

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJ STRELEC

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2018

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

MATEJ STRELEC

**SINTEZA IN VREDNOTENJE POTENCIALNIH
ZAVIRALCEV LIGAZ DDLB IN MURF NA OSNOVI
MONOBAKTAMSKEGA SKELETA**

**SYNTHESIS AND EVALUATION OF POTENTIAL
INHIBITORS OF DDLB AND MURF LIGASES BASED ON
MONOACTAM SCAFFOLD**

Ljubljana, 2018

Magistrsko nalogo sem opravljal na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo v Ljubljani pod mentorstvom doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Martine Hrast, mag. farm.

Spektroskopske meritve so opravili na Fakulteti za farmacijo in na Inštitutu Jožefa Stefana.

Zahvala

Zahvaljujem se doc. dr. Stanetu Pajku, mag. farm., in asist. dr. Martini Hrast, mag. farm., za strokovno pomoč in nasvete pri magistrskem delu.

Zahvaljujem se tudi vsem ostalim kolegom na Katedri za farmacevtsko kemijo, ki so mi kakorkoli pomagali pri laboratorijskem delu.

Na koncu bi se zahvalil še družini, prijateljem in dekletu za podporo med študijem in pri izdelavi magistrske naloge.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko delo izdelal samostojno pod vodstvom mentorja doc. dr. Staneta Pajka, mag. farm., in somentorice asist. dr. Martine Hrast, mag. farm.

Matej Strelec

Ljubljana, 2018

KAZALO VSEBINE

KAZALO TABEL	VIII
POVZETEK	IX
ABSTRACT	X
SEZNAM OKRAJŠAV	XI
1 UVOD	1
1.1 Protibakterijske učinkovine	1
1.2 Odpornost bakterij na protibakterijske učinkovine	2
1.3 Bakterijska celična stena	4
1.3.1 Po Gramu pozitivne bakterije	4
1.3.2 Po Gramu negativne bakterije	5
1.4 Peptidoglikan	6
1.4.1 Biosinteza peptidoglikana	6
1.5 Mur ligaze	8
1.6 MurF	9
1.6.1 Zaviralci encima MurF	10
1.7 Ddl	12
1.7.1 Zaviralci Ddl	13
2 NAMEN DELA	17
3 MATERIALI IN METODE	19
3.1 Materiali	19
3.2 Metode	19
4 EKSPERIMENTALNO DELO	21
4.1 Splošni postopki	21
4.1.1 Splošni postopek za zaščito karboksilne skupine	21
4.1.2 Splošni postopek za tvorbo amidne vezi s sklopitveno reakcijo	21
4.1.3 Splošni postopek za Mitsunobujevo reakcijo	22
4.1.4 Splošni postopek za odščito aminske skupine	22
4.1.5 Splošni postopek za odščito karboksilne skupine	22
4.2 Sinteza (<i>S</i>)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanojske kisline (1)	23
4.3.1 Sinteza metil 1-aminocikloheksankarboksilata (2)	24
4.3.2 Sinteza (<i>R</i>)-metil 2-amino-3-metilbutanoata (3)	24

4.4.1	Sinteza (<i>S</i>)-metil 1-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksiopropanamido) cikloheksankarboksilata (4)	25
4.4.2	Sinteza (<i>S</i>)-metil 1-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksiopropanamido) ciklopentankarboksilata (5).....	26
4.4.3	Sinteza (<i>R</i>)-metil 2-((<i>S</i>)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksiopropanamido)-3-metilbutanoata (6)	27
4.4.4	Sinteza (<i>R</i>)-dimetil 2-((<i>S</i>)-(dibenzilamino)-3-hidroksiopropanamido) pentadionata (7)	28
4.4.5	Sinteza (<i>R</i>)-metil 2-((<i>S</i>)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksiopropanamido)-propanoata (8)	28
4.5.1	Sinteza (<i>R</i>)-metil 1-(3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il) cikloheksankarboksilata (9)	29
4.5.2	Sinteza (<i>R</i>)-metil 1-(3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)ciklopentankarboksilata (10)	30
4.5.3	Sinteza (<i>R</i>)-metil 2-((<i>R</i>)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)-3-metilbutanoata (11)	31
4.5.4	Sinteza (<i>R</i>)-dimetil 2-((<i>R</i>)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)pentandioata (12).....	32
4.5.5	Sinteza (<i>R</i>)-metil 2-((<i>R</i>)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)propanoata (13).....	33
4.5.6	Sinteza (<i>S</i>)-metil 2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((<i>R</i>)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)acetata (14)	34
4.6.1	Sinteza (<i>R</i>)-metil 1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)cikloheksankarboksilata (15).....	35
4.6.2	Sinteza (<i>R</i>)-metil 1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)ciklopentankarboksilata (16).....	35
4.6.3	Sinteza (<i>R</i>)-metil 2-((<i>R</i>)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-3-metilbutanoata (17)	36
4.6.4	Sinteza (<i>R</i>)-dimetil 2-((<i>R</i>)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)pentandioata (18) ..	37
4.6.5	Sinteza (<i>R</i>)-metil 2-((<i>R</i>)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)propanoata (19).....	38
4.6.6	Sinteza (<i>R</i>)-metil 2-((<i>R</i>)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)acetata (20)	38

4.7.1	Sinteza (<i>R</i>)-1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)cikloheksankarboksilne kisline (21).....	39
4.7.2	Sinteza (<i>R</i>)-1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)ciklopentankarboksilne kisline (22).....	40
4.7.3	Sinteza (<i>R</i>)-2-((<i>R</i>)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-3-metilbutanojske kisline (23).....	41
4.7.4	Sinteza (<i>R</i>)-2-((<i>R</i>)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-5-metoksi-5-oksopentanojske kisline (24)	42
4.7.5	Sinteza (<i>R</i>)-2-((<i>R</i>)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)propanojske kisline (25)....	43
4.7.6	Sinteza (<i>R</i>)-2-((<i>R</i>)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)ocetne kisline (26)	44
4.7.7	Sinteza 2-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-3-(4-hidroksifenil)propanojske kisline (27)	45
4.8	Sinteza 2-amino-3-(3-hidroksifenil)propanojske kisline	46
4.8.1	Sinteza (<i>E</i>)-etil-3-(3-hidroksifenil)-2-nitroakrilata.....	46
4.8.2	Sinteza 3-(benziloksi)benzaldehyda (28)	47
4.8.3	Sinteza benzoilglicina (29)	48
4.8.4	Sinteza (<i>E</i>)-4-(3-(benziloksi)benziliden)-2-feniloksazol-5(4H)-ona (30)	49
4.8.5	Sinteza metil (<i>E</i>)-2-benzamido-3-(3-(benziloksi)fenil)akrilata (31)	50
4.8.6	Sinteza metil 2-benzamido-3-(3-hidroksifenil)propanoata (32).....	50
4.8.7	Sinteza 1-karboksi-2-(3-hidroksifenil)etan-1-amonijev klorida (33)	51
4.8.8	Sinteza etil 2-amino-3-(3-hidroksifenil)propanoata (34)	52
4.8.9	Sinteza etil 2-((<i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)-3-(3-hidroksifenil)propanoata (35).....	52
4.8.10	Sinteza etil 3-(3-(benziloksi)fenil)-2-((<i>tert</i> butoksikarbonil)amino)propanoata (36).....	53
4.8.11	Sinteza 3-(3-(benziloksi)fenil)-1-etoksi-1-oksopropan-2-amonijev klorida (37).....	54
4.8.12	Poskus sinteze etil 3-(3-(benziloksi)fenil)-2-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksiopropanamido)propanoata	55
5	REZULTATI IN RAZPRAVA.....	56
5.1	Komentar sinteznih postopkov	56
5.1.1	Zaščita karboksilne skupine.....	56

5.1.2	Tvorba amidne vezi s sklopitveno reakcijo	57
5.1.3	Mitsunobujeva reakcija.....	58
5.1.4	Odščita aminske skupine	58
5.1.5	Odščita karboksilne skupine.....	59
5.1.6	Sinteza 2-amino-3-(3-hidroksifenil)propanojske kisline.....	59
5.2	Rezultati biokemijskega testiranja	60
5.2.1	Komentar biokemijskega testiranja	62
6	ZAKLJUČEK	63
7	LITERATURA	64

KAZALO SLIK

Slika 1:	Celična stena po Gramu pozitivnih bakterij (prirejeno po (12)).	4
Slika 2:	Celična stena po Gramu negativnih bakterij (prirejeno po (12)).	5
Slika 3:	Osnovna monomerna enota peptidoglikana (prirejeno po (16)).	6
Slika 4:	Biosinteza znotrajceličnih stopenj peptidoglikana (prirejeno po (19)).	7
Slika 5:	Reakcijski mehanizem mur ligaz (prirejeno po (16)).....	8
Slika 6:	Reakcijski mehanizem D-alanil:D-alanin ligaze (privzeto po(34)).	12
Slika 7:	Primerjava struktur D-alanil-D-alanina in monobaktama (zgoraj) ter stranske skupine R (spodaj).	17
Slika 8:	Reakcijska shema splošnega postopka za zaščito karboksilne skupine.	21
Slika 9:	Reakcijska shema splošnega postopka za tvorbo amidne vezi s sklopitveno reakcijo.	21
Slika 10:	Reakcijska shema splošnega postopka za Mitsunobujevo reakcijo.	22
Slika 11:	Reakcijska shema splošnega postopka za odščito aminske skupine.	22
Slika 12:	Reackijska shema splošnega postopka za odščito karboksilne skupine.....	23
Slika 13:	Reakcijska shema sinteze (S)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanojske kisline.	23
Slika 14:	Reakcijska shema sinteze metil 1-aminocikloheksankarboksilata.	24
Slika 15:	Reakcijsk shema sinteze (R)-metil 2-amino-3-metilbutanoata.	24
Slika 16:	Reakcijska shema sinteze (S)-metil 1-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) cikloheksankarboksilata.....	25

