*-glutamata (**17**)



Spojino **17** smo sintetizirali po sinteznem postopku C. Uporabili smo: izhodno spojino **11** (505 mg; 1,04 mmol; 1,00 ekv), CH₂Cl₂ (15 mL), trietilsilan (289 μL; 1,82 mmol; 1,75 ekv) in CF₃COOH (278 μL; 3,63 mmol; 3,50 ekv). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo kot stacionarno fazo uporabili Al₂O₃, saj se je izkazalo, da je na silikagelu velika nevarnost epimerizacije. Kot MF smo na začetku uporabili CH₂Cl₂ : MeOH = 50 : 1, ki smo jo postopoma zamenjali za CH₂Cl₂ : MeOH = 20 : 1. Izolirali smo 124 mg produkta v obliki brezbarvne viskozne tekočine. **Izkoristek:** 48,9 %. **Rf:** 0,38 (MF: CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1, stacionarna faza: silikagel). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 1.84 (bs, 1H, aziridinski CH_AH_B), 1.88–2.07 (m, 2H, aziridinski CH_AH_B in CHCH_CH_DCH₂), 2.16–2.28 (m, 1H, CHCH_CH_DCH₂), 2.31–2.48 (m, 2H, CHCH_CH_DCH₂), 2.54 (bs, 1H, aziridinski CH), 3.69 (s, 3H, CH₂COOCH₃), 3.76 (s, 3H, CHCOOCH₃), 4.58–4.68 (m, 1H, CHCOOCH₃), 7.16 (d, *J* = 8.0 Hz, 1H, CONH) ppm. **¹³C NMR (100 MHz, CDCl₃):** δ

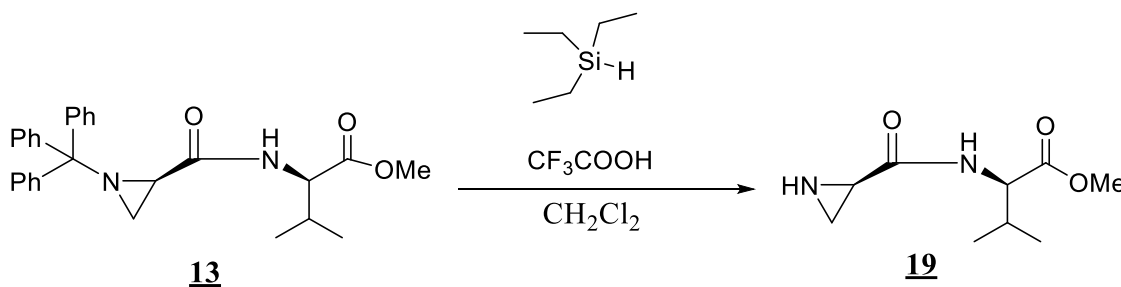
26.73, 27.35, 30.13, 30.38, 51.64, 52.00, 52.69, 171.27, 172.13, 173.25 ppm. **HRMS:** 245,1131 ($[M+H]^+$); izračunana za $C_{10}H_{16}N_2O_5$: 244,1059. **IR (ATR):** ν 3704, 3668, 2970, 2868, 1736, 1657, 1535, 1437, 1341, 1215, 1170, 1056, 1011, 833 cm^{-1} . **HPLC:** Metoda 2; t_r : 5,66 min (96,6 % pri 210 nm). **Specifična sučnost:** $[\alpha]_D^{20} = +54,0$ (0,25; MeOH).

4.3.18. Sinteza metil (*R*)-2-((*R*)-aziridin-2-karboksamido) heksanoata (**18**)



Spojino **18** smo sintetizirali po sinteznem postopku C. Uporabili smo: izhodno spojino **12** (1,29 g; 2,84 mmol; 1,00 ekv), CH_2Cl_2 (40 mL), trietilsilan (788 μL ; 4,96 mmol; 1,75 ekv) in CF_3COOH (760 μL ; 9,93 mmol; 3,50 ekv). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo, pri kateri smo kot stacionarno fazo uporabili Al_2O_3 , saj se je izkazalo, da je na silikagelu velika nevarnost epimerizacije. Kot MF smo uporabili CH_2Cl_2 : MeOH = 20 : 1. Izolirali smo 273 mg brezbarvne viskozne tekočine. **Izkoristek:** 44,9 %. **Rf:** 0,44 (MF: CH_2Cl_2 : MeOH = 9 : 1 + 3 % Et_3N , stacionarna faza: silikagel). **1H NMR (400 MHz, DMSO- d_6):** δ 0.81–0.91 (m, 3H, CH_2CH_3), 1.16–1.34 (m, 4H, $CH_2CH_2CH_2CH_3$), 1.53–1.76 (m, 4H, aziridinska CH_AH_B in $CHCH_2CH_2CH_2$), 2.40–2.47 (m, 1H, aziridinski CH, delno se prekrije s signalom topila), 3.63 (s, 3H, $COOCH_3$), 4.18–4.33 (m, 1H, $CHCOOCH_3$), 8.85 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, CONH) ppm. **^{13}C NMR (100 MHz, $CDCl_3$):** δ 14.32, 23.40, 26.31, 29.10, 30.38, 32.45, 52.82, 54.10, 173.03, 174.12 ppm. **HRMS:** 215,1388 ($[M+H]^+$); izračunana za $C_{10}H_{18}N_2O_3$: 214,1317. **IR (ATR):** ν 3278, 2954, 2865, 1741, 1661, 1536, 1443, 1212, 1150, 980, 918, 827 cm^{-1} . **Specifična sučnost:** $[\alpha]_D^{20} = +58,6$ (0,14; MeOH).

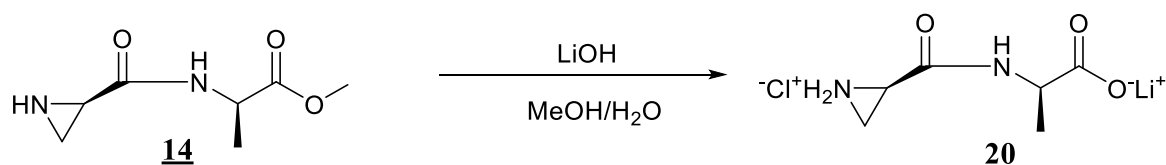
4.3.19. Sinteza metil ((*R*)-aziridin-2-karbonil)-D-valinata (**19**)



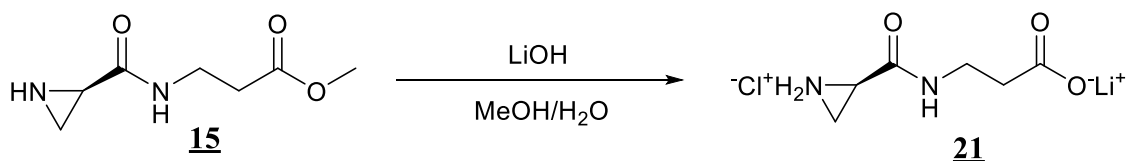
Spojino **19** smo sintetizirali po sinteznem postopku C. Uporabili smo: izhodno spojino **13** (1,08 g; 2,43 mmol; 1,00 ekv), CH_2Cl_2 (35 mL), trietilsilan (675 μL ; 4,25 mmol; 1,75 ekv)

in CF₃COOH (651 μL; 8,50 mmol; 3,50 ekv). Produkt je bil po ekstrakciji relativno čist, zato ga nismo dodatno čistili s kolonsko kromatografijo. Izolirali smo 365 mg belih kristalov. **Izkoristek:** 75,0 %. **Rf:** 0,42 (MF: CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + 3 % Et₃N). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ 0.96 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 0.96 (d, *J* = 6.9 Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 1.85 (bs, 2H, aziridinska CH_AH_B), 2.16 (qqd, *J* = 6.9 Hz, 6.9 Hz, 5.9 Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 2.66 (dd, *J* = 5.4 Hz, 3.1 Hz, 1H, aziridinski CH), 3.72 (s, 3H, COOCH₃), 4.37 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, CHCOOCH₃) ppm. **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 18.53, 19.57, 26.37, 30.33, 32.00, 52.67, 59.53, 173.17, 173.44 ppm. **HRMS:** 199,1081 ([M-H]⁻); izračunana za C₉H₁₆N₂O₃: 200,1161. **IR (ATR):** ν 3704, 3278, 3202, 2967, 1731, 1666, 1558, 1463, 1439, 1391, 1346, 1318, 1285, 1235, 1203, 1160, 1069, 1005, 940, 891, 840, 822, 722 cm⁻¹. **Temperatura tališča:** 78,5–79,8 °C. **HPLC:** Metoda 2; t_r: 6,98 min (95,0 % pri 195 nm). **Specifična sučnost:** [α]_D²⁰ = +114,7 (0,34; MeOH).

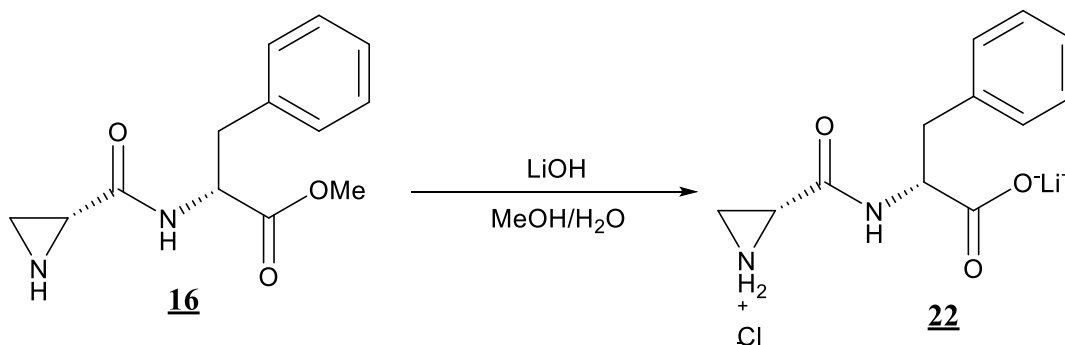
4.3.20. Sinteza ((*R*)-aziridin-2-karbonil)-D-alanina (**20**)



Spojino **20** smo sintetizirali po sinteznem postopku **D**. Uporabili smo: izhodno spojino **14** (70 mg; 0,41 mmol; 1,0 ekv), MeOH (20,4 mL) in 0,1-molarno raztopino LiOH (20,33 mL; 2,03 mmol; 5,0 ekv). Reakcija je v celoti potekla v dveh urah (potek smo spremljali s TLC). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc : MeOH : H₂O = 4 : 2 : 1). Izolirali smo 80 mg rumenih kristalov. **Izkoristek:** 98 %. **Rf:** 0,26 (MF: EtOAc : MeOH : H₂O = 4 : 2 : 1). **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ 1.36 (d, *J* = 7.1 Hz, 3H, CHCH₃), 1.78–1.87 (m, 2H, aziridinska CH_AH_B), 2.58 (dd, *J* = 5.8 Hz, 3.2 Hz, 1H, aziridinski CH), 4.24 (q, *J* = 7.1 Hz, 1H, CHCH₃) ppm. **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 19.48, 26.17, 30.85, 52.26, 171.82, 179.66 ppm. **HRMS:** 159,0764 ([M+H]⁺); izračunana za C₆H₁₀N₂O₃: 158,0691. **IR (ATR):** ν 3659, 3324, 3100, 2970, 2872, 1643, 1606, 1562, 1457, 1405, 1365, 1319, 1269, 1236, 1167, 1104, 1054, 1017, 981, 942, 919, 868, 837, 756, 685 cm⁻¹. **Temperatura tališča:** Termični razpad pri T > 200,0 °C. **HPLC:** Metoda 2; t_r: 3,46 min (76,2 % pri 195 nm). **Specifična sučnost:** [α]_D²⁰ = +66,7 (0,33; MeOH).

4.3.21. Sinteza (*R*)-3-(aziridin-2-karboksamido) propanojske kisline (**21**)

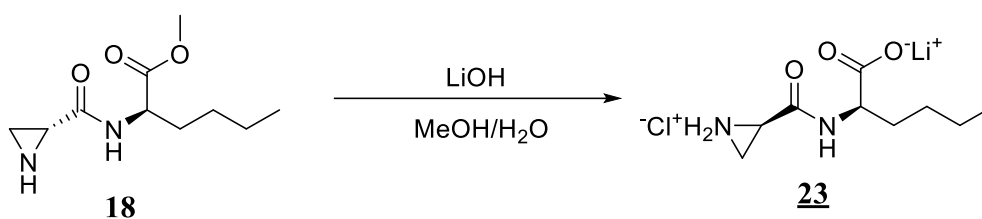
Spojino **21** smo sintetizirali po sinteznem postopku **D**. Uporabili smo: izhodno spojino **15** (127 mg; 0,74 mmol; 1,00 ekv), MeOH (36,9 mL) in 0,1-molarno raztopino LiOH (36,9 mL; 3,69 mmol; 5,00 ekv). Reakcije je potekla v štirih urah (potek smo spremljali s TLC). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc : MeOH : H₂O = 4 : 2 : 1). Izolirali smo 96 mg belih kristalov. **Izkoristek**: 65 %. **Rf**: 0,24 (MF: EtOAc : MeOH : H₂O = 4 : 2 : 1). **¹H NMR (400 MHz, D₂O)**: δ 1.83 (d, *J* = 3.1 Hz, 1H, aziridinski CH_AH_B), 1.87 (d, *J* = 6.0 Hz, 1H, aziridinski CH_AH_B), 2.36 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, CH₂COO), 2.56 (dd, *J* = 6.0 Hz, 3.1 Hz, 1H, aziridinski CH), 3.39 (t, *J* = 6.9 Hz, 2H, NHCH₂CH₂) ppm. **¹³C NMR (100 MHz, D₂O)**: δ 24.82, 29.59, 33.32, 53.91, 172.50, 180.15 ppm. **HRMS**: 159,0764 ([M+H]⁺); izračunana za C₆H₁₀N₂O₃: 158,0691. **IR (ATR)**: ν 3702, 3659, 3258, 3086, 2975, 2871, 1646, 1556, 1404, 1312, 1259, 1162, 1126, 1061, 1016, 908, 832, 622 cm⁻¹. **Temperatura tališča**: Termični razpad pri T > 210,0 °C. **HPLC**: Metoda 2; t_r: 3,52 min (52,7 % pri 210 nm); veliko je nečistote s t_r: 3,82 min (34,6 % pri 210 nm). **Specifična sučnost**: [α]_D²⁰ = +143,6 (0,30; MeOH).

4.3.22. Sinteza ((*R*)-aziridin-2-karbonil)-D-fenilalanina (**22**)

Spojino **22** smo sintetizirali po sinteznem postopku **D**. Uporabili smo: izhodno spojino **16** (205 mg; 0,83 mmol; 1,00 ekv), MeOH (42 mL) in 0,1-molarno raztopino LiOH (41,28 mL; 4,13 mmol; 5,00 ekv). Reakcija je v celoti potekla v dveh urah (potek smo spremljali s TLC). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc : MeOH : H₂O = 4 : 1 : 1). Izolirali smo 163 mg belih kristalov. **Izkoristek**: 71,4 %. **Rf**: 0,37 (MF: EtOAc : MeOH : H₂O = 4 : 2 : 1). **¹H NMR (400 MHz, D₂O)**: δ 1.75 (bs, 2H, aziridinska CH_AH_B), 2.52 (bs, 1H, aziridinski CH), 2.91 (dd, *J* = 14.0 Hz, 8.8 Hz, 1H, CH_CH_DPh), 3.18 (dd, *J* = 14.0 Hz,

4.9 Hz, 1H, $\text{CH}_2\text{H}_D\text{Ph}$), 4.45 (dd, $J = 8.8$ Hz, 4.9 Hz, 1H, $\text{CHCH}_2\text{H}_D\text{Ph}$), 7.21–7.36 (m, 5H, Ph) ppm. **^{13}C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 25.05, 29.48, 38.63, 54.38, 126.89, 128.61, 129.30, 137.59, 172.08, 178.00 ppm. **HRMS:** 233,0928 ($[\text{M}-\text{H}]^-$); izračunana za $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_3$: 234,1004. **IR (ATR):** ν 3371, 2976, 2117, 2005, 1595, 1418, 1273, 1162, 1106, 1056, 923, 696 cm^{-1} . **Temperatura tališča:** Termični razpad pri $T > 180,0$ °C. **HPLC:** Metoda 2; t_r : 7,22 min (86,5 % pri 210 nm). **Specifična sučnost:** $[\alpha]_D^{20} = +25,7$ (0,30; MeOH).