Slika 17: Reakcijska shema sinteze (S)-metil 1-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) ciklopentankarboksilata.	26
Slika 18: Reakcijska shema sinteze (R)-metil 2-((S)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)-3-metilbutanoata.	27
Slika 19: Reakcijska shema sinteze (R)-dimetil 2-((S)-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) pentadionata.	28
Slika 20: Reakcijska shema sinteze (R)-metil 2-((S)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)-propanoata.....	28
Slika 21: Reakcijska shema sinteze (R)-metil 1-(3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il) cikloheksankarboksilata.....	29
Slika 22: Reakcijska shema sinteze (R)-metil 1-(3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)ciklopentankarboksilata.	30
Slika 23: Reakcijska shema sinteze (R)-metil 2-((R)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)-3-metilbutanoata.	31
Slika 24: Reakcijska shema sinteze (R)-dimetil 2-((R)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)pentandioata.	32
Slika 25: Reakcijska shema sinteze (R)-metil 2-((R)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)propanoata.	33
Slika 26: Reakcijska shema sinteze (S)-metil 2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((R)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)acetata.	34
Slika 27: Reakcijska shema sinteze (R)-metil 1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)cikloheksankarboksilata.	35
Slika 28: Reakcijska shema sinteze (R)-metil 1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)ciklopentankarboksilata.	35
Slika 29: Reakcijska shema sinteze (R)-metil 2-((R)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-3-metilbutanoata.	36
Slika 30: Reakcijska shema sinteze (R)-dimetil 2-((R)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)pentandioata.	37
Slika 31: Reakcijska shema sinteze (R)-metil 2-((R)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)propanoata.	38
Slika 32: Reakcijska shema sinteze (R)-metil 2-((R)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)acetata.	38

Slika 33: Reakcijska shema sinteze (R)-1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)cikloheksankarboksilne kisline.	39
Slika 34: Reakcijska shema sinteze (R)-1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)ciklopentankarboksilne kisline.....	40
Slika 35: Reakcijska shema sinteze (R)-2-((R)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-3-metilbutanojske kisline.	41
Slika 36: Reakcijska shema sinteze (R)-2-((R)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-5-metoksi-5-oksopentanojske kisline.....	42
Slika 37: Reakcijska shema sinteze (R)-2-((R)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)propanojske kisline.	43
Slika 38: Reakcijska shema sinteze (R)-2-((R)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)ocetne kisline.	44
Slika 39: Reakcijska shema sinteze 2-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-3-(4-hidroksifenil)propanojske kisline.	45
Slika 40: Reakcijska shema sinteze 2-amino-3-(3-hidroksifenil)propanojske kisline.	46
Slika 41: Reakcijska shema sinteze (E)-etil-3-(3-hidroksifenil)-2-nitroakrilata.	46
Slika 42: Reakcijska shema sinteze 3-(benziloksi)benzaldehyda.	47
Slika 43: Reakcijska shema sinteze benzoilglicina.	48
Slika 44: Reakcijska shema sinteze (E)-4-(3-(benziloksi)benziliden)-2-feniloksazol-5(4H)-ona.	49
Slika 45: Reakcijska shema sinteze metil (E)-2-benzamido-3-(3-(benziloksi)fenil)akrilata.	50
Slika 46: Reakcijska shema sinteze metil 2-benzamido-3-(3-hidroksifenil)propanoata.	50
Slika 47: Reakcijska shema sinteze 1-karboksi-2-(3-hidroksifenil)etan-1-amonijev klorida.	51
Slika 48: Reakcijska shema sinteze etil 2-amino-3-(3-hidroksifenil)propanoata.....	52
Slika 49: Reakcijska shema sinteze etil 2-((terc-butoksikarbonil)amino)-3-(3-hidroksifenil)propanoata.....	52
Slika 50: Reakcijska shema sinteze etil 3-(3-(benziloksi)fenil)-2-((terc-butoksikarbonil)amino)propanoata.	53
Slika 51: Reakcijska shema sinteze 3-(3-(benziloksi)fenil)-1-etoksi-1-oksopropan-2-amonijev klorida.	54

Slika 52: Reakcijska shema poskusa sinteze etil 3-(3-(benziloksi)fenil)-2-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)propanoata.....	55
Slika 53: Mehanizem tvorbe estra prek kislinskega klorida.....	56
Slika 54: Mehanizem reakcije nastanka amida (38).....	57
Slika 55: Mehanizem Mitsunobujeve reakcije (39).....	58

KAZALO TABEL

Tabela 1: Zaviralci encima MurF.	11
Tabela 2: Zaviralci encima Ddl.	15
Tabela 3: Rezultati biokemijskega testiranja.....	60

POVZETEK

Razvoj protibakterijskih učinkovin je predstavljal enega največjih medicinskih dosežkov v 20. stoletju. Vendar pa se danes zaradi njihove prekomerne in nesmiselne uporabe srečujemo s pojavom odpornosti bakterij na vedno večji nabor teh učinkovin, kar predstavlja resen zdravstveni problem in nakazuje na potrebo po razvoju učinkovin z novimi mehanizmi delovanja. Ena najpomembnejših tarč za razvoj novih protibakterijskih učinkovin so encimi, ki sodelujejo pri biosintezi bakterijske celične stene. Tak primer encimov sta ligazi MurF in DdlB, ki sodelujeta v zaključnem delu biosinteze osnovne monomerne enote peptidoglikana.

V magistrski nalogi smo sintetizirali nove potencialne zaviralce ligaz MurF in DdlB, dipeptide z rigidizirano peptidno vezjo v monobaktamskem obroču. S takšno strukturo smo posnemali dipeptid D-alanil-D-alanin, ki je produkt encimske reakcije ligaze DdlB in substrat za MurF. Sintetizirani dipeptidi so vsebovali različno stransko skupino, saj smo želeli ugotoviti vpliv te skupine na vezavo spojine v vezavno mesto encimov in posledično zaviralno delovanje na encim.

V drugem delu magistrske naloge pa smo sintetizirali novo aminokislino 2-amino-3-(3-hidroksifenil)propanojsko kislino (spojina **33**). Iz nje smo prav tako želeli pripraviti monobaktam z zaviralnim delovanjem na encima MurF in DdlB. Namen tega dela je bil najti sintezno pot z največjim izkoristkom. Aminokislino smo uspešno sintetizirali, vendar pa nam iz nje ni uspelo sintetizirati monobaktama.

Končnim spojinam smo določili zaviralno delovanje na izoliranih encimih MurF in DdlB iz *E. coli*. Ugotovili smo, da nobena spojina ni izkazala signifikantnega delovanja proti encimoma. Preverili smo še, ali spojine delujejo kot lažni substrati z MurF. Pri spojinah **21** in **27** smo opazili, da encim izkazuje manjšo aktivnost. Ti dve spojini bi se lahko vgradili v nastajajoči pentapeptid in tako delovali kot lažni substrat.

Ključne besede: monobaktami, MurF, DdlB.

ABSTRACT

The development of antibacterial drugs is one of the most important achievements in the medicine in the 20th century. However, the excessive use and misuse of antibacterial drugs lead to resistance of bacteria to wide range of antibiotics. The bacterial resistance represents a serious health care problem and shows the need for development of new compounds with novel mechanisms of action. One of the most important targets for development of new antibacterial drugs are enzymes involved in the bacterial cell walls biosynthesis. Ligases MurF and DdlB play a vital role in the final part of biosynthesis of basic monomer unit of peptidoglycan and are thus important targets.

In the master's thesis we synthesised new potential inhibitors of MurF and DdlB ligases, the dipeptides with a rigidized peptide bond within the monobactam ring. Those compounds mimic the dipeptide D-alanyl-D-alanine, which is a product of the enzyme reaction of the DdlB ligase and a substrate for MurF. A number of dipeptides with different substituents on monobactam ring were synthesized in order to examine structure – activity relationship.

In the second part of the master's thesis we synthesised a new amino acid 2-amino-3-(3-hydroxyphenyl)propanoic acid (compound **33**). We also wanted to prepare a monobactam with this amino acid. The purpose of this part was to find the synthetic pathway with the biggest efficiency. We successfully synthesised the amino acid, but we failed at synthesizing the monobactam.

We determined the inhibitory activity of the final compounds on the isolated enzymes MurF and DdlB from *E. coli*. None of the compounds showed significant inhibition of the enzymes. We also checked whether the compounds work as false substrates for MurF. We noticed that the enzyme shows small activity with the compounds **21** and **27**. These two compounds could be incorporated into the growing pentapeptide and thus act as the false substrates.

Keywords: monobactams, MurF, DdlB.

SEZNAM OKRAJŠAV

A ₂ pm	2,6-diaminopimelinska kislina
ADP	adenozindifosfat
Ala	alanin
ATP	adenozintrifosfat
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CDCl ₃	devteriran kloroform
CapB	poli- γ -glutamat sintetaza
CphA	cianoficin sintetaza
D-Ala-D-Ala	dipeptid D-alanil-D-alanin
D-Ala- D-Lac	dipeptid D-alanil-D-laktat
D-Ala- D-Ser	dipeptid D-alanil-D-serin
DA	diamino acid
DCC	<i>N, N'</i> -dicikloheksilkarbodiimid
dd	dublet dubleta
Ddl	D-alanil- D-alanin ligaza
DIAD	diizopropil azodikarboksilat
DKM	diklorometan
DMF	<i>N, N</i> -dimetilformamid
DMSO	dimetilsulfoksid
DMSO-d ₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>E. faecalis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
EtOAc	etilacetat
FeCl ₃	železov triklorid
FolC	folipoli- γ -L-glutamat sintetaza
G+	po Gramu pozitivne bakterije
G-	po Gramu negativne bakterije
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
GlmM	fosfoglukozamin mutaza

GlmS	glukozamin-6-fosfat aktiviran ribocim
GlmU	encim glukozamin-1-fosfat acetiltransferaza in <i>N</i> -acetilglukozamin-1-fosfat uridiltransferaza
Glu	glutaminska kislina
Gly	glicin
HCl	klorovodikova kislina
Hex	heksan
HoBt	hidroksibenzotriazol
HRMS	masna spektroskopija visoke ločljivosti
Hz	Hertz
IC ₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
K _i	konstanta encimske aktivnosti
Lys	lizin
m	multiplet
M	molarnost (mol/L)
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
MeOD	devteriran metanol
MF	mobilna faza
MS	masna spektroskopija
MurA	UDP- <i>N</i> -acetilglukozamin enolpiruviltransferaza
MurB	UDP- <i>N</i> -acetilenolpiruvilglukozamin reduktaza
MurC	UDP- <i>N</i> -acetilmuramat L-alanin ligaza
MurD	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin D-glutamat ligaza
MurE	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanin-D-glutamat mezo- diaminopimelat/ L-lizin ligaza
MurF	UDP- <i>N</i> -acetilmuramoil-L-alanil- L-glutamil-mezo- diaminopimelat/ L-lizin D-alanil-D-alanin ligaza
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NADPH	nikotinamind adenin dinukleotid fosfat
NaCl	natrijev klorid
Na ₂ SO ₄	natrijev sulfat
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin

NMR	jedrska magnetna resonanca
PEP	fosfoenolpiruvat
P _i	anorganski fosfat
PPh ₃	trifenilfosfin
ppm	parts per million
q	kvartet
RA	rezidualna aktivnost
Rf	retencijski faktor
r gen	gen, ki kodira rezistenco
s	singlet
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. pneumoniae</i>	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
<i>S. typhimurium</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>
Ser	serin
T	triplet
THF	tetrahidrofuran
Thr	treonin
TLC	tenkoplastna kromatografija (thin layer chromatography)
TMS	tetrametilsilan
UDP	uridildifosfat
UTP	uridiltrifosfat
UV	ultravijolična svetloba
Val	valin
VIS	vidna svetloba
δ	kemijski premik
λ	valovna dolžina
WHO	World Health Organization

1 UVOD

1.1 Protibakterijske učinkovine

V zadnjih nekaj desetletjih so izboljšave v zgodnjem prepoznavanju in obravnavanju nalezljivih bolezni močno zmanjšale obolevnost in smrtnost, povezano z njimi. To se je zgodilo deloma zaradi boljšega razumevanja bioloških mehanizmov teh bolezni, njihove patofiziologije in epidemiologije, predvsem pa zaradi hitrega razvoja varnih in učinkovitih učinkovin, ki so bile sposobne napasti in uničiti povzročitelje (1, 2).