4.3.23. Sinteza (*R*)-2-((*R*)-aziridin-2-karboksamido) heksanojske kisline (**23**)

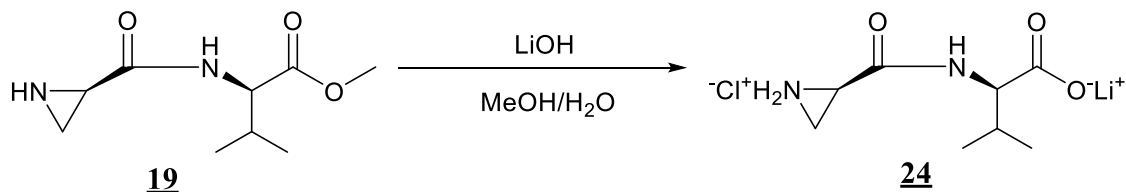


Spojino **23** smo sintetizirali po sinteznem postopku **D**. Uporabili smo: izhodno spojino **18** (100 mg; 0,47 mmol; 1,00 ekv), MeOH (24 mL) in 0,1-molarno raztopino LiOH (23,34 mL; 2,33 mmol; 5,00 ekv). Reakcija je potekla po treh urah (potek reakcije smo spremljali s TLC). Produkt smo poskušali očistiti s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc : MeOH : H_2O = 4 : 1 : 1), vendar smo po končanem čiščenju dobili veliko frakcij s potencialnimi produkti. Analizirali smo frakcije F1–3, F4–5, F12–14, F16, F17–23 in F24–26 in s pomočjo eksperimentov ^1H NMR in MS ugotovili, da se naš produkt nahaja v F16 v čisti obliki in v F17–23 skupaj z različnimi nečistotami, zato smo zmes F17–23 poskušali še enkrat očistiti s kolonsko kromatografijo (enake razmere kot pri prvi koloni). Pri drugi koloni smo zbrali frakcije F13–14 in F15–29 ter ugotovili, da se naš produkt nahaja v frakciji F13–14 v čisti obliki, zato smo to frakcijo združili s frakcijo F16 iz prve kolone. Izolirali smo 35 mg belih kristalov. **Izkoristek:** 31 %. **Rf:** 0,21 (MF: EtOAc : MeOH : H_2O = 4 : 1 : 1). **MS (ESI):** 199,12 ($[\text{M}-\text{H}]^-$, 100 %). **HRMS:** 199,1084 ($[\text{M}-\text{H}]^-$); izračunana za $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3$: 200,1161. **IR (ATR):** ν 3370, 2959, 2867, 1595, 1421, 1190, 1110 cm^{-1} . **Temperatura tališča:** Termični razpad pri $T > 200,0$ °C. **HPLC:** Metoda 2; t_r : 5,47 min (88,0 % pri 210 nm).

V frakciji F15–29 (druga kolona) smo na TLC-plošči opazili dve lisi, naš produkt in neznano nečistoto, ki se ji je koncentracija v primerjavi s prvo kolono povečala. Iz tega smo sklepali, da se produkt na koloni pretvarja v to nečistoto. Da bi potrdili našo domnevo, smo suhemu preostanku frakcije F15–19 dodali silikagel in mobilno fazo (tako smo simulirali razmere kolone) in čez noč pustili mešati. Po enem dnevu smo dobili enaki koncentraciji produkta in nečistote. Reakcijsko zmes smo mešali še nadaljnjih 24 ur in ugotovili, da sta tudi po preteku

daljšega časovnega obdobja, koncentraciji produkta in nečistote v razmerju 1 : 1, iz česar smo skleпали, da pride na koloni do epimerizacije in je nastala nečistota diastereoizomer našega produkta.

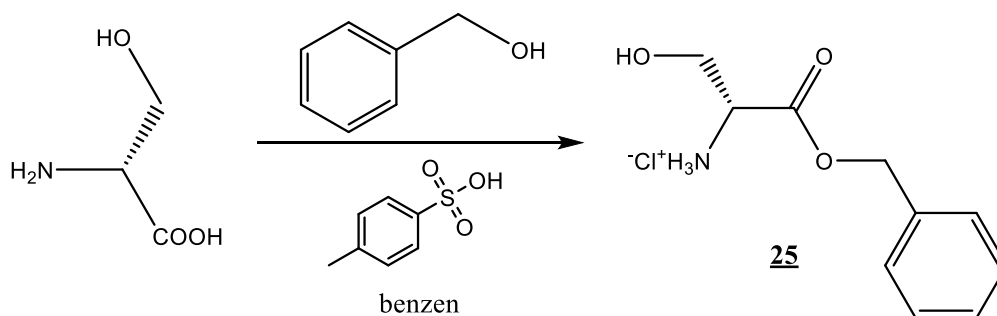
4.3.24. Sinteza ((*R*)-aziridin-2-karbonil)-*D*-valina (**24**)



Spojino **24** smo sintetizirali po sinteznem postopku **D**. Uporabili smo: izhodno spojino **19** (150 mg; 0,75 mmol; 1,00 ekv), MeOH (37,5 mL) in 0,1-molarno raztopino LiOH (37,5 mL; 3,75 mmol; 5,00 ekv). Ker po treh urah še ni potekla do konca (potek smo spremljali s TLC), smo jo pustili mešati čez noč (temperatura reakcijske zmesi je postopoma dosegla sobno temperaturo). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc : MeOH : H₂O = 4 : 2 : 1). Izolirali smo 109 mg belih kristalov. **Izkoristek:** 63,7 %. **Rf:** 0,31 (MF: EtOAc : MeOH : H₂O = 4 : 2 : 1). **¹H NMR (400 MHz, D₂O):** δ 0.87 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 0.90 (d, *J* = 7.0 Hz, 3H, CH(CH₃)₂), 1.84 (d, *J* = 3.4 Hz, 1H, aziridinski CH_AH_B), 1.90 (d, *J* = 5.9 Hz, 1H, aziridinski CH_AH_B), 2.10 (q, *J* = 7.0 Hz, 7.0 Hz, 5.6 Hz, 1H, CH(CH₃)₂), 2.68 (dd, *J* = 5.9 Hz, 3.4 Hz, 1H, aziridinski CH), 4.06 (d, *J* = 5.6 Hz, 1H, CHCOO) ppm. **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 18.36, 20.33, 26.30, 30.89, 32.67, 61.76, 172.45, 178.40 ppm. **HRMS:** 187,1078 ([M+H]⁺); izračunana za C₈H₁₄N₂O₃: 186,1004. **IR (ATR):** ν 3707, 3666, 3288, 2970, 2871, 1644, 1590, 1546, 1424, 1235, 1162, 1057, 1011, 939, 915, 835, 752, 669 cm⁻¹. **Temperatura tališča:** Termični razpad pri T > 220,0 °C. **HPLC:** Metoda 2; t_r: 4,11 min (85,4 % pri 210 nm). **Specifična sučnost:** [α]_D²⁰ = +52,6 (0,33; MeOH).

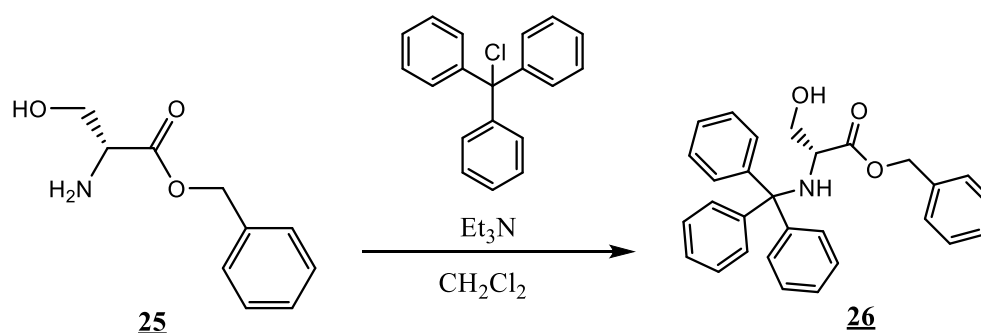
4.4. Sinteza druge serije spojin (D-aminokislina-aziridin)

4.4.1. Sinteza (*R*)-1-(benziloksi)-3-hidroksi-1-oksopropan-2-aminijevega klorida (**25**)



D-serin (10,00 g; 95,15 mmol; 1,00 ekv) smo raztopili v benzenu (600 mL), mu dodali *p*-toluensulfonsko kislino (19,91 g; 104,7 mmol; 1,10 ekv) in na koncu benzilni alkohol (141,59 mL; 1,37 mol; 14,37 ekv). Reakcijsko zmes smo segreti do temperature refluxa (95 °C) in jo čez noč pustili refluktirati. Naslednji dan smo uparili benzen pod znižanim tlakom, trdnemu preostanku pa smo dodali dietil eter (200 mL) in vodo (400 mL) ter izvedli ekstrakcijo. Vodno fazo smo nato še dodatno ekstrahirali z dietil etrom (2 × 200 mL). S TLC smo ugotovili, da je v začetni etrni frakciji še nekaj produkta, zato smo to frakcijo ekstrahirali z 1-molarno raztopino HCl (2 × 100 mL). Vodne faze smo združili in jim počasi (zaradi penjenja, izhaja CO₂) dodajali Na₂CO₃, da smo dobili raztopino s pH 10. Dobljeno raztopino smo ekstrahirali najprej z dietil etrom (3 × 150 mL) in nato še z EtOAc (3 × 150 mL), saj je po ekstrakciji z etrom nekaj produkta še vedno ostalo v vodni fazi. Etrne faze smo skoncentrirali pod znižanim tlakom do končnega volumna 100 mL, EtOAc pa smo uparili pod znižanim tlakom ter suhi preostanek raztopili v etru. Združenim etrnim fazam smo dodali 2-molarno raztopino HCl v dietil etru, da smo dobili suspenzijo s pH 2. Produkt se je oboril, zato smo ga odnučali. Izolirali smo 4,80 g belih kristalov. **Izkoristek:** 25,8 %. **Rf:** 0,33 (MF: CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + 3 % Et₃N). **¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆):** δ 3.81 (ddd, *J* = 11.6 Hz, 4.9 Hz, 3.3 Hz, 1H, CHCH_AH_BOH), 3.89 (ddd, *J* = 11.6 Hz, 4.9 Hz, 3.8 Hz, 1H, CHCH_AH_BOH), 4.21 (dd, *J* = 3.8 Hz, 3.3 Hz, 1H, CHCH_AH_BOH), 5.23 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, CH_CH_DPh), 5.27 (d, *J* = 12.7 Hz, 1H, CH_CH_DPh), 5.64 (dd, *J* = 4.9 Hz, 4.9 Hz, 1H, OH), 7.30–7.45 (m, 5H, Ph), 8.46 (bs, 3H, NH₃⁺) ppm. **Temperatura tališča:** 179,0–181,0 °C.

4.4.2. Sinteza benzil tritil-D-serinata (**26**)

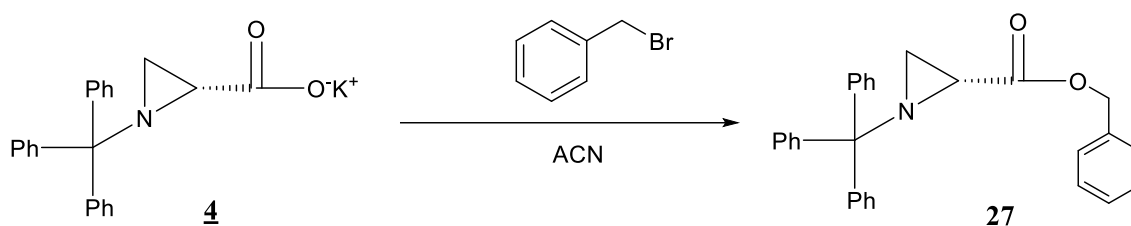


Izhodno spojino **25** (4,70 g; 24,1 mmol; 1,00 ekv) smo raztopili v CH₂Cl₂ (100 mL), ji dodali Et₃N (8,40 mL; 60,2 mmol; 2,50 ekv), preverili pH, ki je bil bazičen, in reakcijsko zmes postavili na ledeno kopel ter počakali, da se ohladi. Nato smo dodali tritil klorid (6,71 g; 24,1 mmol; 1,00 ekv) in mešali dve uri pri 0 °C (potek reakcije smo spremljali s TLC). Po poteku reakcije smo organsko fazo ekstrahirali z 10-odstotno citrnsko kislino (3 × 50 mL)

in z nasičeno raztopino NaCl (75 mL). Organsko fazo smo sušili nad brezvodnim Na₂SO₄, jo filtrirali in filtratu uparili topilo pod znižanim tlakom. Izolirali smo 9,66 g svetlorumenih kristalov. **Izkoristek:** 91,7 %. **Rf:** 0,85 (MF: CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + 3 % Et₃N). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 2.28 (bs, 1H, OH), 3.03 (bs, 1H, NH), 3.50–3.63 (m, 2H, CHCH_AH_BOH), 3.71 (dd, *J* = 10.0 Hz, 3.4 Hz, 1H, CHCH_AH_BOH), 4.62 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CH_CH_DPh), 4.76 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CH_CH_DPh), 7.10–7.37 (m, 14H, Ph in CPh₃), 7.46–7.52 (m, 6H, CPh₃) ppm. **Temperatura tališča:** 44,0–47,0 °C.

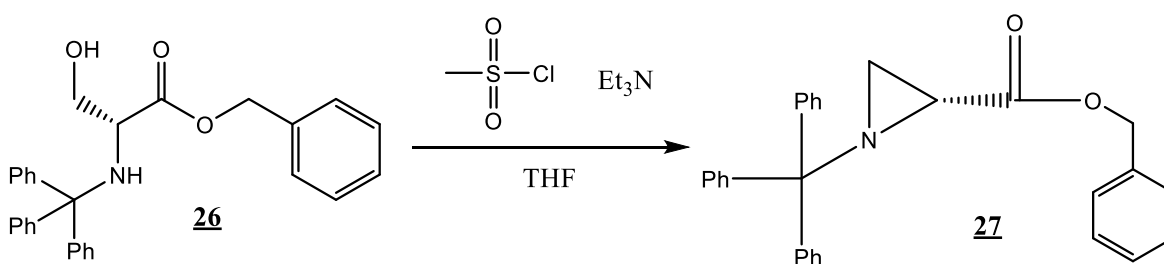
4.4.3. Sinteza benzil (*R*)-1-tritilaziridin-2-karboksilata (**27**)

Prvi postopek:



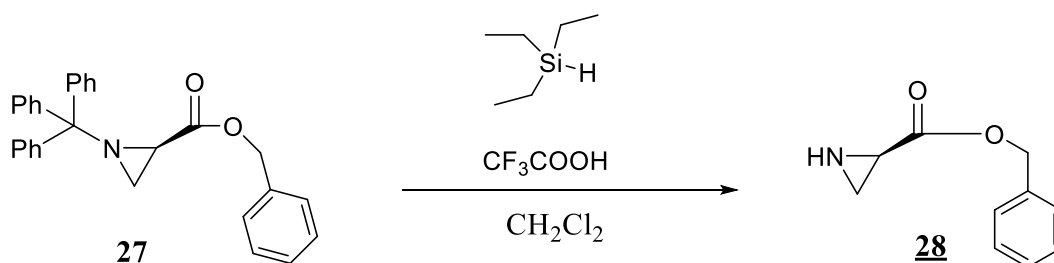
Izhodno spojino **4** (15,01 g; 40,84 mmol; 1,00 ekv) smo raztopili v ACN (400 mL) in raztopino postavili na ledeno kopel. Ohlajeni reakcijski zmesi smo dodali benzil bromid (4,85 mL; 40,8 mmol; 1,00 ekv). Po zaključku reakcije (reakcija je potekla v 3 urah) smo uparili topilo pod znižanim tlakom, porazdelili suhi preostanek med CH₂Cl₂ (200 mL) in vodo (200 mL) ter izvedli ekstrakcijo. Organsko fazo smo ekstrahirali z nasičeno vodno raztopino NaCl (150 mL), jo sušili nad brezvodnim Na₂SO₄, sušilno sredstvo filtrirali in filtratu uparili topilo pod znižanim tlakom. Izolirali smo 14,34 g svetlorjave viskozne tekočine. **Izkoristek:** 83,66 %. **Rf:** 0,76 (MF: heksan : EtOAc = 1 : 1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃):** δ 1.41 (dd, *J* = 6.1 Hz, 1.6 Hz, 1H, CH_AH_B), 1.93 (dd, *J* = 6.1 Hz, 2.7 Hz, 1H, CH), 2.28 (dd, *J* = 2.7 Hz, 1.6 Hz, 1H, CH_AH_B), 5.19 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CH_CH_DPh), 5.24 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CH_CH_DPh), 7.17–7.52 (m, 20H, Ph in CPh₃) ppm.

Drugi postopek:



Benzil tritil-D-serinat (**26**; 9,63 g; 22,0 mmol; 1,00 ekv) smo raztopili v brezvodnem THF (60 mL), po delih dodali Et₃N (6,75 mL; 48,4 mmol; 2,20 ekv) in postavili reakcijsko zmes na ledeno kopel. Ohlajeni reakcijski zmesi smo po kapljicah dodajali metansulfonil klorid (1,72 mL; 22,2 mmol; 1,01 ekv) in jo pustili mešati 30 minut pri sobni temperaturi. Temperaturo smo nato dvignili na 65 °C (temperatura refluksa) in refluktirali 48 ur. Po zaključku reakcije (potek smo spremljali s TLC) smo uparili topilo pod znižanim tlakom, trdni preostanek raztopili v EtOAc (60 mL) in ekstrahirali z 10-odstotno citrsko kislino (3 × 30 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (3 × 30 mL) ter nasičeno raztopino NaCl (1 × 30 mL). Organsko fazo smo sušili nad brezvodnim Na₂SO₄, sušilno sredstvo filtrirali in filtratu uparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: heksan : EtOAc = 4 : 1). Izolirali smo 8,13 g brezbarvne viskozne tekočine. **Izkoristek**: 88,1 %. **Rf**: 0,40 (MF: heksan : EtOAc = 4 : 1). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 1.41 (dd, *J* = 6.2 Hz, 1.6 Hz, 1H, CH_AH_B), 1.93 (dd, *J* = 6.2 Hz, 2.7 Hz, 1H, CH), 2.28 (dd, *J* = 2.7 Hz, 1.6 Hz, 1H, CH_AH_B), 5.19 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CH_CH_DPh), 5.25 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CH_CH_DPh), 7.11–7.52 (m, 20H, Ph in CPh₃) ppm. **IR (ATR)**: ν 3059, 3031, 2983, 1737, 1596, 1490, 1448, 1402, 1369, 1319, 1274, 1237, 1173, 1081, 1019, 903, 747, 699, 633 cm⁻¹.

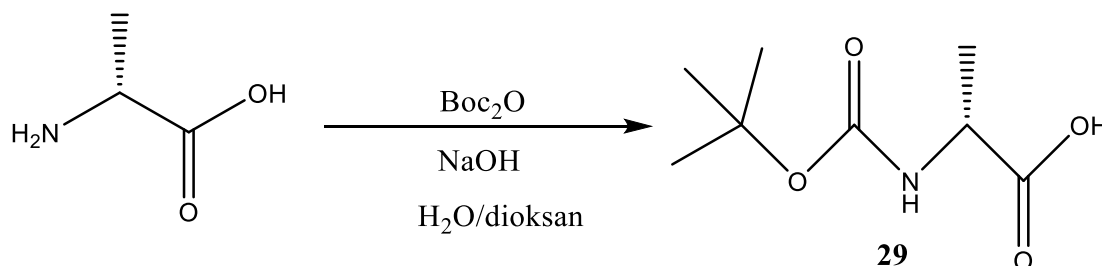
4.4.4. Sinteza benzil (*R*)-aziridin-2-karboksilata (**28**)



Spojino **28** smo sintetizirali po sinteznem postopku C. Uporabili smo: izhodno spojino **27** (1,97 g; 4,69 mmol; 1,00 ekv), CH₂Cl₂ (67,5 mL), trietilsilan (1,12 mL; 7,03 mmol; 1,50 ekv) in CF₃COOH (1,08 mL; 14,1 mmol; 3,00 ekv). Pri prvi ekstrakciji smo namesto dietil etra uporabili heksan. Produkt je bil po ekstrakciji relativno čist, zato ga nismo dodatno čistili s kolonsko kromatografijo. Izolirali smo 697 mg brezbarvne viskozne tekočine. **Izkoristek**: 83,9 %. **Rf**: 0,32 (MF: heksan : EtOAc = 1 : 2 + 3 % Et₃N). **¹H NMR (400 MHz, CDCl₃)**: δ 1.89 (dd, *J* = 5.5 Hz, 1.4 Hz, 1H, CH_AH_B), 2.04 (dd, *J* = 2.9 Hz, 1.4 Hz, 1H, CH_AH_B), 2.58 (dd, *J* = 5.5 Hz, 2.9 Hz, 1H, CH), 5.18 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CH_CH_DPh), 5.22 (d, *J* = 12.3 Hz, 1H, CH_CH_DPh), 7.32–7.42 (m, 5H, Ph) ppm. **IR (ATR)**: ν 3285, 3229, 3065, 3037, 1725, 1564, 1456, 1402, 1360, 1187, 1113, 1007, 970, 871, 825, 744, 697 cm⁻¹.

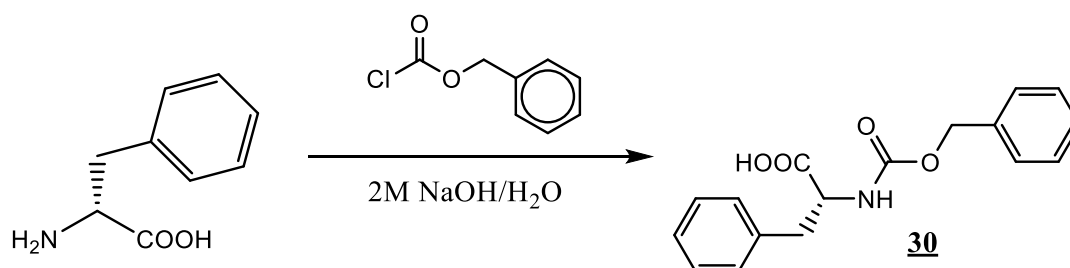
Produkt smo poskušali očistiti s kolonsko kromatografijo (MF: heksan : EtOAc = 1 : 2 + 1 % Et₃N), vendar se je iz kolone eluiral skupaj z nečistoto, za katero smo s pomočjo ¹H NMR eksperimenta ugotovili, da je odprta oblika aziridina. Iz tega smo sklepali, da pride na koloni do odpiranja aziridinskega obroča.

4.4.5. Sinteza (*tert*-butoksikarbonil)-D-alanina (**29**)



D-alanin (2,90 g; 32,6 mmol; 1,00 ekv) smo raztopili v zmesi vode (30 mL), 1-molarne raztopine NaOH (32,6 mL; 32,6 mmol; 1,00 ekv) in dioksana 30 (mL), raztopino postavili na ledeno kopel in počakali, da se ohladi. Nato smo dodali di-*t*-butil dikarbonat (Boc₂O; 8,54 g; 39,1 mmol; 1,20 ekv), ki smo ga predhodno raztopili v dioksanu (30 mL), in reakcijsko zmes pustili mešati 3 ure pri sobni temperaturi (potek reakcije smo spremljali s TLC). Reakcijski zmesi smo nato uparili dioksan pod znižanim tlakom, preostanek prenesli v lij ločnik, dopolnili z vodo do 100 mL in ekstrahirali z dietil etrom (2 × 20 mL). Vodno fazo smo nakisali z 2-molarno raztopino HCl do pH 2 ter jo ekstrahirali z EtOAc (3 × 20 mL). Združene organske faze smo sušili nad Na₂SO₄, sušilno sredstvo filtrirali in filtratu uparili topilo pod znižanim tlakom. Izolirali smo 5,22 g brezbarvne viskozne tekočine, ki je čez noč kristalizirala v bele kristale. **Izkoristek:** 84,6 %. **Rf:** 0,59 (MF: CH₂Cl₂ : MeOH = 9 : 1 + CH₃COOH). **¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆):** δ 1.22 (d, *J* = 7.4 Hz, 3H, CHCH₃), 1.38 (s, 9H, C(CH₃)₃), 3.92 (qd, *J* = 7.4 Hz, 7.4 Hz, 1H, CHCH₃), 7.12 (d, *J* = 7.4 Hz, 1H, OCONH), 12.40 (s, 1H, COOH) ppm. **Temperatura tališča:** 80,0–82,0 °C.

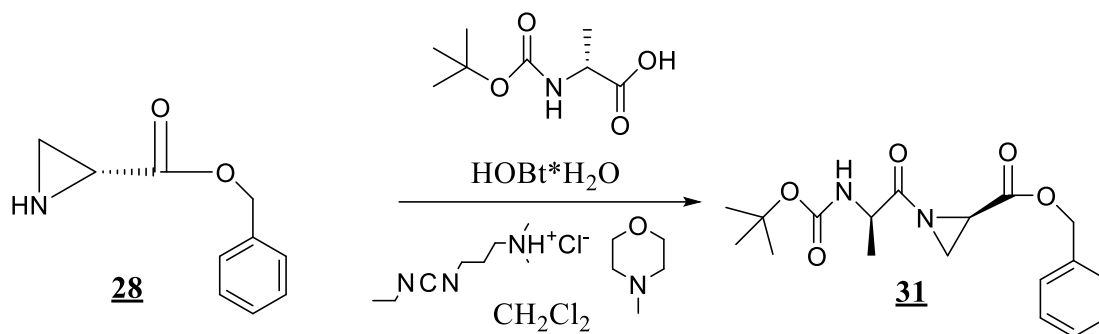
4.4.6. Sinteza ((benziloksi)karbonil)-D-fenilalanina (**30**)



D-fenilalanin (2,00 g; 12,1 mmol; 1,0 ekv) smo raztopili v 1-molarni raztopini NaOH (20 mL; 20 mmol; 1,7 ekv), postavili reakcijsko zmes na ledeno kopel in počakali, da se

ohladi. Nato smo, med močnim mešanjem, po kapljicah dodajali benzil kloroformat (CbzCl; 2,07 mL; 14,5 mmol; 1,2 ekv). Reakcijsko zmes smo pustili mešati pol ure pri sobni temperaturi (potek smo spremljali s TLC). Sledila je ekstrakcija z dietil etrom (2×20 mL). Po ekstrakciji smo vodno fazo nakisali z 2-molarno raztopino HCl do pH 2 (pride do obarjanja produkta) in jo ekstrahirali z EtOAc (3×20 mL). Združene organske faze smo sušili nad Na_2SO_4 , sušilno sredstvo filtrirali in filtratu uparili topilo pod znižanim tlakom. Izolirali smo 2,75 g brezbarvne viskozne tekočine, ki je čez noč kristalizirala v bele kristale. **Izkoristek:** 75,8 %. **Rf:** 0,50 (MF: $\text{CH}_2\text{Cl}_2 : \text{MeOH} = 9 : 1 + \text{CH}_3\text{COOH}$). **$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, DMSO- d_6):** δ 3.11 (dd, $J = 14.1$ Hz, 6.2 Hz, 1H, $\text{CHCH}_A\text{H}_B\text{Ph}$), 3.21 (dd, $J = 14.1$ Hz, 5.4 Hz, 1H, $\text{CHCH}_A\text{H}_B\text{Ph}$), 4.7 (ddd, $J = 8.2$ Hz, 6.2 Hz, 5.4 Hz, 1H, CH), 5.10 (s, 2H, OCH_2), 5.17 (d, $J = 8.2$ Hz, 1H, CONH), 7.21–7.40 (m, 10H, $2 \times \text{Ph}$) ppm. **Temperatura tališča:** 85,2–88,0 °C.

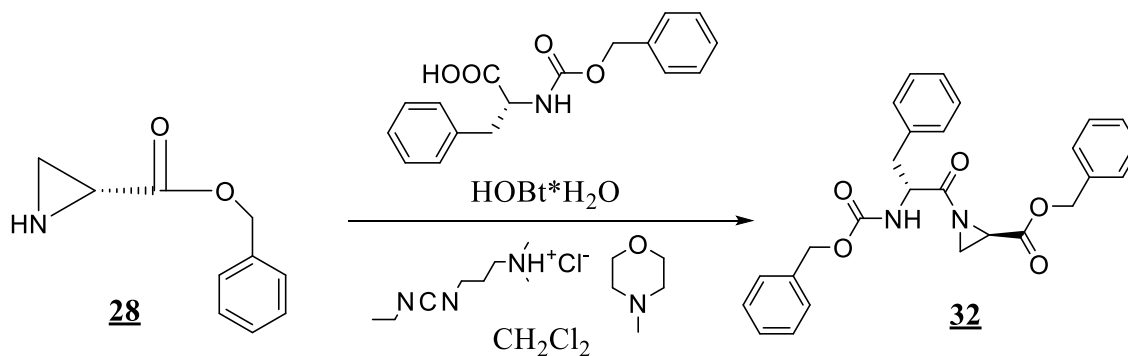
4.4.7. Sinteza benzil (*R*)-1-((*tert*-butoksikarbonil)-D-alanil)aziridin-2-karboksilata (31)



Spojino **31** smo sintetizirali po sinteznem postopku **B**. Uporabili smo: izhodno spojino **28** (997 mg; 5,27 mmol; 1,00 ekv), CH_2Cl_2 (55 mL), Boc-D-Ala (**29**; 997 mg; 5,27 mmol; 1,00 ekv), HOBt (888 mg; 5,80 mmol; 1,10 ekv), NMM (1,74 mL; 15,8 mmol; 3,00 ekv) in EDC (1,11 g; 5,80 mmol; 1,10 ekv). Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: heksan : EtOAc = 3 : 1). Iz kolone se nam je eluiralo veliko različnih spojin. Zbrali smo frakcije: F15–20, F21–28, F30–34 in F37–53. Z $^1\text{H NMR}$ eksperimentom smo ugotovili, da se produkt nahaja v frakciji F37–53, v drugih zbranih frakcijah pa so bili razgradni produkti tarčne spojine, pri katerih je prišlo do odprtja aziridinskega obroča, kar kaže na nestabilnost produkta in se odraža v nizkem izkoristku. Izolirali smo 471 mg prozorne viskozne tekočine. **Izkoristek:** 25,7 %. **Rf:** 0,23 (MF: heksan : EtOAc = 3 : 1). **$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3):** δ 1.42 (s, 9H, $\text{C}(\text{CH}_3)_3$), 1.45 (d, $J = 7.1$ Hz, 3H, CHCH_3), 2.63 (dd, $J = 3.1$ Hz, 1.9 Hz, 1H,

aziridinski CH_AH_B), 2.72 (dd, $J = 5.8$ Hz, 1.9 Hz, 1H, aziridinski CH_AH_B), 3.28 (dd, $J = 5.8$ Hz, 3.1 Hz, 1H, aziridinski CH), 4.30 (qd, $J = 7.1$ Hz, 7.1 Hz, 1H, CHCH_3), 5.01 (d, $J = 7.1$ Hz, 1H, OCONH), 5.20 (s, 2H, CH_2Ph), 7.32–7.42 (m, 5H, Ph) ppm. ^{13}C NMR (100 MHz, MeOD): δ 18.98, 28.42, 30.96, 34.45, 51.30, 67.71, 80.02, 128.65, 128.73, 128.78 (ti trije signali se delno prekrivajo), 135.06, 155.33, 168.31, 184.23 ppm. HRMS: 349,1753 ($[\text{M}+\text{H}]^+$); 347,1825 ($[\text{MH}]^-$); izračunana za $\text{C}_{18}\text{H}_{24}\text{N}_2\text{O}_5$: 348,1685. IR (ATR): ν 3354, 3177, 3036, 1972, 2935, 2878, 1681, 1497, 1452, 1367, 1324, 1273, 1248, 1168, 1063, 1018, 944, 913, 854, 750, 699 cm^{-1} . HPLC: Metoda 3; t_r : 6,64 min (95,1 % pri 220 nm). Specifična sučnost: $[\alpha]_D^{20} = +84,4$ (0,27; EtOAc).

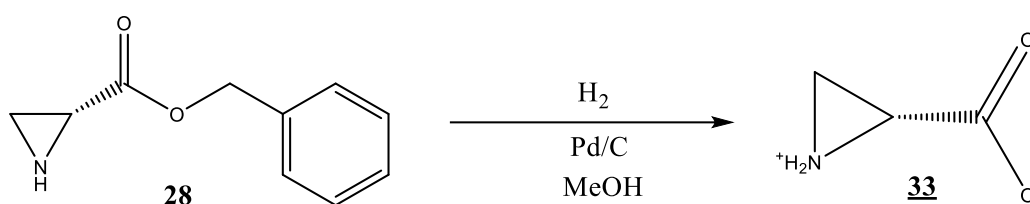
4.4.8. Sinteza benzil (*R*)-1-(((benziloksi)karbonil)-*D*-fenilalanil)aziridin-2-karboksilata (**32**)



Spojino **32** smo sintetizirali po sinteznem postopku B. Uporabili smo: izhodno spojino **28** (697 mg; 3,93 mmol; 1,00 ekv), CH₂Cl₂ (40 mL), Cbz-D-Phe (**30**; 1,30 g; 4,33 mmol; 1,10 ekv), HOBt (663 mg; 4,33 mmol; 1,10 ekv), NMM (1,30 mL; 11,8 mmol; 3,00 ekv) in EDC (829 mg; 4,33 mmol; 1,10 ekv). Z majhno količino produkta smo naredili poskusno kolonsko kromatografijo. Kot začetno MF smo uporabili heksan : EtOAc = 10 : 1, gradient pa smo tekom kolone postopoma višali do končne MF heksan : EtOAc = 1 : 1. Iz kolone se nam je eluiralo 7 različnih spojin s podobnimi retencijskimi faktorji. Z ^1H NMR eksperimentom smo ugotovili, da nobena od teh spojin ni bila želeni produkt, ampak je prišlo med čiščenjem s kolonsko kromatografijo do razgradnje produkta. Nastale spojine so vsebovale hidroliziran amid, spojino z odprtim aziridinskim obročem, najverjetneje pa je prišlo tudi do intramolekulske ciklizacije. Spojino smo zato očistili samo z ekstrakcijo in izolirali 1,67 g prozorne viskozne tekočine. Izkoristek: 92,4 %. Rf: 0,62 (MF: heksan : EtOAc = 1 : 1). ^1H NMR (400 MHz, CDCl₃): δ 2.57–2.63 (m, 2H, aziridinska CH_AH_B), 3.05–3.15 (m, 2H, $\text{CHCH}_C\text{H}_D\text{Ph}$ in aziridinski CH), 3.25 (dd, $J = 14.0$ Hz, 5.8 Hz, 1H, $\text{CHCH}_C\text{H}_D\text{Ph}$), 4.55–4.63 (m, 1H, $\text{CHCH}_A\text{H}_B\text{Ph}$), 5.0 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, aziridin-

COOCH_EH_FPh), 5.06 (d, $J = 12.3$ Hz, 1H, aziridin-COOCH_EH_FPh), 5.17 (s, 2H, NHCOOCH₂Ph), 5.23 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, OCONH), 7.12–7.42 (m, 15H, 3 × Ph) ppm. **¹³C NMR (100 MHz, MeOD):** δ 31.68, 35.63, 38.98, 58.87, 67.65, 68.65, 127.87, 128.75, 129.04, 129.57, 129.61, 129.76 (ti trije signali se prekrivajo), 130.52, 136.95, 138.32, 138.70, 158.37, 169.74, 183.98 ppm. **MS (ESI):** 480,6 ($[M+Na]^+$, 100 %). **HRMS:** 457,1773 ($[M-H]^-$); izračunana za C₂₇H₂₆N₂O₅: 458,1842. **IR (ATR):** ν 3328, 3062, 3033, 2952, 1699, 1505, 1452, 1375, 1248, 1191, 1077, 1047, 1027, 910, 747, 696 cm⁻¹. **HPLC:** Metoda 3; t_r : 9,24 min (70,5 % pri 210 nm). **Specifična sučnost:** $[\alpha]_D^{20} = +45,6$ (0,43; EtOAc).