Razvoj protibakterijskih učinkovin v 20. stoletju predstavlja enega največjih medicinskih dosežkov. Velik mejnik v borbi proti bakterijskim okužbam je prineslo odkritje sulfonamidov v 30. letih 20. stoletja, ki so predstavljali prvo učinkovino, učinkovito proti sistemskim bakterijskim okužbam. Sulfonamidom je sledil penicilin, ki je bil odkrit že leta 1929, vendar uspešno izoliran šele ob koncu 30. in začetku 40. let. Z uspehom penicilina se je začelo obdobje mnogih raziskav metabolnih produktov mikroorganizmov, kar je prineslo številne nove razrede protibakterijskih učinkovin (1, 3).

Antibiotiki so produkti mikroorganizmov ali njihovi sintetični analogi, ki zavirajo rast in preživetje drugih mikroorganizmov, na gostitelja pa imajo minimalen toksičen učinek. Učinkovine, ki so v celoti sinteznega izvora in imajo enako delovanje kot antibiotiki, pa imenujemo kemoterapevtiki. Izraz kemoterapevtiki se uporablja tudi v širšem pomenu in zajema vse protimikrobne, poleg tega pa tudi protitumorne učinkovine. V nadaljevanju magistrske naloge izraz antibiotiki enačimo z vsemi protibakterijskimi učinkovinami (1, 4).

Temeljni princip pri zdravljenju infekcij je izkoriščanje biokemijskih razlik med bakterijami in človekom. Prav na slednjem temelji selektivna toksičnost učinkovin, kar pomeni, da so toksične za bakterije, na človeka pa imajo minimalen učinek oziroma želeni učinki pretehtajo stranske. Po mehanizmu delovanja jih delimo na zaviralce (1, 4, 5):

- sinteze celične stene (β -laktami, vankomicin, bacitracin),
- sinteze proteinov (tetraciklini, aminoglikozidi, makrolidi, kloramfenikol),
- sinteze nukleinskih kislin (fluorokinoloni, rimpicin),
- metabolizma (sulfonamidi, trimetoprim),
- funkcije celične membrane (izoniazid, amfotericin B).

1.2 Odpornost bakterij na protibakterijske učinkovine

Antibiotiki so osnova za zdravljenje infekcijskih bolezni, vendar je njihova uporaba v veliko primerih neprimerna, saj se uporabljajo tudi za zdravljenje najbolj enostavnih in trivialnih okužb, dostikrat celo nebakterijske narave. Alexander Fleming je že leta 1945 v svojem govoru ob podelitvi Nobelove nagrade opozoril, da lahko neprimerna uporaba penicilina vodi do selekcije rezistentnih sevov bakterij, ki bi lahko povzročala resne okužbe. Razvoj rezistence je sicer normalen evolutijski proces mikroorganizmov, a je pospešen zaradi povečanih pritiskov, ki jih človek izvaja na bakterije z uporabo protibakterijskih učinkovin (2, 6).

Bakterijska rezistenca na antibiotike je lahko naravna (intrinzična) ali pridobljena. Naravna oblika rezistence nastane zaradi spontane mutacije genov v odsotnosti antibiotika in je manj pogosta kot pridobljena, a vseeno igra vlogo pri razvoju rezistence. Večinoma pa prisotnost antibiotika v koncentracijah, ki za bakterijo niso smrtne, predstavlja dražljaj, ki izzove bakterijski prilagoditveni odziv in je najpogostejši vzrok bakterijske rezistence na antibiotike. Dovzetne bakterije lahko pridobijo rezistenco na protibakterijske učinkovine z genetskimi mutacijami ali sprejmejo rezistentne gene od drugih bakterij. Geni, ki kodirajo to rezistenco (r-geni) se običajno nahajajo na specializiranih fragmentih DNA, imenovanih transpozoni, ki omogočajo rezistentnim genom enostavno premikanje z enega plazmida na drugega. Ko genetska mutacija poteče in povzroči spremembo bakterijske DNA, se lahko takšen genetski material prenaša na druge bakterije. Najpomembnejši in najpogostejši mehanizem prenosa rezistence je konjugacija, ki poteka s plazmidi. Plazmidi so krožni fragmenti DNA, ki imajo enostavnejšo strukturo od kromosomske DNA in se lahko razmnožujejo neodvisno od kromosoma. Plazmidi potujejo med bakterijami skozi cevaste strukture, imenovane pilusi, ki se tvorijo med bakterijama, ko sta blizu skupaj. Manj pomembna načina prenosa r-genov sta transdukcija in transformacija. Pri transdukciji bakterijski virus (bakteriofag) prenese genetski material v bakterijo, pri transformaciji pa bakterija prevzame prosto DNA iz druge, po navadi mrtve bakterije (2, 4, 5).

Ne glede na to, kako se r-geni prenesejo v bakterije, se rezistenca na antibiotik razvije, ko se gen začne izražati in povzroči biološki učinek, ki se odraža v zmanjšanem delovanju antibiotika. Teh bioloških mehanizmov je veliko in jih lahko združimo v naslednje skupine (2, 5, 7):

- tvorba encima, ki inaktivira učinkovino. Najpomembnejši primer takšnih encimov so β -laktamaze, ki cepijo β -laktamski obroč penicilinov in cefalosporinov ter tako uničijo učinkovino. Lahko pa encimi samo kemijsko spremenijo učinkovino in jo tako naredijo nenevarno za bakterijo. Takšna primera encimov sta acetiltransferaze, ki prenesejo acetilno skupino na učinkovino in tako inaktivirajo kloramfenikol ali aminoglikozide, ter esteraze, ki hidrolizirajo laktonski obroč makrolidov;
- zmanjšana akumulacija. Zmanjšan privzem ali povečano črpanje učinkovine iz bakterije povzročita, da je v bakteriji premajhna koncentracija učinkovine, ki bi lahko uničila bakterijo. Tak primer rezistence najdemo pri po Gramu negativnih bakterijah, ki spremenijo število in strukturo porinov (kanalov) v zunanji membrani in tako zmanjšajo prehod β -laktamov, tetraciklinov, aminoglikozidov in kloramfenikola;
- modifikacija receptorjev. Sprememba tarčnega receptorja za učinkovino povzroči, da se učinkovina ne more vezati nanj in tako ne pride do učinka. Primeri takšnega mehanizma so modifikacija penicilin vezočih proteinov, ki zmanjšajo učinek nekaterih penicilinov, sprememba ribosomskih podenot, ki zmanjša učinek aminoglikozidov, makrolidov in tetraciklinov, in modifikacija DNA-giraze, ki zmanjša učinek fluorokinolonov.

Odpornost bakterij na protibakterijske učinkovine predstavlja vedno večjo grožnjo za zdravje svetovnega prebivalstva. To grožnjo še poveča dejstvo, da se je v zadnjih dveh desetletjih močno zmanjšalo število novih protibakterijskih učinkovin na trgu. Farmacevtska podjetja se izogibajo raziskavam na področju protibakterijskih učinkovin, deloma iz tehničnih razlogov, saj zamenjava obstoječih širokospektralnih učinkovin z novimi učinkovinami s podobnim spektrom delovanja predstavlja velik izziv, deloma pa iz ekonomskih razlogov, saj imajo antibiotiki manjši pričakovan dobiček (8).

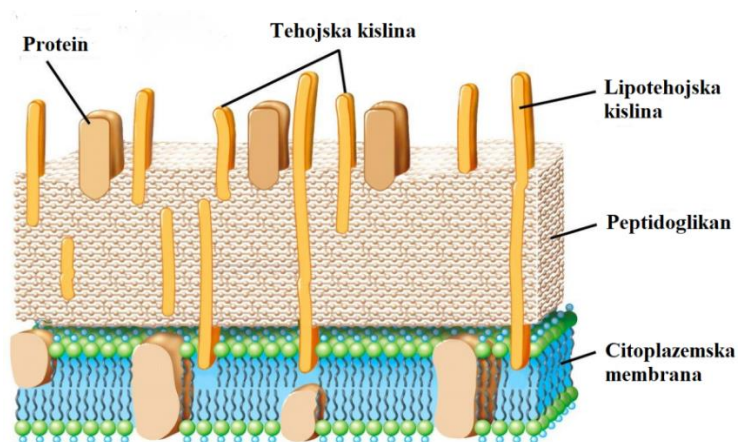
Problem antibiotične rezistence pa ne bo rešen z odkritjem novih učinkovin ali učinkovin z močnejšim baktericidnim delovanjem. Če je preteklost dober napovednik prihodnosti, se bodo bakterije nenehno privajale na okolje in razvile odpornost na nove antibiotike, resne bakterijske okužbe pa bodo ostale velik zdravstveni problem. Rešitve, ki so jih predlagale večje zdravstvene organizacije (WHO, CDC), so strog nadzor nad uporabo antibiotikov pri ljudeh, vestno predpisovanje receptov (brez uporabe pri virusnih okužbah) ter nadzorovana terapevtska uporaba v kmetijstvu in živalski industriji (2, 9).