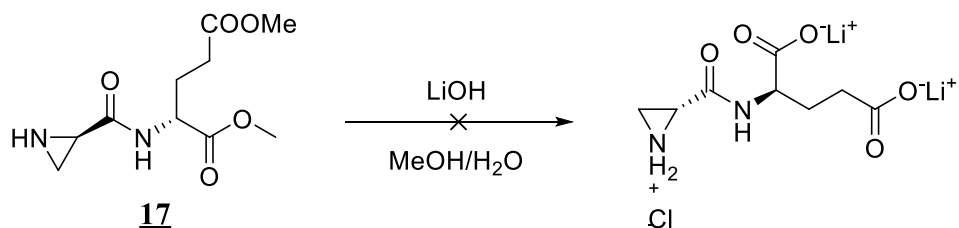
4.4.9. Sinteza (*R*)-aziridin-2-karboksilne kisline (**33**)



Izhodno spojino **28** (240 mg; 1,35 mmol; 1,00 ekv) smo raztopili v MeOH (40 mL) in reakcijsko zmes postavili na ledeno kopel. Ohlajeno reakcijsko zmes smo 40 minut preprihovali z argonom in nato dodali paladij na ogljiku (Pd/C; 48 mg; 20 masnih %) ter začeli nastalo suspenzijo preprihovati z vodikom. Po eni uri preprihovanja smo reakcijsko zmes premaknili z ledene kopeli na sobno temperaturo in začeli z vodikom preprihovati samo atmosfero. Po končani reakciji (reakcija poteče v dveh urah) smo odstranili paladij s filtracijo ter uparili MeOH pod znižanim tlakom. Kolone nismo delali zaradi nestabilnosti produkta (na koloni se aziridinski obroč odpre). Izolirali smo 90 mg svetlorjave viskozne tekočine. **Izkoristek:** 76 %. **¹H NMR (400 MHz, MeOD):** δ 1.48 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, CH_AH_B), 2.51 (dd, $J = 6.4$ Hz, 6.3 Hz, 1H, CH_AH_B), 3.11 (dd, $J = 6.4$ Hz, 6.3 Hz, 1H, CH) ppm. **MS (ESI):** 199,6 ($[M+CF_3COO-H]^-$, 100 %).

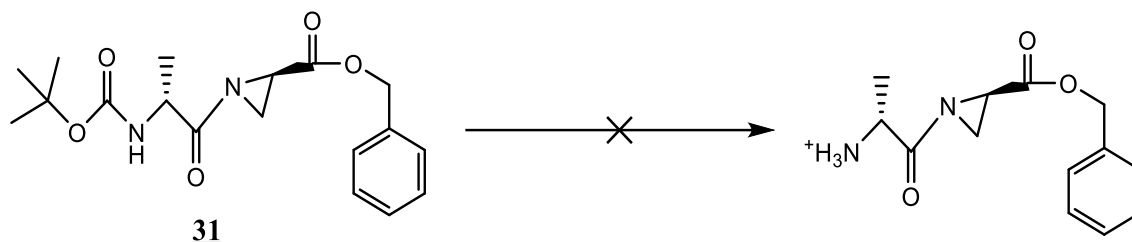
4.5. Neuspele reakcije

4.5.1. Poskus sinteze ((*R*)-aziridin-2-karbonil)-D-glutaminske kisline (FDF 80)



Spojino **FDF 80** smo poskušali sintetizirati po sinteznem postopku **D**. Uporabili smo: izhodno spojino **17** (110 mg; 0,45 mmol; 1,00 ekv), MeOH (27,0 mL) in 0,1-molarno raztopino LiOH (27,0 mL; 2,70 mmol; 6,00 ekv). Reakcijsko zmes smo čez noč pustili mešati na ledeni kopeli (temperatura reakcijske zmesi je postopoma dosegla sobno temperaturo). Naslednje jutro smo opazili, da je lisa izhodne spojine izginila, zato smo uravnali pH reakcijske zmesi na pH = 7 z 0,1-molarno raztopino HCl in topilo uparili pod znižanim tlakom. Z ^1H NMR eksperimentom smo ugotovili, da je v reakciji najverjetneje nastal produkt, vendar je bilo v reakcijski zmesi tudi veliko nečistot, zato smo produkt poskušali očistiti s kolonsko kromatografijo. Kot MF smo na začetku uporabili EtOAc : MeOH : H₂O = 4 : 3 : 1 in jo čez čas zamenjali za EtOAc : MeOH : H₂O = 2 : 3 : 1 (kot stacionarno fazo smo uporabili silikagel). Zbrali smo frakcije F9–13, F7–8 in F14–20 in s pomočjo analiz MS in NMR ugotovili, da se v vseh treh frakcijah nahaja produkt, vendar je bilo v vseh frakcijah tudi veliko nečistot, zato smo vse tri frakcije združili in še enkrat naredili kolonsko kromatografijo. Kot stacionarno fazo smo tokrat uporabili Al₂O₃, kot MF pa EtOAc : MeOH : H₂O = 4 : 2 : 1. Zbrali smo več kot 100 frakcij in spirali kolono s čistim metanolom, vendar s TLC nismo zaznali elucije spojin iz kolone, zato smo vse frakcije združili in topilo uparili pod znižanim tlakom. Ugotovili smo, da se je iz kolone dalj časa v nizkih koncentracijah eluirala spojina, ki je pred kolono ni bilo v reakcijski zmesi in je imela R_f precej višji od našega produkta. Posneli smo ^1H NMR in ugotovili, da pride med samo kolono najverjetneje do intramolekulske ciklizacije produkta in ga zato nismo uspeli uspešno izolirati.

4.5.2. Poskus sinteze benzil (*R*)-1-(*D*-alanil)aziridin-2-karboksilata (FDF 98, FDF 99, FDF 100, FDF 113)



Prvi postopek (**FDF 98 in FDF 99**):

Izhodno spojino **31** (43 mg; 0,12 mmol; 1,0 ekv) smo raztopili v dietil etru (3,7 mL), raztopino postavili na ledeno kopel in jo prepihali z argonom (delamo v brezvodnih pogojih). Ohlajeni reakcijski zmesi smo med močnim mešanjem po kapljicah dodajali 2-molarno raztopino HCl v dietil etru (186 μ L; 0,370 mmol; 3,0 ekv; končna koncentracija v reakcijski zmesi 0,1 M). Lisa izhodne spojine je po dvajsetih minutah izginila. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom, posneli ^1H NMR in ugotovili, da je prišlo do acidolize amidne vezi, zato smo izvedli še eno podobno reakcijo, le da smo pri tej dodali 37 mL topila, namesto 3,7 mL. S tem smo zmanjšali koncentracijo HCl v reakcijski zmesi z 0,1 M na 0,01 M, saj smo sklepali, da je acidoliza amida posledica prevelike koncentracije kisline. Ker je tudi v tem primeru prišlo do acidolize amidne vezi, smo v nadaljnjih poskusih odščitne skupine Boc HCl zamenjali s CF_3COOH .

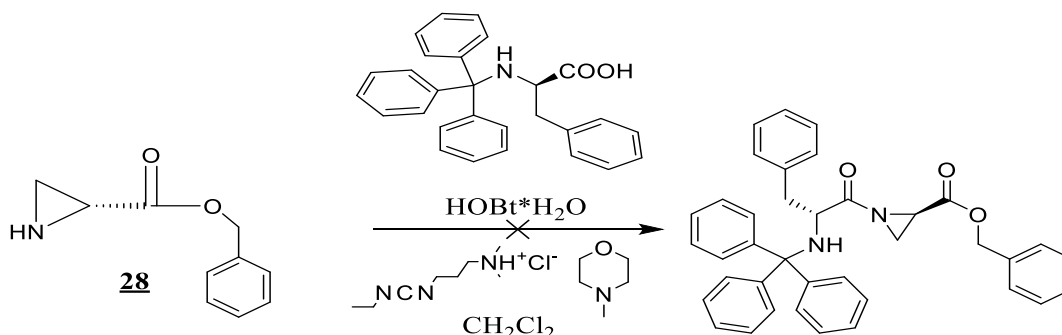
Drugi postopek (**FDF 100**):

Izhodno spojino **31** (31 mg; 0,089 mmol; 1,0 ekv) smo raztopili v brezvodnem THF-u, raztopino postavili na ledeno kopel in jo prepihali z argonom (delamo v brezvodnih pogojih). Ohlajeni reakcijski zmesi smo med močnim mešanjem po kapljicah dodajali CF_3COOH (21 μ L; 0,27 mmol; 3,0 ekv). Ker po eni uri reakcija ni potekla (potek smo spremljali s TLC), smo v reakcijsko zmes po kapljicah dodali 185 μ L CF_3COOH in pustili mešati na ledeni kopeli. Ta postopek smo ponovili še enkrat, saj smo po eni uri od dodatka CF_3COOH ugotovili, da reakcija še zmeraj ni potekla. Lisa izhodne spojine je eno uro po zadnjem dodatku kisline izginila. Topilo smo uparili pod znižanim tlakom, posneli ^1H NMR ter ugotovili, da ni prišlo do odšcite zaščitne skupine Boc, ampak do odprtja aziridinskega obroča. Acidolizo zaščitne skupine Boc s CF_3COOH smo poskusili izvesti še v brezvodnem CH_2Cl_2 in ob prisotnosti trietil silana.

Tretji postopek (**FDF 113**):

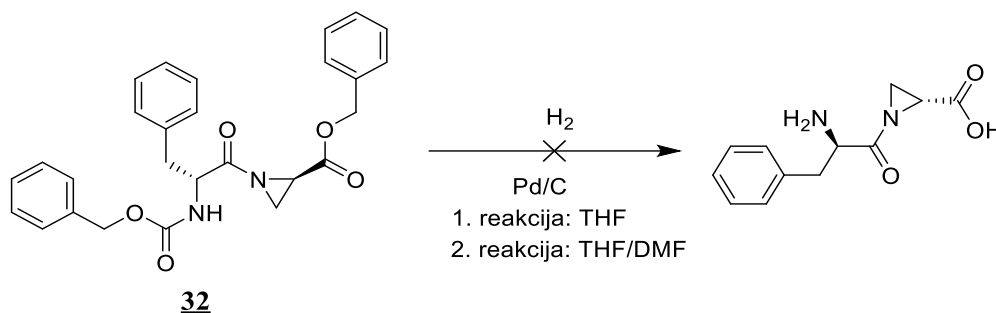
Izhodno spojino **31** (52 mg; 0,15 mmol; 1,0 ekv) smo raztopili v brezvodnem CH₂Cl₂ (8 mL), raztopino postavili na ledeno kopel in jo prepihali z argonom (delamo v brezvodnih pogojih). Ohlajeni reakcijski zmesi smo dodali trietil silan (36 µL; 0,22 mmol; 1,5 ekv) in po kapljicah CF₃COOH (35 µL; 0,45 mmol; 3,0 ekv). Reakcijsko zmes smo čez noč pustili mešati na ledeni kopeli (temperatura reakcijske zmesi je postopoma dosegla sobno temperaturo). Po 24 urah je lisa izhodne spojine izginila, zato smo topilo uparili pod znižanim tlakom in posneli ¹H NMR. Ugotovili smo, da je prišlo do odprtja aziridinskega obroča, zaščitna skupina Boc pa je bila še zmeraj prisotna na molekuli. Iz tega lahko sklepamo, da je aziridinski obroč bolj reaktiven kot karbamat, kar pomeni, da bomo z acidolizo težko selektivno odstranili zaščitno skupino Boc, brez da bi pri tem prišlo do acidolize amida ali odprtja aziridina.

4.5.3. Poskus sinteze benzil (*R*)-1-(tritol-D-fenilalanil)aziridin-2-karboksilata (**FDF 110**)



Spojino **FDF 110** smo poskušali sintetizirati po sinteznem postopku **B**. Uporabili smo: izhodno spojino **28** (105 mg; 0,593 mmol; 1,00 ekv), CH₂Cl₂ (6 mL), tritol-D-fenilalanin (266 mg; 0,652 mmol; 1,10 ekv), HOBT (100 mg; 0,652 mmol; 1,10 ekv), NMM (195 µL; 1,78 mmol; 3,00 ekv) in EDC (125 mg; 0,652 mmol; 1,10 ekv). ¹H NMR reakcijske zmesi je bil nejasen, zato smo produkt poskušali očistiti s kolonsko kromatografijo (MF: heksan : EtOAc = 2 : 1, stacionarna faza: silikagel). Zbrali smo tri frakcije (F4-8, F9-15, F16-19) in z MS in ¹H NMR eksperimentoma ugotovili, da v nobeni izmed frakcij ni bilo želenega produkta.

4.5.4. Poskus sinteze (*R*)-1-(*D*-fenilalanil)aziridin-2-karboksilne kisline (FDF 117, FDF 118)



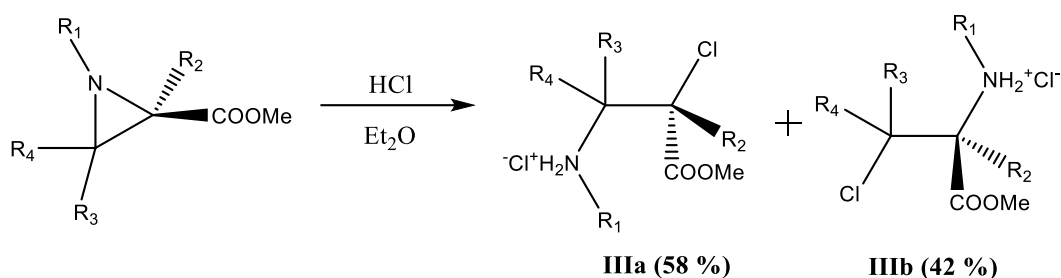
Izhodno spojino **32** (500 mg; 1,09 mmol; 1,00 ekv) smo raztopili v brezvodnem THF (40 mL) in reakcijsko zmes postavili na ledeno kopel. Ohlajeno reakcijsko zmes smo 40 minut prepihovali z argonom in nato dodali paladij na ogljiku (Pd/C; 200 mg; 40 masnih %) ter začeli nastalo suspenzijo prepihovati z vodikom. Po eni uri prepihovanja smo reakcijsko zmes premaknili z ledene kopeli na sobno temperaturo in začeli z vodikom prepihovati samo atmosfero. Ker po enem dnevu reakcija še ni potekla, smo dodali dodatnih 200 mg Pd/C. Po končani reakciji (reakcija je potekla v dveh urah po dodatku Pd/C) smo odstranili paladij s filtracijo ter topilo uparili pod znižanim tlakom. Posneli smo ^1H spekter, ki je bil nejasen, zato smo poskušali potencialen produkt očistiti s kolonsko kromatografijo. Kot MF smo na začetku uporabili EtOAc : MeOH = 2 : 1 in jo postopoma zamenjali za EtOAc : MeOH : H₂O = 2 : 1 : 1. Zbrali smo 5 različnih frakcij in z ^1H NMR eksperimentom ugotovili, da v nobeni izmed njih ni bilo produkta.

Drugi poskus odščite benzilnih skupin smo izvedli popolnoma enako kot prvega, razlikovala sta se le v topilu. V tem primeru smo uporabili 10-odstotni DMF v THF (40 mL), vse ostale količine so ostale enake. Reakcija je v tem primeru potekla po petih urah. Potencialen produkt smo enako kot v prejšnjem primeru poskusili očistiti s kolonsko kromatografijo, vendar v nobeni izmed izoliranih frakcij ni bilo zelenega produkta.

5. REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1. Aziridinski gradnik

Aziridinski gradnik predstavlja rigidiziran mimetik aminokislina Ala. Vezi med atomi, ki sestavljajo tricikel, so pod kotom 60° , kar je posledično vzrok velike obročne napetosti in reaktivnosti aziridinov. Najpogosteje reagirajo z nukleofili, kar vodi v odprtje obroča in sprostitvev napetosti.



Slika 18: Odprtje aziridinskega obroča in nastanek produktov **IIIa** in **IIIb**. Številke v oklepajih predstavljajo razmerje med enim in drugim produktom v primeru, da je $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$.

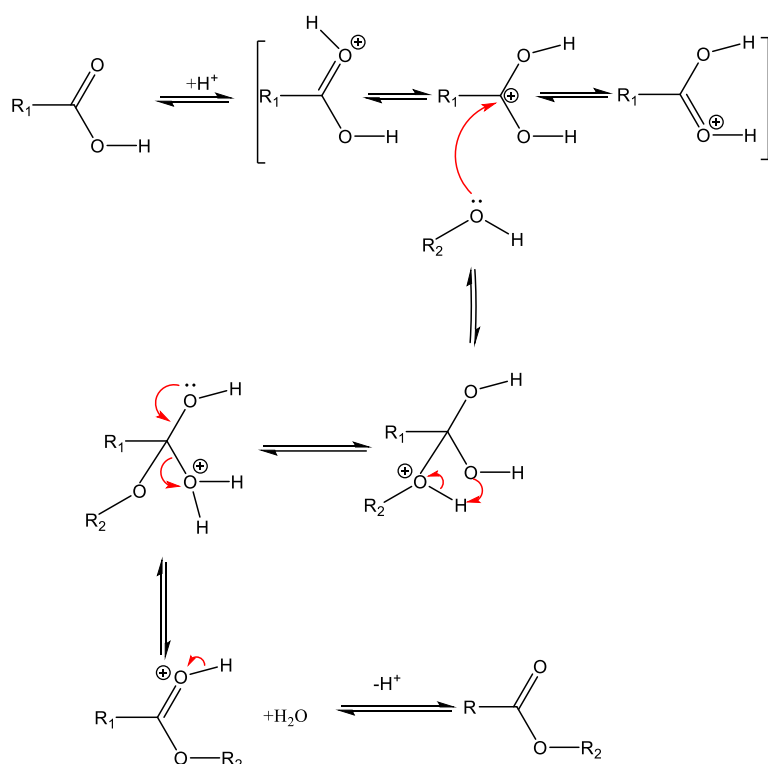
Pri reakciji z nukleofili dobimo dva možna produkta, **IIIa** in **IIIb** (slika 18). Razmerje med njima je odvisno od mesta napada nukleofila, le-to pa je odvisno od substituentov R , ki so vezani na aziridinski obroč. Substituenti vplivajo na mesto napada preko steričnih in elektronskih vplivov. Z ustrezno izbiro substituentov lahko dosežemo regio- in stereoselektivno odpiranje aziridinskega obroča, zato predstavljajo aziridini zelo pomembne gradnike v organski kemiji [40, 41].

5.2. Razprava o sinteznih postopkih

5.2.1. Zaščita karboksilne kisline z metilnim estrom

Izhodno aminokislino smo raztopili v MeOH in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Nato smo s kapalnikom po kapljicah dodajali SOCl_2 . Reakcijo smo izvajali na ledeni kopeli, saj je reakcija med MeOH in SOCl_2 eksotermna (sprošča se toplota). Pri izolaciji smo raztopino najprej skoncentrirali pod znižanim tlakom, nato pa dodali dietil eter, da smo lažje uparili HCl , ki je nastala kot stranski produkt reakcije. Za tekočine, ki se idealno mešajo (ker imamo velik prebitek dietil etra glede na HCl , lahko naredimo to predpostavko), velja Raoultov zakon, ki pravi, da je parni tlak idealne raztopine odvisen od parnega tlaka posamezne komponente in njenega molskega deleža v raztopini. Z dodatkom dietil etra povečamo njegov molski delež v raztopini in ker ima višji parni tlak od HCl , se s tem prav tako poveša tudi skupni parni tlak raztopine, kar omogoči lažje odstranjevanje HCl [42]. Tvorba etra je možna po dveh različnih mehanizmih. Pri prvem mehanizmu naj bi najprej prišlo do substitucije skupine COOH s Cl , kar bi vodilo v nastanek reaktivnega kislinkega klorida, ki

bi nato reagiral z MeOH in bi preko nukleofilne substitucije dobili metilni ester. Pri drugem mehanizmu pa bi naj najprej prišlo do reakcije med MeOH in SOCl_2 , kar bi vodilo v nastanek HCl, ki bi povzročila kislinsko katalizirano esterifikacijo (Fischerjeva esterifikacija). Pri Fischerjevi esterifikaciji (slika 19) pride najprej do protonacije karboksilne kisline (zato je potreben kisel medij), zaradi česar postane le-ta bolj elektrofilna. Sledi ji nukleofilen napad alkohola, ki vodi v nastanek nestabilnega tetraedričnega intermedjata, pri katerem nato pride do izmenjave protona in eliminacije vode. Tako nastaneta ester in stranski produkt voda. Mehanizem kislinsko katalizirane esterifikacije je veliko bolj verjeten, saj je MeOH v velikem prebitku glede na D-serin in je ob dodatku SOCl_2 v reakcijsko zmes veliko večja verjetnost, da bo le-ta reagiral z MeOH. Na ta način smo sintetizirali spojine **1**, **5–7**.



Slika 19: Mehanizem kislinsko katalizirane esterifikacije (Fischerjeva esterifikacija).

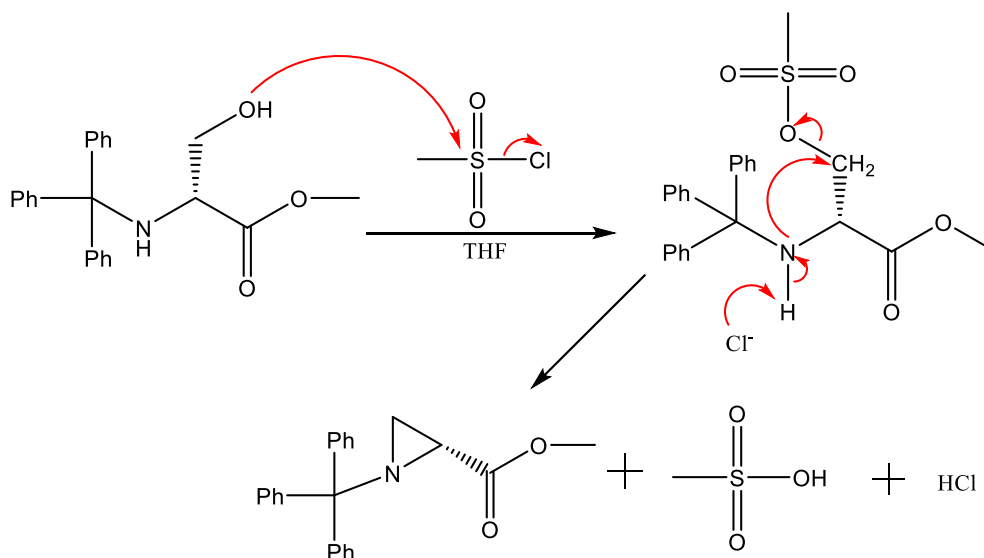
5.2.2. Zaščita amino skupine s tritilno zaščitno skupino

Izhodno spojino smo raztopili v CH_2Cl_2 , dodali bazo Et_3N ter preverili pH, ki je moral biti bazičen. Bazičen pH je pomemben za pretvorbo NH_3^+ v neprotonirano obliko NH_2 , ki je veliko bolj nukleofilna, pa tudi za nevtralizacijo HCl, ki nastaja kot stranski produkt reakcije. Reakcijsko zmes smo postavili na ledeno kopel in ji dodali tritil klorid. Nizka temperatura je zelo pomembna za selektivnost reakcije, saj imamo v molekuli D-Ser-OMe dve nukleofilni skupini, in sicer OH in NH_2 . NH_2 je močnejši nukleofil, z nizko temperaturo pa še dodatno zmanjšamo verjetno za nastanek *O*-tritilirane oziroma *N*- in *O*-ditritilirane stranskega

produkta. Ekstrakcijo smo izvedli s citronsko kislino, da smo se znebili Et_3N in morebitnih sledi izhodne spojine, ter z nasičeno vodno raztopino NaCl , da smo se znebili ostankov vode v organski fazi. Reakcija je potekla po mehanizmu $\text{S}_{\text{N}}1$ (nukleofilna substitucija). Najprej je prišlo do eliminacije Cl in tvorbe karbokationa $\text{C}(\text{Ph})_3^+$, sledil je nukleofilni napad NH_2 skupine serina na karbokation $\text{C}(\text{Ph})_3^+$ in na koncu še deprotonacija NH_2^+ do NH . Tako smo sintetizirali spojini **2** in **26**.

5.2.3. Tvorba aziridina (**3** in **27**)

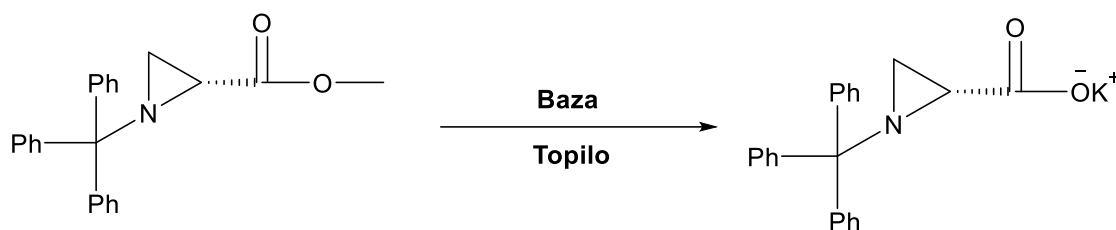
Izhodno spojino smo raztopili v brezvodnem THF, po delih dodali Et_3N in reakcijsko zmes ohladili na ledeni kopeli. Nato smo po kapljicah dodali metansulfonil klorid. Pri reakciji je najprej prišlo do aktivacije OH skupine z MeSO_2Cl , tako je nastal vmesni produkt $\text{R-O-SO}_2\text{Me}$, ki predstavlja dobro izstopajočo skupino (slika 20). V naslednjih korakih je prišlo do nukleofilnega napada NH skupine in eliminacije metansulfonske kisline (MeSO_3H), kar je privedlo do tvorbe aziridinskega obroča (mehanizem $\text{S}_{\text{N}}2$). Kot stranska produkta sta pri reakciji nastali kislini MeSO_3H in HCl , ki sta se zaradi prisotnosti baze Et_3N takoj po nastanku nevtralizirali [43]. Če kislin ne bi nevtralizirali, bi lahko prišlo do protonacije NH skupine in bi dobili NH_2^+ , ki je veliko šibkejši nukleofil. Reakcijo smo izvajali na ledeni kopeli, saj pride ob dodatku MeSO_2Cl do eksotermne reakcije. Po zaključku reakcije smo topilo uparili pod znižanim tlakom, trdni preostanek raztopili v EtOAc in izvedli ekstrakcijo. Pri ekstrakciji z 10-odstotno citronsko kislino smo se znebili nečistot z bazičnimi lastnostmi in soli: Et_3N , $\text{Et}_3\text{NH}^+\text{MeSO}_3^-$ in $\text{Et}_3\text{NH}^+\text{Cl}^-$. Pri ekstrakciji z nasičeno raztopino NaHCO_3 pa smo se znebili morebitnih ostankov kislin: MeSO_3H in HCl .



Slika 20: Mehanizem tvorbe aziridina.

5.2.4. Hidroliza metilnega estra s KOH

Hidrolizo metilnega estra smo poskusili izvesti v različnih razmerah (slika 21). Vse preizkušene kombinacije so predstavljene v preglednici II. Kot najboljša se je izkazala kombinacija 1-molarne raztopine KOH in topila THF, saj smo pri njej dobili najbolj čist produkt in najboljši izkoristek. Izhodno spojino smo raztopili v THF in jo postavili na ledeno kopel ter po delih k ohlajeni reakcijski zmesi dodali 1-molarno raztopino KOH. Potekla je bazično katalizirana hidroliza estrske vezi (slika 22). Po zaključku reakcije smo produktu odstranili topilo pod znižanim tlakom in ga pustili v obliki soli. Reakcijo smo izvajali na ledeni kopeli, da smo zmanjšali verjetnost hidrolize aziridina. Kot stranski produkt je nastal MeOH, ki smo se ga znebili z uparovanjem pod znižanim tlakom. Na ta način smo sintetizirali spojino **4**.

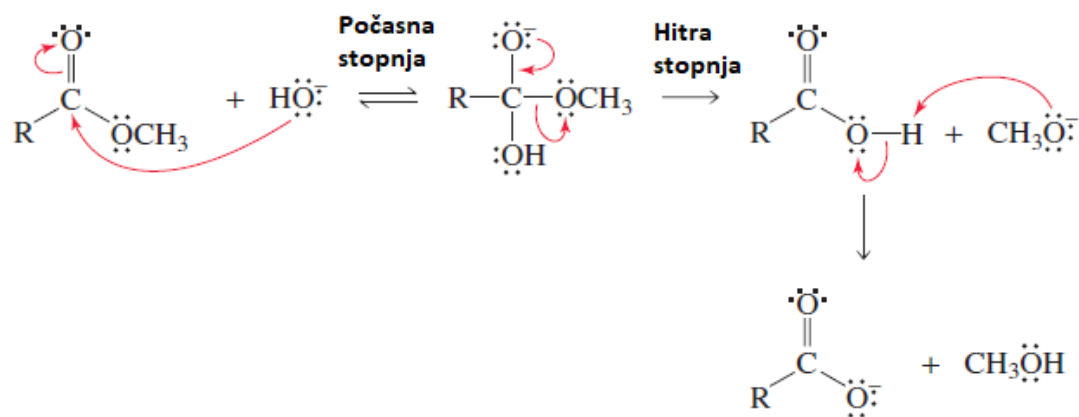


Slika 21: Reakcijska shema bazične hidrolize metilnega estra.

Preglednica II: Preizkušene kombinacije hidroksidov in topil.

Baza	Topilo
NaOH (1 M)	H ₂ O/THF
LiOH (1 M)	H ₂ O/THF
NaOH (1,5 M)	ACN
NaOH (1 M)	THF
NaOH (0,5 M)	ACN
KOH (1 M)	THF
KOH (1 M)	EtOH

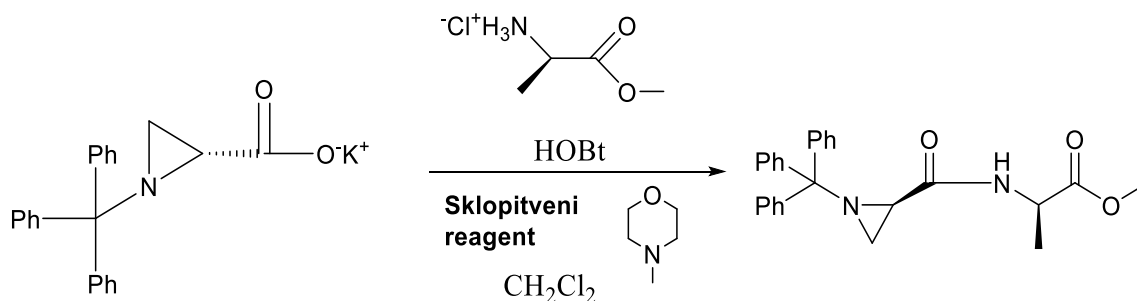
Produkt smo poskusili izolirati z njegovo pretvorbo v neionizirano obliko. Po poteku reakcije smo reakcijsko zmes nakisali do pH 5–6 z 1-molarno raztopino HCl in izvedli ekstrakcijo s CH₂Cl₂. Ugotovili smo, da je prišlo ob pretvorbi karboksilne kisline v neionizirano obliko do hidrolize aziridinskega obroča. Produkt smo poskusili očistiti tudi s kolonsko kromatografijo, vendar je tudi v tem primeru prišlo do hidrolize aziridina.



Slika 22: Mehanizem bazično katalizirane hidrolize estrske vezi.

5.2.5. Sklopitvene reakcije

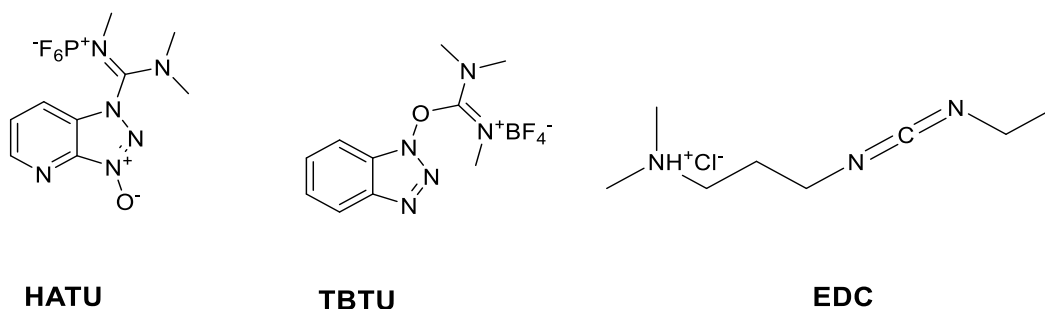
V naslednjih stopnjah smo osnovni aziridinski gradnik (**4**, **28**) sklopili z različnimi aminokislinami (slika 23). Za potek reakcije smo morali aktivirati karboksilno kislino. To smo dosegli s pomočjo sklopitvenih reagentov in HOBt. V literaturi navajajo, da je pri reakciji s sklopitvenim reagentom HATU najmanjša verjetnost epimerizacije ter da reakcija poteče hitreje kot pri uporabi drugih dveh sklopitvenih reagentov (EDC in TBTU) [44]. Da bi ugotovili, kateri sklopitveni reagent je najprimernejši, smo naredili 3 poskusne reakcije (rezultati so zbrani v preglednici III). Strukturne formule sklopitvenih reagentov so prikazane na sliki 24.



Slika 23: Reakcijska shema sklopitvene reakcije.

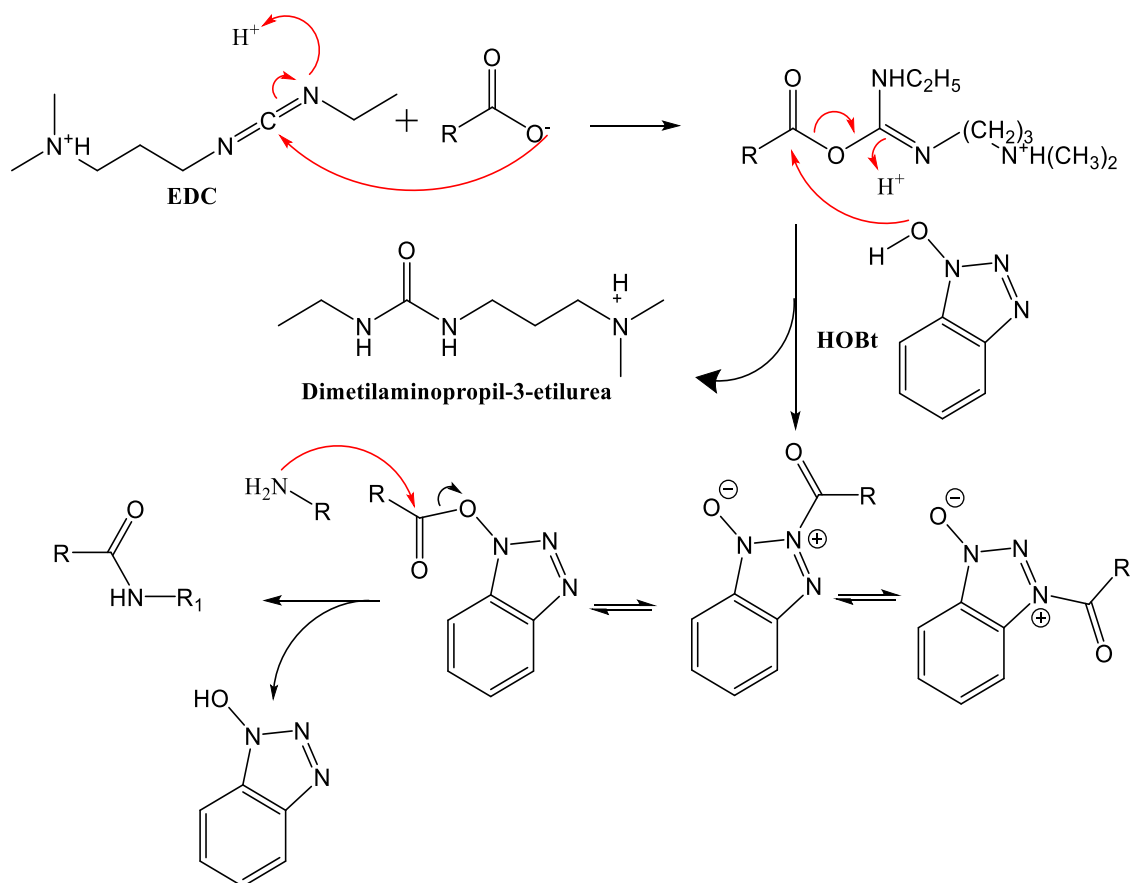
Preglednica III: Izkoristki reakcij pri uporabi različnih sklopitvenih reagentov.