1.3 Bakterijska celična stena

Bakterijska celična stena je elastična makromolekula, ki daje celici obliko in jo ščiti pred nabrekanjem ter lizo zaradi povečanja znotrajceličnega osmotskega tlaka. Obkroža spodaj ležečo krhko citoplazemsko membrano in varuje njo in znotrajcelične organele pred vplivi okolja. Klinično je celična stena pomembna, ker vsebuje antigene, ki lahko povzročijo odziv imunskega sistema, in ker je tarča nekaterih antibiotikov. Osnovni gradnik bakterijske celične stene je kompleksen polimer peptidoglikan. Glede na temeljne razlike v strukturi celične stene lahko večino bakterij razdelimo v dva osnovna razreda, ki se razlikujeta pri postopku barvanja po Gramu, ki ga je leta 1884 razvil Christian Gram. Po Gramu pozitivne bakterije se pri tem postopku obarvajo, po Gramu negativne pa ne (10, 11).

1.3.1 Po Gramu pozitivne bakterije

Celično steno bakterij G⁺ sestavlja mnogo plasti peptidoglikana, zloženih ena na drugo, ki oblikujejo debelo, rigidno strukturo. Vsebuje do 90 % peptidoglikana in je debela 30–100 nm. Pri mnogih bakterijah G⁺ v celični steni najdemo anionske molekule tehojskih kislin, ki so sestavljene iz alkohola (glicerol ali ribitol) in fosfata. Ti polialkoholi so večinoma kovalentno vezani na peptidoglikan, nekateri pa na membranske lipide. Slednje imenujemo lipotehojske kisline. Fosfatne skupine dajejo tehojskim kislinam negativen naboj, zato so vsaj deloma odgovorne za negativen naboj na površju celice, sodelujejo pa tudi pri urejanju kationskega ravnovesja v celici. Tehojska kislina vsebuje tudi veliko specifičnih antigenov celične stene in zato daje možnost serološke identifikacije bakterij (10, 12).

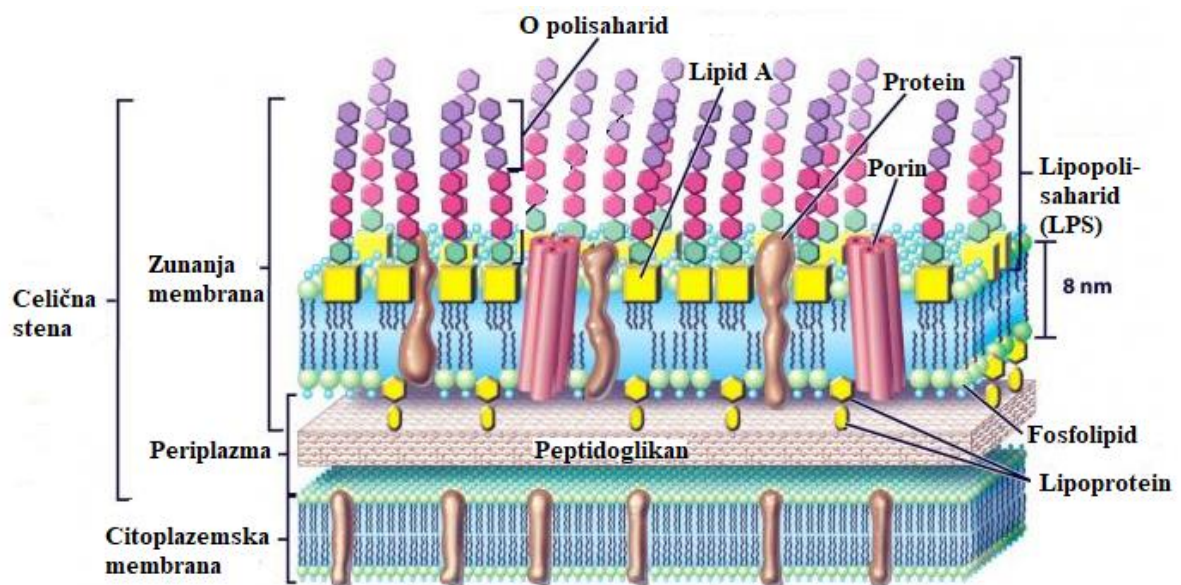


Slika 1: Celična stena po Gramu pozitivnih bakterij (prirejeno po (12)).

1.3.2 Po Gramu negativne bakterije

Celično steno bakterij G- sestavlja tanka plast peptidoglikana in zunanja membrana. Peptidoglikan je vezan na lipoproteine zunanje membrane in je obdan z mehko periplazmo, ki vsebuje visoke koncentracije transportnih proteinov in encimov za razgradnjo. Celična stena ne vsebuje tehojskih kislin in je zaradi tanjše plasti peptidoglikana bolj dovzetna za mehanske poškodbe. Zunanja membrana celic G- vsebuje lipoproteine, lipopolisaharide in fosfolipide. Njen močni negativni naboj je pomemben dejavnik pri fagocitozi in pri reakcijah komplementa, dveh komponentah obrambe pred gostiteljem. Zunanja membrana zagotavlja tudi bariero pred določenimi antibiotiki, encimi, detergenti, težkimi kovinami, žolčnimi solmi in nekaterimi barvili. Permeabilnost ji dajejo proteinski kanalčki, imenovani porini. Ti so lahko nespecifični in prehodni za vse majhne molekule ali pa specifični in prehodni za točno določene spojine.

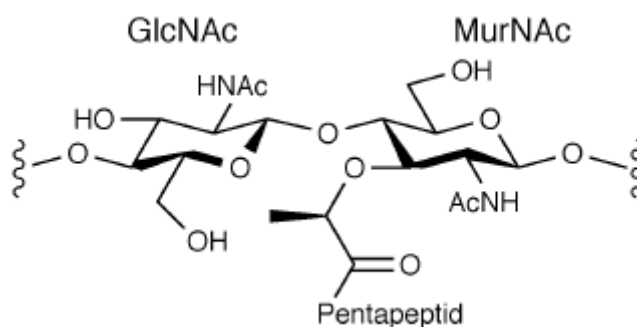
Lipopolisaharidi zunanje membrane zagotavljajo dve pomembni lastnosti G-bakterij. Polisaharidni del molekule sestavljajo sladkorji, imenovani O-polisaharidi, ki imajo vlogo antigenov in so pomembni pri razlikovanju vrst po Gramu negativnih bakterij pri seroloških raziskavah. Lipidni del lipopolisaharidov, imenovan lipid A, pa predstavlja endotoksin v gostiteljevem krvnem obtoku ali prebavnem traktu (10, 12, 13).



Slika 2: Celična stena po Gramu negativnih bakterij (prirejeno po (12)).

1.4 Peptidoglikan

Peptidoglikan ali murein je heteropolimer, sestavljen iz linearnih glikanskih verig, ki so prečno povezane s kratkimi peptidi. Glikanske verige sestavljata izmenjujoča se sladkorna derivata *N*-acetilglukozamin (GlcNAc) in *N*-acetilmuraminska kislina (MurNAc), ki sta povezana z β -1,4 glikozidno vezjo. D-laktoilna skupina MurNAc je zamenjana s peptidom, ki ima največkrat aminokislinsko zaporedje L-Ala- γ -D-Glu-mezo-A₂pm (ali L-Lys)-D-Ala-D-Ala (A₂pm, 2,6-diaminopimelinska kislina), po premreženju pa izgubi enega ali oba D-alaninska ostanka. Prečna povezava med glikanskimi verigami poteka med karboksilno skupino D-Ala na mestu 4 in aminoskupino diaminokislina na mestu 3. Ta povezava je lahko neposredna ali prek kratkega peptidnega mostu. Sestava peptidoglikana je v grobem pri vseh bakterijah enaka, vendar med posameznimi vrstami prihaja do razlik v sestavi glikanskih verig, peptidnih delov in v položaju ali sestavi peptidnih mostov (14, 15).

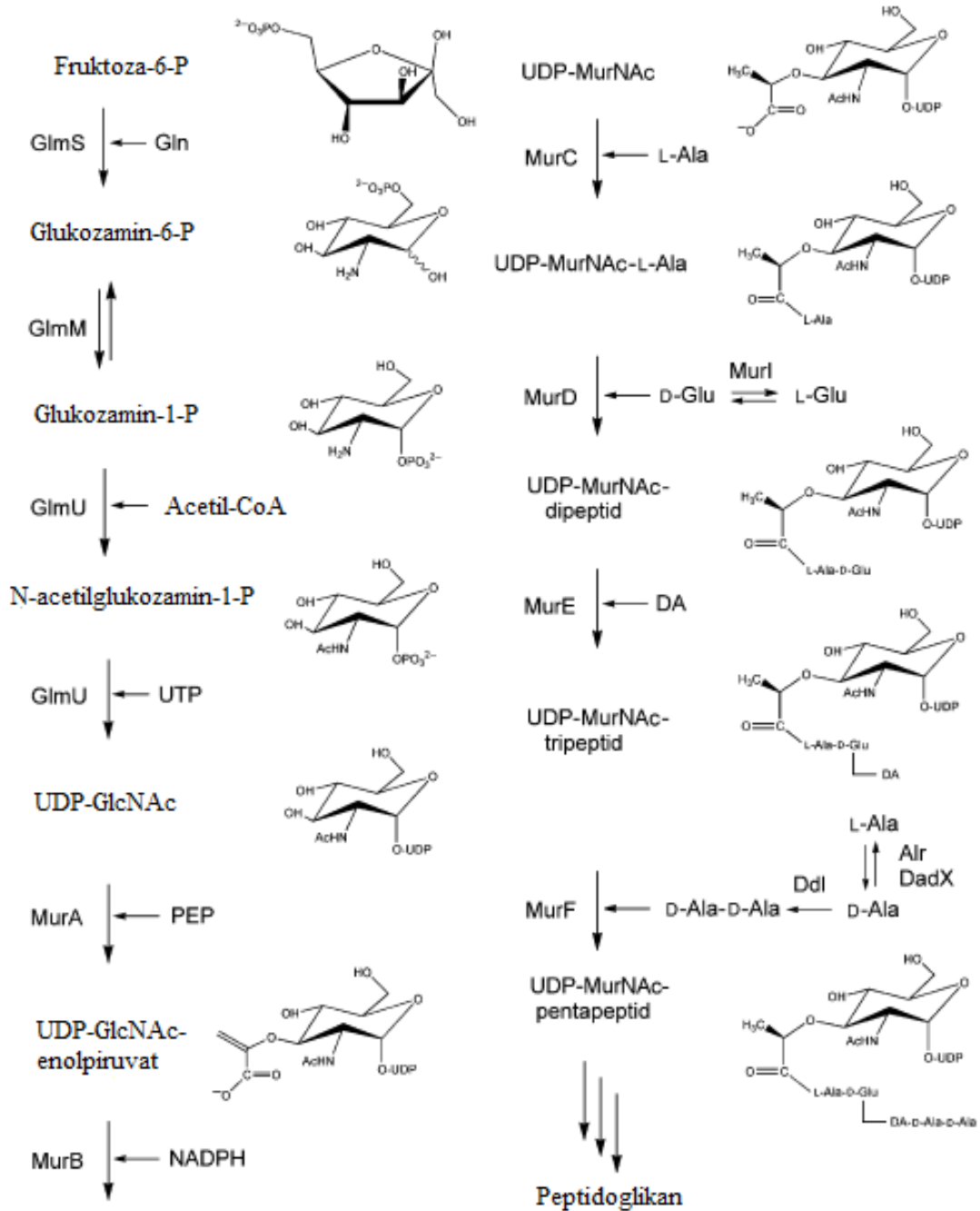


Slika 3: Osnovna monomerna enota peptidoglikana (prirejeno po (16)).