Sklopitveni reagent	Izkoristek
EDC	53,11 %
HATU	45,23 %
TBTU	47,12 %



Slika 24: Sklopitveni reagenti HATU, TBTU in EDC.

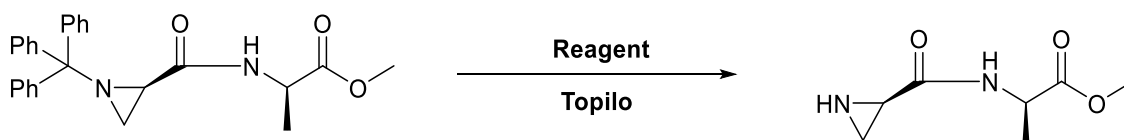
Izhodno spojino smo raztopili v CH_2Cl_2 , dodali različne zaščitene aminokislino in postavili reakcijsko zmes na ledeno kopel. Ohlajeni reakcijski zmesi smo dodali HOBt, NMM in na koncu EDC. Reakcijsko zmes smo čez noč pustili mešati na ledeni kopeli. NMM je imel vlogo baze, ki je zagotavljala, da je amino skupina v neprotonirani obliki in karboksilna kislina v ionizirani (karboksilatni) obliki. Nukleofilni karboksilat je napadel elektrofilni ogljikov atom karbodiimidne skupine na EDC, pri čemer je nastal reaktiven *O*-acilsečninski intermediat (slika 25). Ta intermediat lahko direktno reagira z aminom do želenega amida, vendar obstaja velika nevarnost racemizacije in prenosa acetilne skupine iz O na N ter tvorbe nereaktivne *N*-acilsečnine. Temu smo se izognili z dodatkom sklopitvenega reagenta pri nizkih temperaturah in z dodatkom nukleofila HOBt, ki je hitro reagiral z *O*-acilsečninskim intermediatom ter s tem preprečil prenos acetilne skupine. HOBt je reagiral z *O*-acilsečnino in tvoril aktivirane benzotriazolne estre, pri katerih poteče aminoliza veliko hitreje. Na ta način smo zmanjšali obseg neželenih stranskih reakcij (racemizacije, premestitve) in povečali izkoristek reakcije [44]. Aktivacija poteče hitreje v nepolarnih topilih, zato smo reakcijo izvedli v CH_2Cl_2 . Produkt smo očistili z ekstrakcijo. Pri ekstrakciji z 10-odstotno citronsko kislino smo se znebili nečistot z bazičnimi lastnostmi: prebitnega EDC in njegovega sečninskega derivata, ki je pri reakciji nastal kot stranski produkt, NMM in izhodnega amina. Pri ekstrakciji z nasičeno vodno raztopino NaHCO_3 pa smo se znebili nečistot s kislimi lastnostmi: nezreagirane izhodne kisline in HOBt. Po tem reakcijskem mehanizmu smo sintetizirali spojine **8–13**, **31** in **32**.



Slika 25: Mehanizem tvorbe amidne vezi z uporabo reagentov EDC in HOBt.

5.2.6. Odstranitev tritilne zaščitne skupine

V naslednji stopnji smo odstranili tritilno zaščitno skupino z amina (slika 26). Reakcijo smo izvedli po štirih različnih postopkih (preglednica IV).

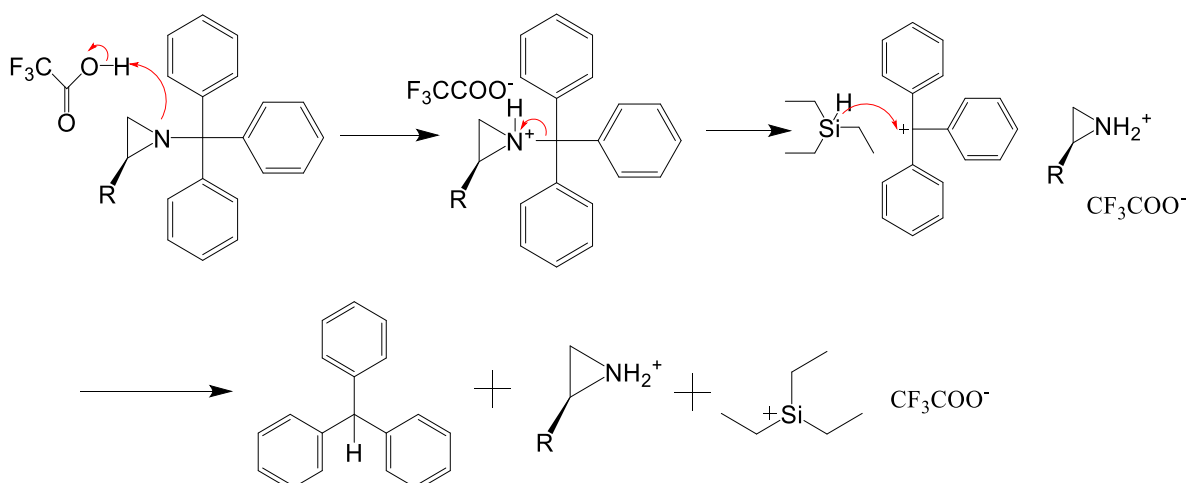


Slika 26: Reakcijska shema odstranitve tritilne zaščitne skupine.

Preglednica IV: Različni pogoji pri poskusih odstranitve tritilne zaščitne skupine.

Topilo	Reagent	Reakcijski pogoji	Produkt
CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 1 : 1	CF ₃ COOH	0 °C	Odprt aziridinski obroč
CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 1 : 1	CF ₃ COOH	-20 °C	Odprt aziridinski obroč
CH ₂ Cl ₂	CF ₃ COOH	0 °C	Odprt aziridinski obroč
CH ₂ Cl ₂	CF ₃ COOH + Et ₃ SiH	0 °C	Spojina 14 (izkoristek 52,66 %)

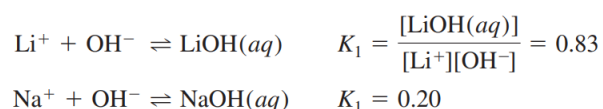
Uspešna je bila sinteza, pri kateri smo kot reagenta uporabili CF_3COOH in trietilsilan. Izhodno spojino smo raztopili v CH_2Cl_2 in raztopino postavili na ledeno kopel. Ohlajeni reakcijski zmesi smo dodali trietilsilan, za tem pa po kapljicah CF_3COOH . Najprej je prišlo do protonacije aziridinske amino skupine, sledil ji je odcep tritilne skupine in nastanek produkta (odščitenega amina) ter reaktivnega karbokationa (slika 27). Et_3SiH je deloval kot donor hidridnega iona (H^-). Po nastanku reaktivnega karbokationa je potekel prenos H^- iz Et_3SiH na karbokation. Tako je nastal veliko manj reaktiven trifenilmetan in kation Et_3Si^+ . Glede na rezultate poskusnih reakcij lahko sklepamo, da je dodatek Et_3SiH ključen, saj je v primeru, ko ga nismo dodali, prišlo do odprtja aziridinskega obroča. Po koncu reakcije smo pod znižanim tlakom uparili topilo ter trdni preostanek ekstrahirali z dietil etrom in vodo. Ker je bil naš produkt v obliki soli, je šel v vodno fazo, v etrni fazi pa je ostal trifenilmetan. Pri sintezi spojine **28** smo namesto dietil etra uporabili heksan, saj je imel produkt zaradi benzilne zaščitne skupine bolj lipofilne lastnosti in se je delno ekstrahiral tudi v etrno fazo. Vodni fazi smo nato dodali NaHCO_3 , da smo dobili raztopino s pH 10 in s tem pretvorili naš produkt v neprotonirano obliko. Za zmanjšanje topnosti produkta (izsoljevanje) smo vodni fazi dodali še NaCl , nato pa izvedli ekstrakcijo z EtOAc . Izsoljevanje je posledica zmanjšanja solvatacije molekul produkta. Ob dodatku soli namreč le-ta odtegne molekule vode, kar povzroči, da postanejo interakcije med molekulami produkta močnejše kot tiste med produktom in topilom. Naš produkt se je ekstrahiral v organsko fazo, v vodni fazi pa sta ostala iona Et_3Si^+ in CF_3COO^- . Tako smo sintetizirali spojine **14–19** in **28**.



Slika 27: Mehanizem odstranitve tritilne zaščitne skupine z uporabo reagentov CF_3COOH in Et_3SiH

5.2.7. Hidroliza metilnega estra z LiOH

Zadnja stopnja v sintezi dipeptidov **20–24** je bila odstranitev metilnega estra. Izhodne spojine smo raztopili v MeOH in jih postavili na ledeno kopel. Ohlajenim reakcijskim zmesem smo s pomočjo kapalnika po kapljicah dodajali 0,1-molarno raztopino LiOH. Reakcijo smo izvajali na ledeni kopeli, da smo zmanjšali verjetnost napada nukleofila OH⁻ na aziridin. Kot bazo smo v tem primeru uporabili LiOH, ki je najšibkejša baza med alkalijskimi hidroksidi in tako predstavlja najmanjše tveganje za stranske reakcije na aziridinu. Litij je med alkalijskimi kovinami najbolj elektronegativen, zato ima litijev hidroksid manj ionski značaj (le-ta je odvisen od razlike v elektronegativnosti med kationom in anionom) od drugih alkalijskih hidroksidov, kar pomeni, da v vodni raztopini disociira v manjši meri glede na druge. To potrjuje dejstvo, da konstanta asociacije za LiOH (aq) znaša 0,83, za NaOH (aq) 0,20, pri KOH (aq), RbOH (aq) in CsOH (aq) pa je koncentracija nedisociirane oblike v raztopini tako majhna, da jo lahko zanemarimo (slika 28) [45]. Večja konstanta asociacije pomeni, da je v raztopini manj Li⁺ in OH⁻ ionov, manj OH⁻ pa neposredno korelira z manjšo bazičnostjo. Po poteku reakcije smo uravnali pH reakcijske zmesi na pH = 7 in topilo uparili pod znižanim tlakom. pH smo uravnali, da smo pretvorili dipeptid v ion dvojček, saj je v tej obliki najbolj stabilen. Mehanizem hidrolize estrov s hidroksidi smo že prikazali na sliki 22.



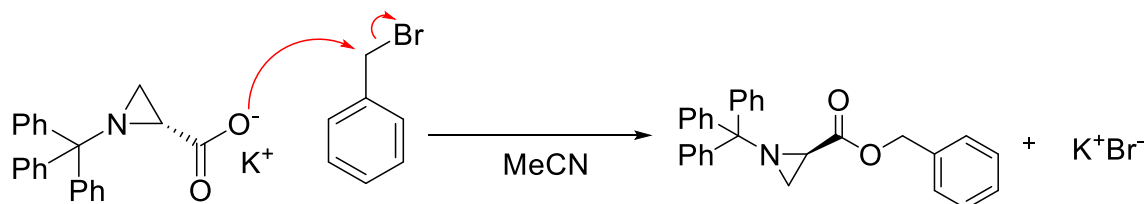
Slika 28: Konstanta asociacije za LiOH (aq) in NaOH (aq), prirejeno po [45].

Za drugi tip dipeptidov, ki so imeli na prvem mestu vezane različne D-aminokisljine in na drugem mestu aziridin, smo ubrali drugačen sintezni pristop. Te spojine imajo v strukturi aktiviran amid in reaktiven aziridinski obroč. Amidna vez je nestabilna, ker ima aziridinski amin v primerjavi z alifatskim aminom majhno elektronsko gostoto (primanjkljaj elektronov), medtem ko je aziridinski obroč pri tem tipu spojin še bolj reaktiven, ker smo na obročni dušik vezali karboksilno skupino, kar je vodilo v dodatno zmanjšanje elektronske gostote v aziridinskem obroču. Aziridin je tako postal še bolj elektrofilen in posledično bolj dovzeten za napade nukleofilov. Zaradi potencialne nestabilnosti smo se odločili, da bomo COOH skupino osnovnega aziridina zaščitili z benzilno zaščitno skupino, ki jo

odstranjujemo v relativno blagih pogojih katalitskega hidrogeniranja, saj aktiviran amid in aziridin najverjetneje ne bi bila obstojna pri pogojih bazične hidrolize estrov.

5.2.8. Sinteza benzil (*R*)-1-tritilaziridin-2-karboksilata (**27**) in sklopitev do končnih spojin **31** in **32**

Sintezo benzil (*R*)-1-tritilaziridin-2-karboksilata (**27**) smo izvedli po dveh različnih sinteznih postopkih. Pri prvem sinteznem postopku smo izhajali iz izhodne spojine **4**, ki smo jo raztopili v ACN in raztopino postavili na ledeno kopel. Ohlajeni reakcijski zmesi smo dodali benzil bromid. Reakcija je potekla po reakcijskem mehanizmu S_N2 (nukleofilna substitucija), saj je prišlo do nukleofilnega napada karboksilata na benzilno CH₂ skupino (nastane tetraedrični intermediat), ki ji je sledil odcep bromida (slika 29). Kot stranski produkt je nastala sol KBr, ki smo se je znebili med ekstrakcijo z CH₂Cl₂ in vodo (produkt ostane v organski fazi, KBr gre v vodo). Ključno vlogo pri reakciji ima topilo, saj je reakcija, pri kateri smo kot topilo uporabili ACN, potekla po treh urah, medtem ko popolnoma enaka reakcija, pri kateri smo kot topilo uporabili THF, ni potekla do konca niti po enem dnevu. Pri reakcijah, ki potekajo po reakcijskem mehanizmu S_N2 je ključna uporaba polarnih aprotičnih topil (med katere spadata tudi ACN in THF), saj le-ta, za razliko od polarnih protičnih topil, ne zmanjšajo nukleofilnosti izhodne spojine in stabilizirajo tetraedrični intermediat ter s tem omogočajo potek reakcije. ACN je bolj polaren od THF zato potencialno bolje stabilizira tetraedrični intermediat in s tem izboljša potek reakcije. Drugi možen razlog za boljši potek reakcije v ACN je slaba topnost izhodne spojine (**4**) v THF [46].



Slika 29: Reakcijski mehanizem benziliranja z benzil bromidom.

Pri drugem sinteznem postopku smo izhajali iz D-serina, ki smo mu v prvi stopnji zaščitili karboksilno kislino z benzilnim estrom (**25**). D-serin smo raztopili v benzenu, mu dodali *p*-toluensulfonsko kislino in na koncu benzilni alkohol. Reakcijsko zmes smo segreli do temperature refluxa in jo pustili refluktirati čez noč. Potekla je kislinsko katalizirana tvorba estra (Fischerjeva esterifikacija), ki smo jo že predstavili na sliki 18. Kislinsko katalizirana tvorba estra je ravnotežna reakcija. Ravnotežje lahko premaknemo v smer produktov (estra) tako, da dodamo prebitek enega izmed reagentov (v našem primeru smo dodali prebitek

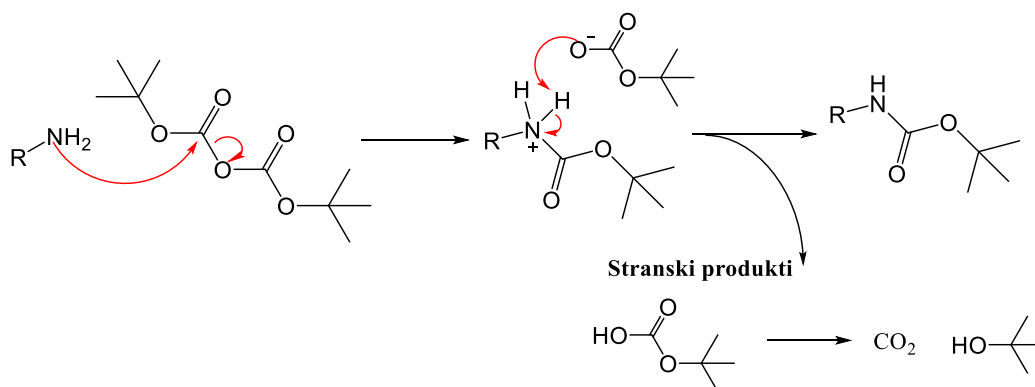
benzilnega alkohola). Pri reakciji kot stranski produkt nastaja voda, ki lahko povzroči premik ravnotežja v smeri reaktantov (v smeri hidrolize estra), zato je zelo pomembno, da jo med samo reakcijo sproti odstranjujemo. Kot topilo smo zato uporabili benzen, ki z vodo tvori azeotropno zmes (temperatura vrelišča 69,3 °C; 91,2 masnih % benzena in 8,8 % vode) in nam omogoča sprotno odstranjevanje vode [47]. Prednost benzena je tudi v tem, da ima relativno nizko temperaturo vrelišča, saj je serin pri visokih temperaturah in v kislih razmerah nestabilen. Po zaključku reakcije smo pod znižanim tlakom uparili benzen, trdnemu preostanku dodali dietil eter in vodo ter izvedli ekstrakcijo. Produkt je bil v ionizirani obliki ($\text{RNH}_3^+\text{pTsO}^-$) in se je nahajal v vodni fazi. V etrno fazo se je izločil nezreagirani benzilni alkohol, ki smo se ga na ta način znebili. Etrno fazo smo ekstrahirali tudi z 1-molarno raztopino HCl, saj smo ugotovili, da se je v njej po prvi ekstrakciji še vedno nahajalo nekaj produkta. Vodne faze smo nato združili in jim dodali Na_2CO_3 , da smo dobili raztopino s pH 10 ter tako pretvorili produkt v neionizirano obliko. Vodno fazo smo ekstrahirali najprej z dietil etrom in nato še EtOAc. Naš produkt se je ekstrahiral v organsko fazo, v vodni fazi pa sta ostala pTsOH in nezreagirani D-serin. EtOAc smo uparili in suhi preostanek raztopili v etru. Združenim etrnim fazam smo dodali 2-molarno raztopino HCl v dietil etru in s tem pretvorili produkt v ionizirano obliko ($\text{RNH}_3^+\text{Cl}^-$). Produkt (spojina **30**) se je v etru izoboril, zato smo ga samo odnučali.

V naslednjih stopnjah smo spojini **25** zaščitili amino skupino s tritilom (**26**) in izvedli ciklizacijo do aziridina z MeSOCl_2 in Et_3N po že prej opisanih mehanizmih. Tako smo sintetizirali produkt benzil (*R*)-1-tritilaziridin-2-karboksilat (**27**), ki smo mu v naslednji stopnji odstranili tritilno zaščito s CF_3COOH v prisotnosti trietilsilana (**28**). Nato smo karboksilne skupine aminokislin *N*-Boc-D-alanin (**29**) in *N*-Cbz-D-fenilalanin (**30**), s pomočjo reagentov EDC, HOBt in NMM, sklopili z aziridinsko amino skupino. Tako smo dobili končna produkta **31** in **32**.

5.2.9. Sinteza Boc-D-alanina (**29**)

Boc-D-alanin (**29**) smo sintetizirali tako, da smo D-alanin raztopili v zmesi 1-molarne raztopine NaOH, vode in dioksana, raztopino postavili na ledeno kopel in počakali, da se ohladi. Nato smo dodali di-*t*-butil dikarbonat (Boc_2O), ki smo ga predhodno raztopili v dioksanu. Reakcija je potekla po mehanizmu $\text{S}_{\text{N}}2$ (slika 30). Najprej je prišlo do nukleofilnega napada amino skupine na karbonil Boc_2O . Sledil mu je odcep *tert*-butil karbonata, ki je v naslednji stopnji odcepil proton iz protoniranega amina in se tako pretvoril

v nestabilni *tert*-butil bikarbonat. Tako smo dobili produkt Boc-D-ala (karbamat), *tert*-butil bikarbonat pa je razpadel na CO₂ in *tert*-butanol, ki sta nastala kot stranska produkta reakcije. Po poteku reakcije smo pod znižanim tlakom uparili dioksan, preostanek dopolnili z vodo in ekstrahirali z dietil etrom. Dioksan in voda tvorita azeotropno zmes s temperaturo vrelišča 87,6 °C (82,2 masnih % dioksana in 17,8 % vode), zato smo z uparivanjem pod znižanim tlakom lahko selektivno odstranili dioksan [48]. Ker smo imeli v reakcijski zmesi bazo (NaOH), je bil produkt v obliki soli (RCOO⁻Na⁺) in je šel v vodno fazo. V etno fazo sta se porazdelila *tert*-butanol in nezreagirani Boc₂O, ki smo se ju na ta način znebili. Vodno fazo smo nato nakisali z 2-molarno raztopino HCl do pH 2 in jo ekstrahirali z EtOAc. Z nakisanjem smo povzročili prehod produkta v neionizirano obliko, ki se bolje porazdeljuje v EtOAc kot v vodo, v vodni fazi pa sta ostali sol NaCl (Na iz NaOH) in nezreagirani D-alanin.

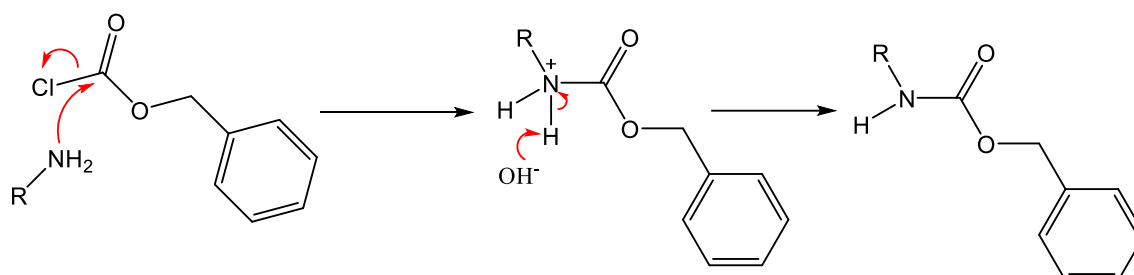


Slika 30: Mehanizem uvedbe Boc zaščitne skupine.

5.2.10. Sinteza *N*-Cbz-D-fenilalanina (**30**)

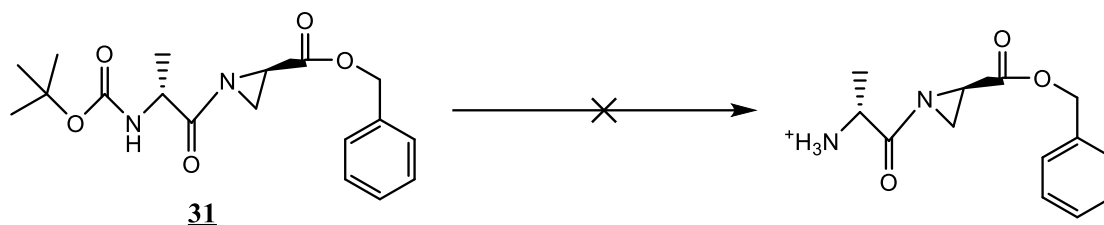
Sintezo *N*-Cbz-D-fenilalanina (**30**) smo izvedli tako, da smo najprej D-fenilalanin raztopili v 1-molarni raztopini NaOH, reakcijsko zmes smo nato postavili na ledeno kopel in počakali, da se ohladi. Nato smo med močnim mešanjem po kapljicah dodajali benzil kloroformat (CbzCl). Reakcija je potekla po mehanizmu S_N2, saj je najprej prišlo do nukleofilnega napada amino skupine, ki ji je sledila eliminacija Cl⁻ (slika 31). V naslednjem koraku je prišlo do deprotonacije protoniranega amina s pomočjo baze NaOH. Kot stranski produkt je nastajala kislina HCl, ki se je takoj po nastanku nevtralizirala z bazo NaOH (nastane sol NaCl). Po zaključku reakcije smo izvedli ekstrakcijo z dietil etrom, pri čemer smo se znebili ostankov benzil kloroformata. Po ekstrakciji smo vodno fazo nakisali z 2-molarno raztopino HCl do pH 2 in jo ekstrahirali z EtOAc. Pri nakisanju je prišlo do pretvorbe produkta v

neionizirano obliko, ki se je porazdelila v organsko fazo, v vodni fazi pa sta ostala nezreagirani D-fenilalanin in NaCl, ki je nastal kot produkt nevtralizacije NaOH s HCl.



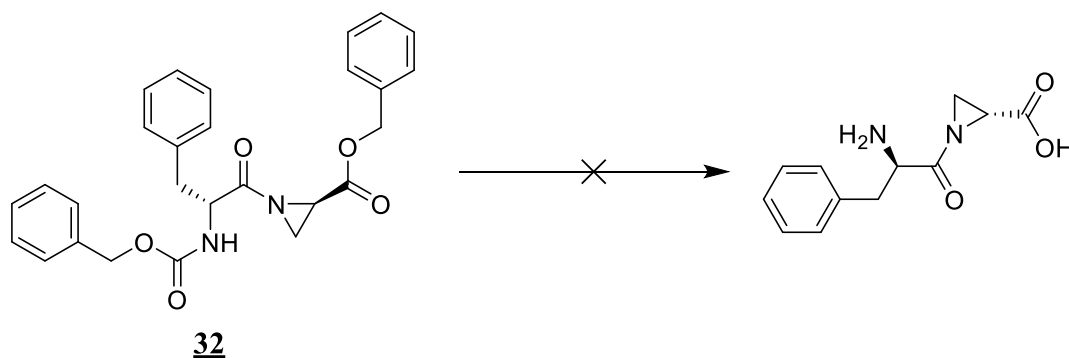
Slika 31: Mehanizem uvedbe Cbz zaščitne skupine.

5.2.11. Poskusne reakcije



Slika 32: Poskusi odstranitve zaščitne skupine Boc.

Poskusi odstranitve zaščitne skupine Boc iz spojine **31** so bili neuspešni (slika 32). Poskusili smo z različnimi koncentracijami HCl in CF_3COOH . Pri poskusih odščite s HCl je tudi pri majhnih koncentracijah (0,01 M HCl) prišlo do acidolize amidne vezi, kar je uresničilo naše domneve o nastanku aktiviranega amida (glejte poglavje 5.2.7.). Pri poskusih odščite s CF_3COOH je prišlo do acidolize aziridinskega obroča, medtem ko je zaščitna skupina Boc ostala vezana na amino skupino. Iz tega lahko sklepamo, da sta amidna vez in aziridinski obroč v danih razmerah bolj reaktivna kot karbamat, kar pomeni, da bomo z acidolizo težko selektivno odstranili zaščitno skupino Boc, brez da bi pri tem prišlo do acidolize amida ali aziridina.



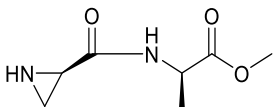
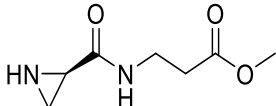
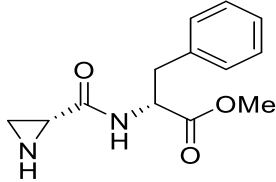
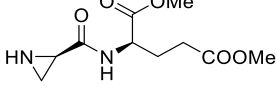
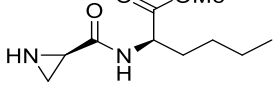
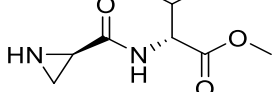
Slika 33: Poskusi odstranitve benzilne zaščitne skupine.

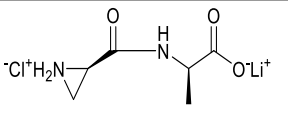
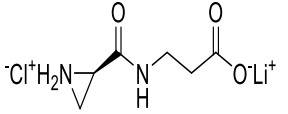
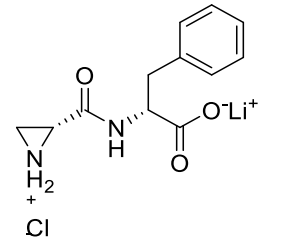
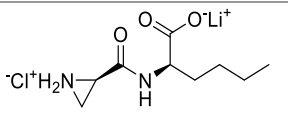
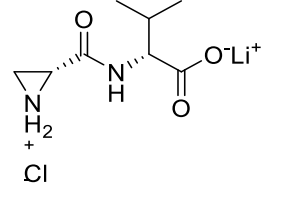
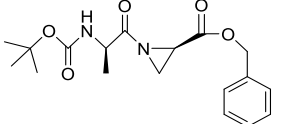
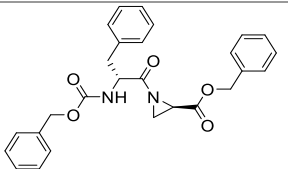
Tudi poskusi odstranitve benzilne skupine s katalitskim hidrogeniranjem iz **32** niso bili uspešni (slika 33), saj smo dobili zelo nejasne ^1H NMR spektre reakcijskih zmesi. Potencialne produkte smo zato poskušali očistiti s kolonsko kromatografijo, vendar našega produkta nismo zaznali v nobeni izmed frakcij. Obstaja možnost, da s katalitskim hidrogeniranjem pridemo do želenega produkta, vendar nastane toliko stranskih produktov, da ga v reakcijski zmesi ne moremo identificirati. Po čiščenju s kolonsko kromatografijo pa ga ne moremo identificirati, ker pride do njegovega razpada na koloni med čiščenjem. Druga, bolj verjetna razlaga pa je, da pride pod pogoji katalitskega hidrogeniranja do razpada aziridinskega obroča oziroma amidne vezi.

5.3. Rezultati in razprava bioloških testiranj

Sintetizirane dipeptide z aziridinskim gradnikom smo testirali na encimih MurF in DdlB iz bakterije *E. coli*. Rezultati so zbrani v preglednici V.

Preglednica V: Rezultati bioloških testiranj.

Oznaka	Struktura	RA (%), c = 1 mM, MurF ^a	RA (%), c = 2,5 mM, MurF ^b	RA (%), c = 2,5 mM, DdlB ^c	RA (%), c = 1 mM, MurF ^d
14		98 %	6 %	98 %	7 %
15		94 %	6 %	96 %	6 %
16		96 %	7 %	97 %	9 %
17		96 %	6 %	99 %	7 %
18		95 %	8 %	100 %	6 %
19		100 %	10 %	96 %	8 %

<u>20</u>		100 %	16 %	98 %	23,5 %
<u>21</u>		100 %	3 %	95 %	8 %
<u>22</u>		100 %	7 %	91 %	8 %
<u>23</u>		100 %	6 %	88 %	12 %
<u>24</u>		100 %	8 %	98 %	6 %
<u>31</u>		99 %	12 %	86 %	5 %
<u>32</u>		55 % interakcija s testom, se obarja	16 % interakcija s testom, se obarja	94 % interakcija s testom, se obarja	8 % interakcija s testom, se obarja

^a test zaviralne aktivnosti; ^b test lažnega substrata; ^c test zaviralne aktivnosti; ^d test lažnega substrata pri 10-krat višji koncentraciji encima; RA – rezidualna aktivnost.

Rezidualna aktivnost encima (RA) je razmerje med katalitično aktivnostjo encima ob prisotnosti zaviralca in aktivnostjo encima brez dodanega zaviralca. Izražamo jo v odstotkih in je merilo učinkovitosti zaviralca, pri čemer manjša RA pri dani koncentraciji zaviralca pomeni boljši zaviralni učinek spojine. Zaviralno aktivnost smo ovrednotili s testom z malahitno zelenim, katerega osnova je tvorba fosfomolibdatnega kompleksa med prostim fosfatom, ki nastane pri hidrolizi ATP, in barvilom malahitno zelenim. Vrednosti RA od 80 do 100 % so v mejah eksperimentalne napake, zato smo spojine s takšno aktivnostjo opredelili kot neaktivne.

Na encimu MurF smo izvedli dva različna testa. Pri testu zaviralne aktivnosti smo v reakcijsko zmes dodali encim MurF, dipeptide z aziridinskim gradnikom in vse tri encimske

substrate: ATP, D-ala-D-ala in UDP-MurNAc-tripeptid. S tem testom smo preverili, ali sintetizirani dipeptidi zavirajo delovanje MurF, kar bi se pokazalo z manjšo vrednostjo RA. Z drugim testom (test lažnega substrata) pa smo preverili, ali encim prepozna peptidni mimetik kot lasten substrat (D-Ala-D-Ala) in ga vgradi v nastajajoče peptidno zaporedje UDP-MurNAc-pentapeptida. V tem primeru smo v reakcijsko zmes dodali encim MurF, dipeptide z aziridinskim gradnikom ter samo dva substrata: ATP in UDP-MurNAc-tripeptid. Tako smo želeli doseči čim višjo RA, saj bi to pomenilo, da je encim prepoznal spojine kot lastne substrate in jih vgradil v nastajajoče peptidno zaporedje, ki je na ta način postalo nefunkcionalno.

Pri načrtovanju dipeptidnih mimetikov z aziridinskim gradnikom smo predpostavljali, da bi te spojine lahko delovale po več različnih mehanizmih. Prva možnost je kovalentna inhibicija encima MurF, za katero smo predpostavljali, da poteče po sledečem mehanizmu. Aziridin se v aktivnem mestu encima MurF veže na aktiviran acilfosfat in nastane *N*-acil aziridin. Ker je le-ta zelo reaktiven, je velika verjetnost, da bo v aktivnem mestu encima reagiral z nukleofilnimi skupinami aminokislin (MurF ima v vezavnem mestu treonin) in na tak način zaviral MurF.