1.4.1 Biosinteza peptidoglikana

Biosintezo peptidoglikana lahko razdelimo v tri stopnje. Prva stopnja poteka v citoplazmi in se začne s pretvorbo fruktoza-6-fosfata v uridindifosfat-*N*-acetilglukozamin (UDP-GlcNAc). UDP-GlcNAc se nato pretvori v uridindifosfat-*N*-acetilmuramil-pentapeptid (UDP-MurNAc-pentapeptid), reakcijo pa katalizirajo encimi MurA enolpiruvil transferaza, MurB reduktaza in MurC-MurF ligaze. Druga stopnja biosinteze poteka na citoplazemski membrani. Fosfo-MurNAc-pentapeptidni del UDP-MurNAc-pentapeptida se prenese na membranski prenašalec baktoprenol in tvori lipid I (MurNAc-(pentapeptid)-pirofosforil-undekaprenol). Lipid I se nato poveže z GlcNAc iz UDP-GlcNAc in nastane lipid II (GlcNAc- β -(1,4)-MurNAc-(pentapeptid)-pirofosforil-undekaprenol). Uporaba lipofilne molekule baktoprenola omogoča celici transport hidrofilnih prekurzorjev iz

citoplazme skozi hidrofobno membrano na zunanjo stran membrane, kjer se prekursorji vgradijo v nastajajočo peptidoglikansko verigo. Prenos teh prekursorjev je kataliziran s specifičnimi translokazami ali flipazami. Zadnja stopnja biosinteze peptidoglikana, ki poteka na zunanji strani citoplazemske membrane, vključuje polimerizacijo novosintetiziranih disaharid-peptidnih enot in vključitev v nastajajoči peptidoglikan. Te reakcije potekajo na penicilin vezočih proteinih, ki katalizirajo reakcije transglikozilacije in transpeptidacije za nastanek glikozidnih in peptidnih vezi v peptidoglikanu (15, 17, 18).

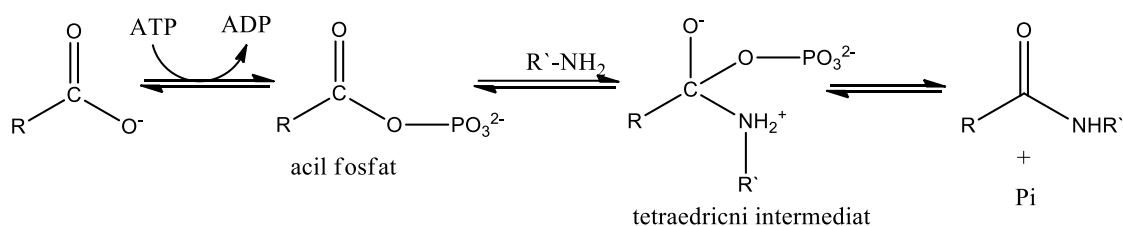


Slika 4: Biosinteza znotrajceličnih stopenj peptidoglikana (prirejeno po (19)).

1.5 Mur ligaze

Postopno sestavljanje peptidne verige peptidoglikana zagotavlja skupina od ATP-odvisnih, za bakterije esencialnih encimov, imenovanih mur ligaze. Katalizirajo reakcije dodajanja aminokislin L-Ala (MurC), D-Glu (MurD), mezo-diaminopimelinske kisline ali L-Lys (MurE) in D-Ala-D-Ala (MurF) na D-laktoilno skupino UDP-Mur-NAc. Študije so pokazale, da si mur ligaze delijo tri lastnosti:

- imajo enak mehanizem reakcije, ki se začne z aktivacijo karboksilne skupine UDP-prekurzorja z ATP ob prisotnosti dvovalentnega kationa (Mg^{2+} ali Mn^{2+}), da nastane acilfosfatni intermediat in ADP. Fosfat nato napade aminoskupina vstopajoče aminokisline (ali dipeptida v primeru MurF), pri čemer nastane visokoenergijski tetraedrični intermediat, ki razpade na produkt in anorganski fosfat (P_i);



Slika 5: Reakcijski mehanizem mur ligaz (prirejeno po (16)).

- vsebujejo serijo šestih nespremenjenih aminokislinskih ostankov in imajo zelo podobno ATP-vezavno sekvenco, kar je definiralo mur ligaze kot novo družino encimov. V to družino encimov spadajo še trije encimi, ki pa nimajo vloge pri biosintezi peptidoglikana: folipoli- γ -L-glutamat sintetaza (FolC), C-terminalni del cianoficin sintetaze (CphA) in poli- γ -glutamat sintetaza (CapB) iz bakterij Bacilli;
- imajo enako tridimenzionalno strukturo. N-terminalna domena sodeluje pri vezavi UDP-prekurzorja, centralna domena pri vezavi ATP, C-terminalna domena pa pri vezavi aminokisline ali dipeptida. Topologija centralne in C-terminalne domene je enaka pri vseh mur ligazah, N-terminalna domena pa vsebuje razlike med MurC in MurD na eni strani ter MurE in MurF na drugi strani. Te razlike so povezane z dolžino substratov UDP-prekurzorja. Encimi se lahko nahajajo v odprti ali zaprti konformaciji, zaprtje konformacije naj bi sprožila vezava liganda (16, 19, 20).

Mur ligaze torej predstavljajo skupino tesno povezanih proteinov, ki so nujno potrebni za sintezo peptidoglikana. Njihove značilnosti in dejstvo, da jih najdemo samo v bakterijskih celicah, jih naredijo dobre tarče za razvoj novih protibakterijskih učinkovin. Vsaka mur ligaza ima specifične prednosti kot individualna protibakterijska tarča, vse skupaj pa si delijo omenjene lastnosti, ki bi jih lahko izkoristili pri razvoju inhibitorjev, ki bi ciljali na vse ligaze hkrati in tako zmanjšali možnost razvoja rezistence (21).

1.6 MurF

MurF (UDP-*N*-acetilmuramoilalanil-D-glutamyl-2,6-diaminopimelat-D-alanil-D-alanil ligaza) katalizira adicijo dipeptida D-Ala-D-Ala na UDPMurNAc-tripeptid. V enterokokih, odpornih na vankomicin (VRE), je dipeptid D-Ala-D-Ala zamenjan z D-Ala-D-Lac ali D-Ala-D-Ser. Kinetični mehanizem reakcije vedno poteka v enakem vrstnem redu, in sicer najprej poteče vezava ATP, sledi UDPMurNAc-tripeptid in nato še D-Ala-D-Ala. MurF iz *E. coli* izkazuje enako afiniteto do obeh oblik MurNAc-tripeptida (meso-A₂pm in L-Lys). Izoliran in očiščen encim je visoko specifičen za C-terminalno aminokislino tripeptida. To je komplementarno specifičnosti D-Ala: D-Ala ligaze (Ddl), ki se večinoma nahaja na N-terminalni aminokislini in tvori z MurF t. i. mehanizem »dvojnega sita«, ki zagotavlja sintezo UDP-MurNAc-pentapeptida (19, 22, 23).

MurF protein iz bakterije *E. coli* je sestavljen iz 452 aminokislinskih ostankov in ima v 10–20 % identično aminokislinsko zaporedje kot MurC, MurD in MurE iz iste bakterije. Kristalna struktura apo oblike MurF vsebuje tri domene:

- N-terminalna domena obsega aminokislinske ostanke 1–81 in ima edinstveno topologijo, saj v bazi podatkov ni nobenega proteina s takšnim aminokislinskim zaporedjem;
- centralna domena obsega ostanke 82–310. Zvita je podobno kot vezavna mesta za mononukleotide v mnogih ATP-vezavnih proteinih;
- C-terminalna domena obsega ostanke 311–447. Vsebuje vezavno mesto za dinukleotid, znano pod imenom Rossmannovo zvitje.

Vse tri domene druga ob drugi tvorijo obliko polmeseca s široko odprtim dostopim prostorom, kamor se lahko veže substrat. Struktura MurF ima brez substrata odprto konformacijo, vezava ATP pa sproži spremembo konformacije (23).

1.6.1 Zaviralci encima MurF

Prvi odkriti zaviralci MurF so bili psevdotripeptidi in psevdotetrapeptidi aminoalkilfosfinske kisline z osnovno strukturo X-Lys-PO₂H-Gly-Ala. Kinetične študije so pokazale, da ti analogi prehodnega stanja delujejo kot reverzibilni kompetitivni inhibitorji z vrednostmi K_i med 200 μM in 700 μM (19).

Med najbolj obetavnimi odkritji je bilo odkritje zaviralcev MurF, ki jih je objavila družba Abbott Laboratories. Z uporabo tehnologije presejevanja na podlagi afinitete spojin sta bila zaznana dva zelo obetavna zadetka (spojina **1a**, IC₅₀ = 1 μM). Oba se vežeta na vezavno mesto za substrat in povzročita zaprtje domen encima. Po optimizaciji strukture spojine vodnice (**1a**) so dobili celo serijo zaviralcev z močnim učinkom (najmočnejša spojina **2a**, IC₅₀ = 22nM). Žal pa spojine niso pokazale pomembne antibakterijske učinkovitosti niti ob prisotnosti snovi za izboljšanje celične permeabilnosti (19, 24).

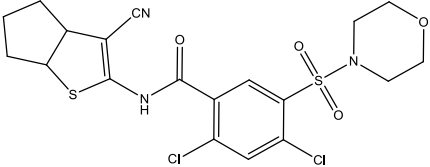
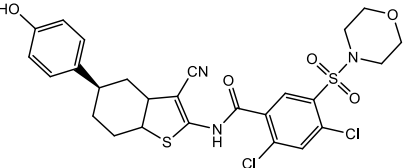
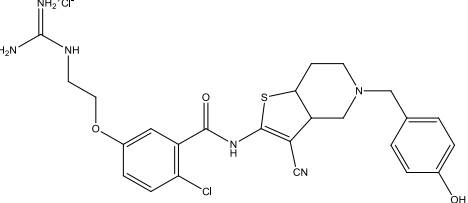
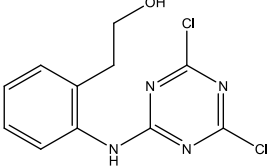
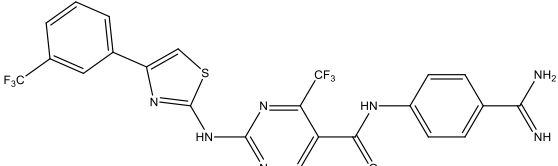
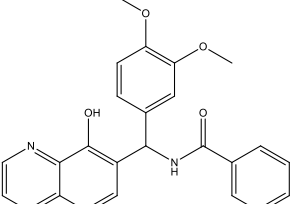
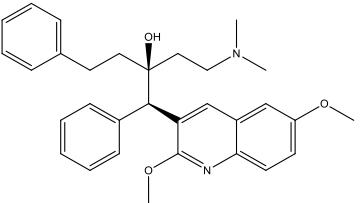
Kljub slabi protibakterijski aktivnosti so se nadaljnje raziskave na osnovi cianotiofenov nadaljevale in s strukturno modifikacijo spojin **1a** in **2a** so odkrili serijo zaviralcev MurF, ki so delovali v nanomolarnem območju na *S. pneumoniae* in v mikromolarnem območju na *E. coli* in *S. aureus* analoga encima. Derivati druge generacije cianotiofenov so bolj polarni in imajo dobro uravnotežene inhibitorne lastnosti proti MurF iz *S. pneumoniae* in *E. coli* (spojina **3a**). Spojina **3a** kaže tudi spodbudno protibakterijsko delovanje proti določenim sevom G⁺ in G⁻, vendar del njenega delovanja pripisujejo posledicam učinka poškodb membrane (25, 26, 27).

Zaviralce ligaze MurF so iskali tudi s številnimi računalniškimi metodami. Leta 2008 so s pristopom oblikovanja farmakoforja že znanih 39 inhibitorjev odkrili tri strukturno nove mikromolarne inhibitorje MurF iz *P. aeruginosa*, ki pa zaradi neugodnih strukturnih lastnosti niso predstavljale obetavnega nadaljevanja raziskav (28). Virtualno rešetanje na osnovi strukture MurF in nadaljnja optimizacija zadetkov je pripeljala do odkritja obetavnih 1,3,5-triazinov (spojina **4a**) (27, 30).

Leta 2006 so pri Johnson & Johnson z *in vitro* študijami na osnovi encima Mpl odkrili tiazolilaminopirimidinsko serijo inhibitorjev MurF iz *E. coli*. Najučinkovitejša spojina iz te serije je bila spojina **5a** z vrednostjo IC₅₀ 2,5 μM, nobena pa ni pokazala protibakterijske aktivnosti. Pri istem podjetju so odkrili tudi serijo 8-hidroksikinolinov, ki zavirajo MurF iz *E. coli*. Eden izmed teh inhibitorjev (spojina **6a**) je pokazal tudi protibakterijsko aktivnost. Na osnovi teh spojin je bil izoblikovan farmakofor, ki je pripeljal do odkritja

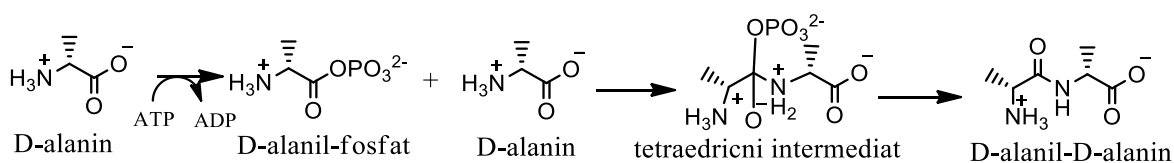
diarilkinolinov (spojina **7a**) z inhibitornim učinkom na MurF iz *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faeciu* in *S. aureus* (27, 29–31).

Tabela 1: Zaviralci encima MurF.

Spojina	Struktura spojine	IC ₅₀
1a		1 μM (<i>E. coli</i> MurF)
2a		22 nM (<i>E. coli</i> MurF)
3a		25 μM (<i>E. coli</i> MurF) 20 μM (<i>S. pneumoniae</i> MurF)
4a		450 μM (<i>E. coli</i> MurF)
5a		2,5 μM (<i>E. coli</i> MurF)
6a		16 μM (<i>E. coli</i> MurF)
7a		29 μM (<i>E. coli</i> MurF)

1.7 Ddl

D-alanin:D-alanin ligaza (Ddl) je od ATP odvisen bakterijski encim, ki sodeluje pri biosintezi peptidoglikana. Njegov produkt, D-alanil-D-alanin, je terminalni dipeptid UDP-*N*-acetilmuramoil pentapeptida. Mehanizem reakcije, ki jo katalizira Ddl, poteka po naslednjih korakih: najprej poteče fosforilacija N-terminalnega D-Ala, da nastane acetilfosfatni produkt (D-alanil-fosfat), sledi pa nukleofilni napad aminoskupine C-terminalnega D-Ala. Nastane tetraedrični intermediat, ki nato razpade na D-alanil-D-alanin in fosfatno skupino (32, 33).



Slika 6: Reakcijski mehanizem *D*-alanil:*D*-alanin ligaze (privzeto po(34)).

Encimi Ddl raznovrstnih bakterij imajo različna vezavna mesta za ligande, ki se razlikujejo po afiniteti in specifičnosti vezave. Vezavno mesto za N-terminalni D-Ala je visoko specifično za to aminokislino in jo veže z veliko afiniteto, vezavno mesto za C-terminalni D-Ala pa je manj specifično in veže tudi nekatere druge D-aminokislino (35, 36). Zaradi tega nekatere bakterije proizvajajo produkte D-alanil-D-serin dipeptid ali D-alanil-D-laktat depsipeptid. Ta sprememba terminalne aminokislino MurNAc-pentapeptida je zadostna, da povzroči rezistenco na antibiotik vankomicin. Vankomicin se v osnovi veže na D-alanil-D-alanilni konec pentapeptida, zamenjava terminalnega D-alanina z D-serinom ali D-laktatom pa povzroči od 6- do 1000-krat zmanjšano afiniteto vezave vankomicina (34).

V preteklosti so bile objavljene številne kristalne strukture D-alanil-D-alanin in D-alanil-D-laktat ligaz različnih vrst bakterij v prisotnosti ali odsotnosti različnih zaviralcev. Vse strukture vsebujejo tri domene: N-terminalno, centralno in C-terminalno domeno. Vsako izmed njih tvorijo β -trakovi, obdani z vijačnicami in zankami. Podobnost encimov med posameznimi vrstami močno variira, in sicer od 99,1 % za D-alanil- D-alanin ligazi bakterij *Thermus caldophilus* in *Thermus thermophilus* do 24,2 % za D-alanil- D-alanin ligazi bakterij *E. coli* (DdlB) in *Helicobacter pylori* (34).

Pri *E. coli* obstajata dve izoformi D-alanil-D-alanin ligaze: DdlA in DdlB. Vsebudeta 35 % identično aminokislinsko zaporedje in izražata enako specifičnost za substrat ter dovzetnost za znane inhibitorje. Centralna vdolbina katalitično aktivne konformacije encima DdlB vsebuje med centralno in C-terminalno domeno vezavno mesto za ATP, med N-terminalno in C-terminalno domeno pa bimolekularno vezavno mesto za D-alanin. V središču vdolbine se nahajata dva iona Mg^{2+} , na katera se veže fosfat iz ATP. C-terminalna domena vsebuje prilagodljivo zanko, ki prekriva centralno vdolbino encima (32).

1.7.1 Zaviralci Ddl

V zadnjih 50 letih je bilo odkritih mnogo potencialnih zaviralcev D-alanil-D-alanin ligaze, ki jih lahko razdelimo v štiri skupine:

- Analogi substrata: prvi zaviralec Ddl, ki je bil opisan v literaturi, je D-cikloserin [D-4-amino-3-izoksazolidon (**8a**)], strukturni analog substrata D-alanina, ki deluje kot kompetitivni reverzibilni zaviralec Ddl iz *S. aureus*. Njegove slabe lastnosti so visoka MIK (~50 mg/ml za *M. tuberculosis*), pogost razvoj odpornosti, zgolj bakteriostatično delovanje in nagnjenost k povzročanju nevrotoksičnosti. D-(1-aminoetil)fosfonska kislina [D-Ala(P) (**9a**)] ter njeni mono- in dikloro derivati izražajo močan zaviralni učinek proti Ddl iz *E. faecalis* ($IC_{50} = 9,3 \times 10^{-4}$ M) in *Salmonella*. Te snovi kažejo šibko protibakterijsko delovanje, najverjetneje zaradi visoke polarnosti in slabe prehodnosti v citoplazmo. Zaviralno delovanje na Ddl iz *Salmonella typhimurium* so dokazali tudi analogu alanina, (1-aminoetil)boronski kislini [Ala-B, (**10a**)] [$K_i = 35 \mu M$], ki ima karboksilno kislino alanina zamenjano z boronsko kislino, zato tekmuje z alaninom za vezavo na vezavnih mestih Ddl. D-(1-aminoetil)fosfinska kislina (**11a**) [$K_i = 0,4 \mu M$], fosfinski analog Ala(P) (**2b**), je bila sintetizirana za analizo učinka oksidacijskega stanja fosforjevega atoma na inhibicijo. V primerjavi s fosfatno skupino PO_3^{2-} se fosfinska skupina PHO_2^- obnaša podobno kot skupina COO^- pri pH 7,4. Fosfinska kislina (**11a**) je kompetitivni zaviralec Ddl iz *S. typhimurium*.
- Analogi produkta: testiranih je bilo mnogo analogov D-alanil-D-alanina kot potencialnih zaviralcev Ddl. Specifično inhibicijo so opazili samo pri dipeptidih s konfiguracijo DD. N-terminalna stran encima je visoko specifična za D-aminokislino (D-alanin, D- α -amino-n-butirna kislina), C-terminalna stran pa je nizko specifična (D-alanin, D-valin, D- α -amino-n-butirna kislina, D-serin, D-treonin in D-norvalin).