Drugi možen mehanizem je, da encim MurF vgradi sintetizirane spojine v nastajajoče peptidno zaporedje kot lažne substrate, kar vodi v nastanek UDP-MurNAc-pentapeptida, ki v svoji strukturi vsebuje acilirani aziridin. Tak produkt je zaradi elektrofilne narave aziridina podvržen reakcijam z nukleofili, zato lahko pride že po izstopu produkta iz aktivnega mesta MurF do napada nukleofilov (recimo vode) na aziridinski obroč. Obroč se odpre in nastane nefunkcionalen peptid, ki lahko moti nadaljnje stopnje sinteze. UDP-MurNAc-pentapeptid, ki vsebuje acilirani aziridinski obroč, bi lahko povzročil inhibicijo encimov, ki sodelujejo v poznejših stopnjah sinteze peptidoglikana (MraY, PBP). Velik potencial smo videli predvsem v inhibiciji PBP, ki imajo v aktivnem mestu nukleofilno serinsko OH skupino, ki bi lahko reagirala z elektrofilnim aziridinskim obročem in prišlo bi do kovalentne inhibicije. Če tudi bi aziridin ostal v ciklični obliki, bi najverjetneje dobili nefunkcionalen peptid zaradi drugačne konformacije peptidne verige produkta in manjše afinitete do vezavnega mesta encimov, ki sledijo MurF v sintezi celične stene.

Reakcijski produkt D-Ala-D-Ala močno zavira delovanje encima Ddl, zato smo z rigidnim mimetikom poskusili doseči še močnejše zaviranje encima.

Rezultati so pokazali, da nobena izmed sintetiziranih spojin ne zavira aktivnosti encimov DdlB in MurF. Pri spojini **32** je bila RA na MurF encimu 55 %, vendar je med testom te

spojine prišlo do njenega obarjanja, zato rezultati niso verodostojni. Pri testu lažnega substrata se je za učinkovito izkazala spojina **20**, ki jo je encim deloma prepoznal kot lasten substrat in jo vgradil v nastajajoči UDP-MurNAc-pentapeptid. Da jo encim res prepozna kot lasten substrat, smo dokazali tudi s testom, pri katerem smo dodali 10-krat večjo koncentracijo encima, in smo kot rezultat dobili večjo vrednost RA. Tak rezultat je pričakovan, saj je izmed vse sintetiziranih mimetikov spojina **20** najbolj podobna naravnemu substratu MurF, dipeptidu D-Ala-D-Ala.

Spojini **20** smo določili protibakterijsko delovanje. Minimalna inhibitorna koncentracija (MIK) je bila večja od 128 $\mu\text{g/mL}$ (0,64 mM) tako na *E. coli* kot tudi na *S. aureus*. Na podlagi rezultata testa MIK ne moremo z gotovostjo trditi, da spojina ne zavira rasti bakterij, saj je možno, da je bila testna koncentracija premajhna. S testom lažnega substrata smo ugotovili, da je spojina aktivna, vendar smo teste izvedli pri večjih koncentracijah spojine (1 mM in 2,5 mM), zato bomo v prihodnosti MIK ovrednotiti pri večjih koncentracijah in šele takrat bomo lahko z gotovostjo trdili, da spojina je oziroma ni aktivna.

6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo načrtovali, sintetizirali in ovrednotili mimetike dipeptida D-Ala-D-Ala z aziridinskim gradnikom kot potencialne zaviralce oziroma lažne substrate encimov MurF in DdlB. Pri sintezi smo izhajali iz D-serina, ki smo mu v začetnih stopnjah zaščitili karboksilno in amino skupino, nato pa izvedli ciklizacijo do aziridina. Pri prvi seriji spojin smo v naslednjih korakih preko sklopitvenih reakcij z različnimi D-aminokislinami tvorili dipeptide aziridin-D-aminokislina, ki smo jim nato odstranili zaščitne skupine in tako prišli do produktov **14–24**. Pri izvedbi reakcij smo imeli veliko težav s stabilnostjo spojin. Ugotovili smo, da je pri sintezi spojine **4** ključno, da je produkt v ionizirani obliki, saj je ob poskusih pretvorbe v neionizirano obliko prišlo do odprtja aziridinskega obroča. Za odstranitev tritilne zaščitne skupine je bil ključen dodatek trietilsilana, ki je deloval kot donor hidrida. Zelo težavno je bilo tudi čiščenje končnih spojin, saj je pri kolonski kromatografiji pogosto prihajalo do njihovega razpada oziroma epimerizacije, zato smo kot stacionarno fazo za čiščenje nekaterih produktov uporabili aluminijev oksid.

Drugo serijo spojin so predstavljali mimetiki s strukturo D-aminokislina-aziridin. Uspeli smo sintetizirati le dve spojini (**31** in **32**). Pri teh spojinah je predstavljala stabilnost še večjo težavo, saj smo sintetizirali *N*-acil aziridine, ki imajo v molekuli aktiviran amid in elektrofilen aziridin. Pri spojini **31** smo poskus odščite zaščitne skupine Boc izvedli z različnimi koncentracijami HCl in CF₃COOH. Pri poskusu odščite s HCl je tudi pri majhnih nizkih koncentracijah kisline prišlo do acidolize amidne vezi, pri poskusih odščite s CF₃COOH pa do acidolize aziridinskega obroča, medtem ko je zaščitna skupina Boc ostala vezana na amino skupino. Iz tega smo sklepali, da sta amidna vez in aziridinski obroč pri danih pogojih bolj reaktivna kot karbamat, kar pomeni, da bomo z acidolizo težko selektivno odstranili zaščitno skupino Boc, brez da bi pri tem prišlo do acidolize amida ali aziridina. Tudi poskusi odstranitve benzilne skupine iz **32** s katalitskim hidrogeniranjem niso bili uspešni, saj smo dobili zelo nejasne ¹H NMR spektre reakcijskih zmesi. Potencialne produkte smo zato poskušali očistiti s kolonsko kromatografijo, vendar našega produkta nismo zaznali v nobeni izmed frakcij.

Z ustreznimi analiznimi postopki smo dokazali strukturno ustreznost in čistost končnih spojin ter izvedli biokemijske teste na encimih MurF in DdlB iz bakterije *E. coli*. Na encimu MurF smo izvedli dva različna testa. S testom zaviralne aktivnosti smo preverjali, ali sintetizirani dipeptidi zavirajo delovanje encima, s testom lažnega substrata pa, ali encim prepozna sintetizirane peptidne mimetike kot lasten substrat (D-Ala-D-Ala) in jih vgradi v

nastajajoče peptidno zaporedje UDP-MurNAc-pentapeptida. Rezultati so pokazali, da nobena izmed sintetiziranih spojin ne zavira aktivnosti encimov DdlB in MurF. Pri testu lažnega substrata se je kot učinkovita izkazala spojina **20**, ki jo je encim deloma prepoznal kot lasten substrat in jo vgradil v nastajajoči UDP-MurNAc-pentapeptid. Spojini **20** smo določili tudi protibakterijsko delovanje. Minimalna inhibitorna koncentracija je bila večja od 128 $\mu\text{g/mL}$ (0,64 mM) tako na *E. coli* kot tudi na *S. aureus*. Vendar na podlagi rezultata testa MIK ne moremo z gotovostjo trditi, da spojina ne zavira rasti bakterij, saj je možno, da je bila testna koncentracija premajhna. S testom lažnega substrata smo ugotovili, da je spojina aktivna, vendar smo teste izvedli pri večjih koncentracijah spojine (1 mM in 2,5 mM), zato bomo v prihodnosti ovrednotiti MIK tudi pri večjih koncentracijah.

Sinteza spojin z aziridinskim gradnikom predstavlja, zaradi njihove reaktivnosti, svojevrsten izziv. Čeprav nismo odkrili nove spojine z aktivnim protibakterijskim delovanjem, smo z rezultati, pridobljenimi v okviru te magistrske naloge, prispevali k dodatnemu razumevanju delovanja zaviralcev na encimih MurF in DdlB. Sintetizirali smo nov tip spojin z aziridinskim gradnikom, kar odpira nove možnosti tudi v organski kemiji, kjer predstavljajo aziridini pomembne intermediate pri asimetrični sintezi aminokislin in peptidov, ki v zadnjih letih pridobiva na pomenu, saj se na tržišču pojavlja vse več učinkovin v optično čisti obliki.

7. PRILOGA: ŠIFRANT SPOJIN

Oznaka spojine v magistrski nalogi	Oznaka spojine v laboratorijskem dnevniku	Oznaka spojine v magistrski nalogi	Oznaka spojine v laboratorijskem dnevniku
<u>1</u>	FDF 1	<u>18</u>	FDF 77
<u>2</u>	FDF 2	<u>19</u>	FDF 79
<u>3</u>	FDF 15	<u>20</u>	FDF 55
<u>4</u>	FDF 44	<u>21</u>	FDF 83
<u>5</u>	FDF 56	<u>22</u>	FDF 71
<u>6</u>	FDF 57	<u>23</u>	FDF 82
<u>7</u>	FDF 58	<u>24</u>	FDF 81
<u>8</u>	FDF 48	<u>25</u>	FDF 106
<u>9</u>	FDF 63/74	<u>26</u>	FDF 107
<u>10</u>	FDF 64	<u>27</u>	FDF 89 in FDF 108 (dva različna sintezna postopka)
<u>11</u>	FDF 72	<u>28</u>	FDF 109/115/121
<u>12</u>	FDF 73	<u>29</u>	FDF 95
<u>13</u>	FDF 75	<u>30</u>	FDF 102
<u>14</u>	FDF 53	<u>31</u>	FDF 96/97
<u>15</u>	FDF 70/78	<u>32</u>	FDF 111/116
<u>16</u>	FDF 69	<u>33</u>	FDF 122
<u>17</u>	FDF 76		

8. LITERATURA

- [1] Microbiology Society. The history of antibiotics. <https://microbiologysociety.org/education-outreach/antibiotics-uneearthed/antibiotics-and-antibiotic-resistance/the-history-of-antibiotics.html>. Dostop: 28-5-2018.
- [2] Nicolaou K. C., Rigol S. A brief history of antibiotics and select advances in their synthesis. *J. Antibiot* 2018; 71: 153–184.
- [3] Mohr K. I. History of Antibiotics Research. In: *How to Overcome the Antibiotic Crisis* (eds. Stadler, M., Dersch, P.) 398; Springer International Publishing, 2016: 237–272.
- [4] Coates A. R., Halls G., Hu Y. Novel classes of antibiotics or more of the same?: New antibiotic classes are urgently needed. *Br. J. Pharmacol* 2011; 163: 184–194.
- [5] Goodman L., Gilman A. Goodman & Gilman's *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 1143–1146
- [6] Kapoor G., Saigal S., Elongavan A. Action and resistance mechanisms of antibiotics: A guide for clinicians. *J. Anaesthesiol. Clin. Pharmacol.* 2017; 33: 300.
- [7] Kohanski M. A., Dwyer D. J., Collins J. J. How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol* 2010; 8: 423–435.
- [8] Coates A., Hu Y., Bax R., Page C. The future challenges facing the development of new antimicrobial drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2002; 1: 895–910.
- [9] Wright G. D. Antibiotics: A New Hope. *Chem. Biol.* 2012; 19: 3–10.
- [10] Bbosa G. S., Mwebaza N., Odda J., Kyegombe D. B., Ntale M. Antibiotics/antibacterial drug use, their marketing and promotion during the post-antibiotic golden age and their role in emergence of bacterial resistance. *Health (N. Y.)* 2014; 6: 410–425.
- [11] Bacterial Resistance to Antibiotics. http://textbookofbacteriology.net/resantimicrobial_3.html. Dostop: 24-6-2018)
- [12] Alanis A. J. Resistance to Antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Arch. Med. Res.* 2005; 36: 697–705.
- [13] Aminov R. I. A Brief History of the Antibiotic Era: Lessons Learned and Challenges for the Future. *Front. Microbiol.* 2010; 1.
- [14] Green D. W. The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin. Ther. Targets* 2002; 6: 1–20.
- [15] Coico R. Gram staining. *Curr. Protoc. Microbiol.* 2005; Appendix 3: Appendix 3C.
- [16] Creative Biolabs. Bacterial Cell Wall Targets Identification. <https://www.creative-biolabs.com/drug-discovery/therapeutics/bacterial-cell-wall-targets-identification.htm>. Dostop: 24-6-2018.
- [17] Vollmer W., Bertsche, U. Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 2008; 1778: 1714–1734.
- [18] Royet J., Dziarski, R. Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nat. Rev. Microbiol.* 2007; 5: 264–277.
- [19] Heijenoort J. van. Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit (1985 to 2000). *Nat. Prod. Rep.* 2001; 18: 503–519.
- [20] Smith C. A. Structure, Function and Dynamics in the mur Family of Bacterial Cell Wall Ligases. *J. Mol. Biol.* 2006; 362: 640–655.
- [21] Hrast M. et al. Structure–activity relationships of new cyanothiophene inhibitors of the essential peptidoglycan biosynthesis enzyme MurF. *Eur. J. Med. Chem.* 2013; 66: 32–45.
- [22] Barreteau H. et al. Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 2008; 32: 168–207.

- [23] Molecular Microbiology - Wiley Online Library. The biology of Mur ligases as an antibacterial target. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/mmi.12758>. Dostop: 13-8-2018.
- [24] Miller D. J., Hammond S. M., Anderluzzi D., Bugg, T. D. H. Aminoalkylphosphinate inhibitors of D-Ala-D-Ala adding enzyme. *J. Chem. Soc. Perkin 1* 1998: 131–142.
- [25] Hrast M., Sosič I., Šink R., Gobec S. Inhibitors of the peptidoglycan biosynthesis enzymes MurA-F. *Bioorganic Chem.* 2014; 55: 2–15.
- [26] Stefane B. et al. The Synthesis of Novel 2,4,6-Trisubstituted 1,3,5-Triazines: A Search for Potential MurF Enzyme Inhibitors. *Heterocycles* 2010; 81: 91-115.
- [27] Turk S. et al. Biochemical characterization of MurF from *Streptococcus pneumoniae* and the identification of a new MurF inhibitor through ligand-based virtual screening. *Acta Chim. Slov.* 2013; 60: 294–299.
- [28] Baum E. Z. et al. Utility of muropeptide ligase for identification of inhibitors of the cell wall biosynthesis enzyme MurF. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50: 230–236.
- [29] Baum E. Z. et al. A MurF Inhibitor That Disrupts Cell Wall Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2007; 51: 4420–4426.
- [30] Baum E. Z. et al. MurF Inhibitors with Antibacterial Activity: Effect on Muropeptide Levels. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2009; 53: 3240–3247.
- [31] Hrast M. et al. Function of the D -Alanine: D -Alanine Ligase Lid Loop: A Molecular Modeling and Bioactivity Study. *J. Med. Chem.* 2012; 55: 6849–6856.
- [32] Walsh C. T. Enzymes in the D-alanine branch of bacterial cell wall peptidoglycan assembly. *J. Biol. Chem.* 1989; 264: 2393–2396.
- [33] Kovač A. et al. Diazenedicarboxamides as inhibitors of d-alanine-d-alanine ligase (Ddl). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2007; 17: 2047–2054.
- [34] Škedelj V. et al. 6-Arylpyrido[2,3-d]pyrimidines as Novel ATP-Competitive Inhibitors of Bacterial D-Alanine:D-Alanine Ligase. *PLoS ONE* 7 2012: e39922.
- [35] Tytgat I. et al. DD-ligases as a potential target for antibiotics: past, present and future. *Curr. Med. Chem.* 2009; 16; 2566–2580.
- [36] Parsons W. H. et al. Phosphinic acid inhibitors of D-alanyl-D-alanine ligase. *J. Med. Chem.* 1988; 31: 1772–1778.
- [37] Ellsworth B. A., Tom N. J., Bartlett P. A. Synthesis and evaluation of inhibitors of bacterial d-alanine: d-alanine ligases. *Chem. Biol.* 1996; 3: 37–44.
- [38] Besong G. E. et al. A De Novo Designed Inhibitor of D-Ala-D-Ala Ligase from *E. coli*. *Angew. Chem. Int.* 2005; 44: 6403–6406.
- [39] Koteva K., King A. M., Capretta A., Wright, G. D. Total Synthesis and Activity of the Metallo- β -lactamase Inhibitor Aspergillomarasmine A. *Angew. Chem. Int.* 2015; 55: 2210–2212.
- [40] Stanković S. et al. Regioselectivity in the ring opening of non-activated aziridines. *Chem. Soc. Rev.* 2012; 41: 643–665.
- [41] Gnecco D. et al. Regiospecific and Enantiospecific Ring Opening of Methyl (+)-(1'R, 2R)- and (-)-(1'R, 2S)-1-(2-phenylethanol) Aziridine-2-carboxylates. *Molecules* 2000; 5: 998–1003.
- [42] Chemistry LibreTexts. Raoult's Law. [https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_\(Physical_and_Theoretical_Chemistry\)/Physical_Properties_of_Matter/Solutions_and_Mixtures/Ideal_Solutions/Changes_In_Vapor_Pressure%2C_Raoult's_Law](https://chem.libretexts.org/Textbook_Maps/Physical_and_Theoretical_Chemistry_Textbook_Maps/Supplemental_Modules_(Physical_and_Theoretical_Chemistry)/Physical_Properties_of_Matter/Solutions_and_Mixtures/Ideal_Solutions/Changes_In_Vapor_Pressure%2C_Raoult's_Law). Dostop: 5-8-2018.
- [43] Yudin A. K. Aziridines and Epoxides in Organic Synthesis. John Wiley & Sons 2006.

- [44] Montalbetti C. A. G. N. & Falque, V. Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron* 2005; 61: 10827–10852.
- [45] Harris D. C. *Quantitative chemical analysis*. W. H. Freeman 2007.
- [46] Smith M. B. & March, J. *March's Advanced Organic Chemistry*. John Wiley & Sons, Inc., 2006.
- [47] Gould R. F. Azeotropic Data—III, *Advances in Chemistry Series*, Am. Chem. Soc. 1973: 28.
- [48] Schneider C. H., Lynch C. C. The Ternary System: Dioxane—Ethanol—Water. *J. Am. Chem. Soc.* 1943; 65: 1063–1066.

SAMO KUZMIČ

2018