Ugotovili so, da so dipeptidi D-Ala-D-Ala, D-Ala-D-Butyr, D-Ala-D-Val in D-butyr-D-Ala kompetitivni, D-Ala-D-Ser in D-Ala-D-Thr pa nekompetitivni zaviralci encima Ddl.

- Analogi prehodnega stanja: v to skupino zaviralcev Ddl spadajo različne fosfonske in fosfinske kisline, ki oponašajo domnevno prehodno stanje encimske katalitične reakcije. (3-amino-2-oksoalkil)fosfonske kisline (**12a**) so lažni substrati, ki imajo C-terminalni ostanek zamenjan z α -aminokislino, ki ima namesto karboksilne fosforilno skupino. Te spojine so učinkoviti zaviralci Ddl, nimajo pa signifikantne protibakterijske aktivnosti.

Med fosfinskimi kisljinami imajo na Ddl iz *E. faecalis* najmočnejši učinek derivati 1(*S*)-aminoetil-(2(*R*)-karboksi-1-*n*-propil)fosfinske kisline (**13a**). Kljub močnemu učinku na izoliran encim pa izkazujejo slabo protibakterijsko delovanje.

- Drugi zaviralci: v zadnjih nekaj letih je bilo s pomočjo novejših tehnik odkrivanja spojin odkritih mnogo novih struktur inhibitorjev, ki nimajo nobenih podobnosti s substratom, produktom ali intermediati reakcije.

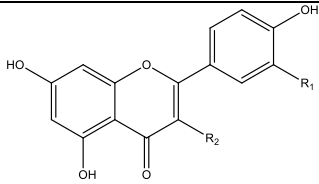
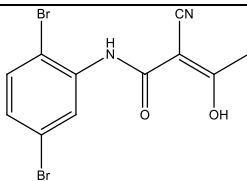
Po principu *de novo* so odkrili dva nova razreda inhibitorjev DdlB. Aminokislino na osnovi ciklopropila (**14a**), testirane v diastereomerni mešanici, učinkujejo na DdlB ($K_i = 12,5 \mu\text{M}$), nimajo pa učinka na D-alanil-D-laktat ligazo VanA. Hidroksietilamini (**15a**) pa inhibirajo 75–80 % aktivnosti obeh encimov pri koncentraciji 500 μM .

Z rešetanjem raznih knjižnic spojin so odkrili nove zaviralce, kot so 3-kloro-2,2-dimetil-*N*-[4-(trifluorometil)fenil]propanamin (**16a**), diazenkarboksamidi (**17a**) ter flavonoida apigenin in kvercetin (**18a**).

S strukturnim prilagajanjem vezavnega mesta za ATP v Ddl in drugih razredih kinaz pa so odkrili tirozin kinazni inhibitor LFM-A13 (**19a**), ki deluje kot kompetitivni inhibitor na Ddl ($K_i = 185 \mu\text{M}$) (34).

Tabela 2: Zaviralci encima Ddl.

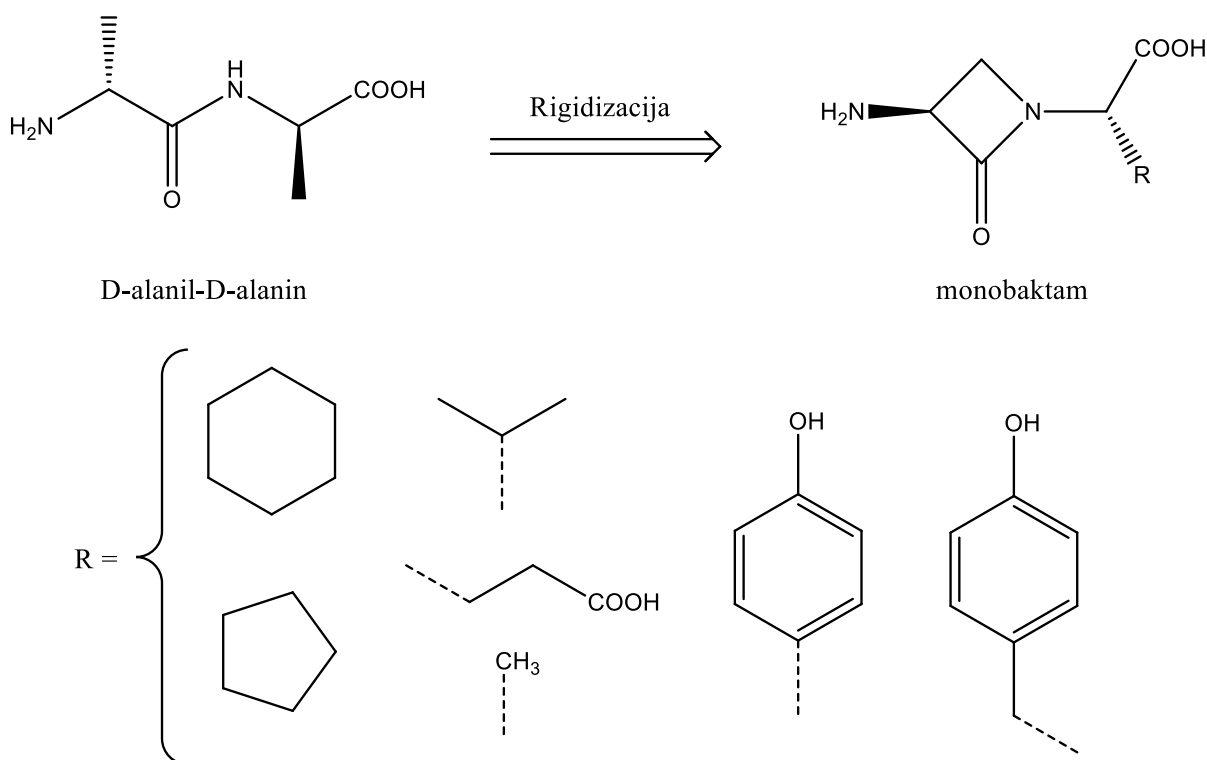
Spojina	Struktura spojine	K _i
<u>8a</u>		0,25 mM
<u>9a</u>		R ₁ , R ₂ = H; 0,5 mM R ₁ = H, R ₂ = Cl; 15 mM R ₁ = Cl, R ₂ = Cl; 24mM
<u>10a</u>		35 μM
<u>11a</u>		0,4 mM
<u>12a</u>		Y = CH ₂ ; 510 μM Y = NH; 50 μM Y = <i>E</i> -CH=CH, 1 μM
<u>13a</u>		R = CH ₃ ; 4 μM R = SCH ₃ ; 1,2 μM R = CH ₂ Ph; 3 μM
<u>14a</u>		12,5 μM
<u>15a</u>		R ₁ = OCH ₃ , R ₂ = H R ₁ = F, R ₂ = H R ₁ = F, R ₂ = Ph
<u>16a</u>		4 μM
<u>17a</u>		MIC = 64 mg/l (<i>E. coli</i>) MIC = 256 mg/l (<i>S. aureus</i>)

<p><u>18a</u></p>		<p>$R_1, R_2 = H; 119 \mu\text{M}$ $R_1, R_2 = OH; 10 \mu\text{M}$</p>
<p><u>19a</u></p>		<p>185 μM</p>

2 NAMEN DELA

Cilj našega dela je sinteza in biološko vrednotenje novih potencialnih zaviralcev encimov MurF in DdlB. Spojine, ki jih bomo sintetizirali, bodo posnemale dipeptid D-alanil-D-alanin, ki je sicer produkt encimske reakcije encima Ddl in substrat za MurF, v visokih koncentracijah pa zavira delovanje Ddl in s tem uravnava lastno proizvodnjo (37). Izhajali bomo iz D-aminokislin, ki so specifične za bakterijski svet, sinteze pa bodo stereospecifične. Izvajali jih bomo pod pogoji, s katerimi bomo poskušali ohraniti stereogene centre in D-konfiguracijo vse do končnih produktov.

Izhajali bomo iz aminokislina serina, ki ji bomo najprej uvedli dibenzilno zaščito na aminoskupino, nato pa na karboksilno skupino uvajali različne D-aminokislina in tako dobili različne dipeptide. Dobljene dipeptide bomo ciklizirali in jih na koncu odščitili. Namen ciklizacije bo rigidizacija peptidne vezi, saj bomo tako lažje ohranili D-konfiguracijo.



Slika 7: Primerjava struktur D-alanil-D-alanina in monobaktama (zgoraj) ter stranske skupine R (spodaj).

Na sintetiziranih spojinah bomo ugotavljali povezavo med strukturo oziroma stransko skupino R (slika 7) monobaktama in njegovim delovanjem. S spreminjanjem stranske skupine bomo poskušali posnemati tudi druge naravne substrate encima MurF iz nekaterih bakterij (na primer D-Ala-D-Ser pri enterokokih, odpornih na vankomicin).

V drugem delu magistrske naloge bomo sintetizirali novo aminokislino, ki jo bomo vključili v dipeptid in poskušali sintetizirati monobaktam. V literaturi bomo poiskali različne sintezne postopke in preizkusili, po katerem dobimo največji izkoristek produkta. Slednjega bomo izvedli tudi na večji skali in proizvedli večjo količino aminokislina za nadaljnjo sintezo monobaktama.

Sintetizirane končne spojine bomo biokemijsko ovrednotili z določitvijo zaviralne aktivnosti na izoliranih encimih MurF in DdlB iz *E. coli*. Poleg običajnega testa za inhibicijo bomo preverili tudi, ali spojine delujejo kot lažni substrati za MurF.

3 MATERIALI IN METODE

3.1 Materiali

Pri eksperimentalnem delu v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev (Merck, Apollo Scientific, Fluka, Sigma Aldrich, Acros). Raztopine, ki smo jih uporabljali pri ekstrahiranjih, smo pripravili z raztapljanjem oz. redčenjem koncentrirane HCl, NaOH, citronske kisline, NaHCO₃ in NaCl.

3.2 Metode

- **Kromatografske metode**

Tankoplastna kromatografija (TLC): uporabljali smo plošče TLC-Silica gel 60 GF254 proizvajalca Merck z 0,20 mm nanosom silikagela na aluminijastem nosilcu z dodanim fluorescenčnim indikatorjem. Mobilne faze smo navedli pri posameznih spojinah. Za detekcijo spojin smo uporabljali UV-svetlobo valovnih dolžin $\lambda = 254$ nm in $\lambda = 366$ nm in orositvene reagente ninhidrin, FeCl₃ ter 2,4-dinitrofenilhidrazin.

Kolonska kromatografija pod tlakom (»flash« kolonska kromatografija): za čiščenje spojin smo za stacionarno fazo v vseh primerih uporabili silikagel 60 proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,04–0,063 mm. Mobilne faze so bile različne in so navedene pri posameznih spojinah.

Reverznofazna kromatografija: za čiščenje končnih spojin smo uporabili napravo Biotage Isolera One System. Stacionarna faza je bila Biotage SNAP Ultra C18, za mobilno fazo pa smo uporabili vodo in acetonitril z gradientom 0–10 %. Spojine smo detektirali pri valovnih dolžinah 220 in 254 nm.

- **Spektroskopske metode**

Jedrska magnetna resonanca (NMR): NMR-spektre smo posneli na spektrometru Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v devteriranih topilih CDCl₃, DMSO-d₆ in MeOD. Interni standard je bil TMS. Za obdelavo spektrov smo uporabili program NMRnotebook 2.80 proizvajalca NMRTEC S.A.S. Kemijske premike smo podali v enotah »parts per million« (ppm) glede na interni standard.

Masna spektroskopija: masne spektre končnih spojin so posneli v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožefa Stefana v Ljubljani.

- **Določanje temperatur tališč**

Temperature tališč sintetiziranih spojin smo izmerili s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico Leica na Fakulteti za farmacijo in so nekorrigirane.

- **Poimenovanje in risanje spojin**

Za poimenovanje spojin in risanje struktur smo uporabili računalniški program ChemDraw Ultra 12.0 proizvajalca Cambridge Soft. Pri iskanju sinteznih postopkov v podatkovnih bazah smo si pomagali s programskim orodjem SciFinder Scholar.

- **Ekstrakcije**

Za ekstrakcije smo uporabili 0,1 M in 1 M raztopino NaOH, 1 M raztopino HCl, 1 M raztopino citronske kisline ter nasičeni raztopini NaCl in NaHCO₃.

- **Biokemijsko testiranje**

Sintetiziranim spojinam smo določili njihovo zaviralno aktivnost na izoliranih encimih MurF in DdlB iz bakterije *Escherichia coli* z uporabo testa z barvilom malahitno zeleno. Pri testu smo posredno določali sproščeni anorganski fosfat, ki nastane pri encimskih reakcijah in z molibdatom tvori fosfomolibdat, ta pa s tremi molekulami malahitno zelenega tvori obarvan kompleks, ki ga lahko sprektrofotometrično merimo.

Reakcijska zmes za inkubacijo encima z volumnom 50 μ L je vsebovala:

- MurF iz *E. coli*: pufer 50 mM Hepes (pH 8,0); 50 mM MgCl₂, 0,005 % Triton X-114, 600 μ M D-Ala-D-Ala, 100 μ M UDP-tripetid-mA₂p; 500 μ M ATP; očiščen MurF_{Ec} in 1 mM testirane spojine, raztopljene v DMSO;
- DdlB iz *E. coli*: pufer 50 mM Hepes (pH 8,0), 5 mM MgCl₂, 0,005 % Triton X-114, 6,5 mM (NH)₄SO₄, 10 mM KCl, 700 μ M D-Ala, 500 μ M ATP, očiščen DdlB in 1 mM testirane spojine, raztopljene v DMSO.

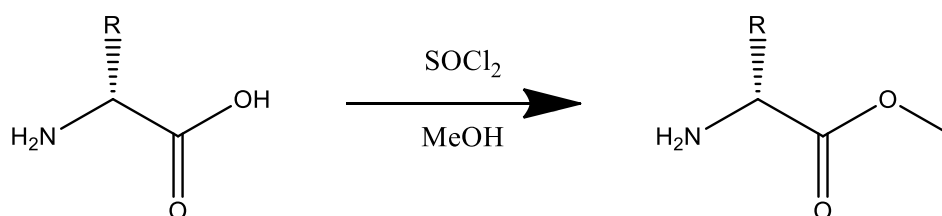
Vse spojine so bile topne v reakcijski zmesi, ki je vsebovala 5 % DMSO. Po 15 minutah inkubacije pri 37 °C smo reakcijski zmesi dodali reagent Biomol in po 5 minutah izmerili absorbanco pri valovni dolžini $\lambda = 650$ nm. Vse meritve smo izvedli v dveh paralelkah. Rezidualne aktivnosti smo izračunali glede na kontrolne vzorce, ki niso vsebovali inhibitorja.

4 EKSPERIMENTALNO DELO

4.1 Splošni postopki

4.1.1 Splošni postopek za zaščito karboksilne skupine

Aminokislino (1 eq) smo raztopili v metanolu (100 ml) in raztopino ohladili na ledeni kopeli. Po kapljicah smo med mešanjem dodali SOCl_2 (3 eq), nato pa segrevali na refluxu 1–2 uri. Na rotavaporju smo odparili topilo, 2–3-krat sprali z dietiletrom in produkt ekstrahirali v etilacetat z raztopino NaHCO_3 . Organsko fazo smo sušili z Na_2SO_4 , filtrirali in uparili topilo.



Slika 8: Reakcijska shema splošnega postopka za zaščito karboksilne skupine.

4.1.2 Splošni postopek za tvorbo amidne vezi s sklopitveno reakcijo

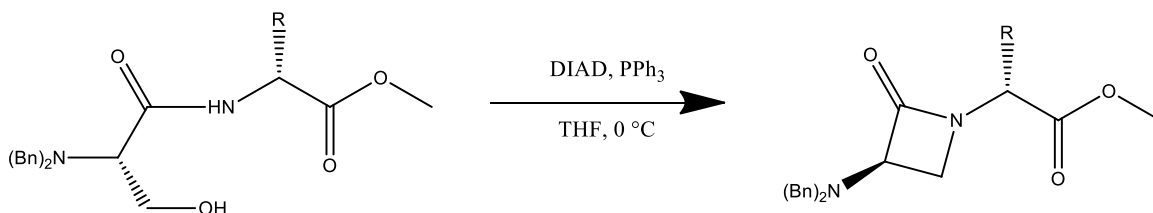
Spojino **1** (1,1 eq), hidroksibenzotriazol (HOBt) (1,2 eq) in *N*-metilmorfolin (NMM) (2,5 eq) smo raztopili v DCM (100 ml) in pustili mešati na sobni temperaturi, dokler se ni vse raztopilo. Reakcijsko zmes smo ohladili na ledeni kopeli in dodali *N,N'*-dicikloheksilkarbodiimid (DCC) (1,2 eq), čez 15 minut pa smo na sobni temperaturi dodali še zaestreno D-aminokislino (1 eq) in pustili mešati čez noč. Naslednji dan smo izvedli ekstrakcijo z vodnimi raztopinami citronske kisline, nasičene raztopine NaHCO_3 in NaCl , organsko sušili z Na_2SO_4 , filtrirali, odparili topilo ter produkt očistili s kolonsko kromatografijo.



Slika 9: Reakcijska shema splošnega postopka za tvorbo amidne vezi s sklopitveno reakcijo.

4.1.3 Splošni postopek za Mitsunobujevo reakcijo

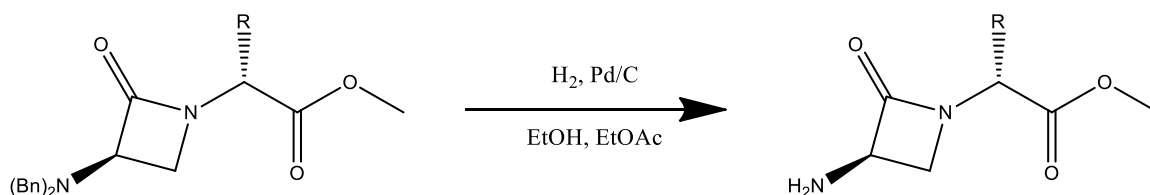
V bučko smo natehtali trifenilfosfin (PPh_3) (1,5 eq), prepihali z argonom, raztopili v trihidrofuranu (THF) in raztopino ohladili na ledu. Nato smo po kapljicah dodali diizopropil azodikarboksilat (DIAD) (1,5 eq), na koncu pa še dipeptid (1 eq) in reakcijsko zmes pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. Naslednji dan smo odparili topilo in produkt očistili s kolonsko kromatografijo.



Slika 10: Reakcijska shema splošnega postopka za Mitsunobujevo reakcijo.

4.1.4 Splošni postopek za odščito aminske skupine

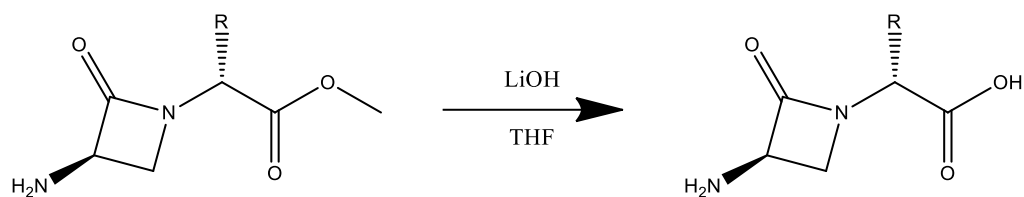
Dipeptid smo raztopili v mešanici etanola (10ml) in etil acetata (90 ml), prepihali z argonom, dodali paladij na ogljiku in prepihovali z vodikom. Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč pri sobni temperaturi z vodikom nad reakcijsko zmesjo. Reakcijsko zmes smo nato filtrirali s presesavanjem, odparili topilo in produkt očistili s kolonsko kromatografijo.



Slika 11: Reakcijska shema splošnega postopka za odščito aminske skupine.

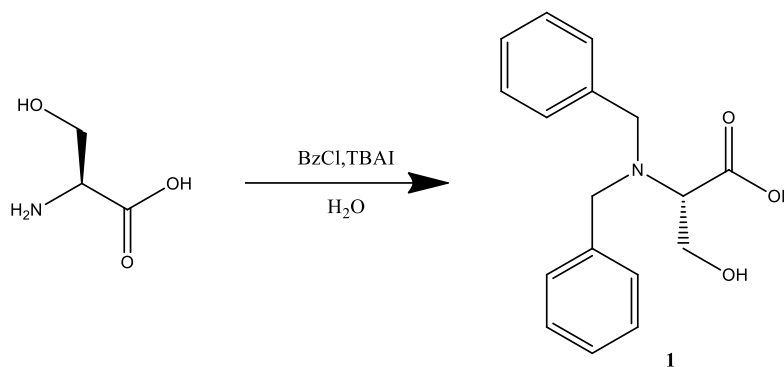
4.1.5 Splošni postopek za odščito karboksilne skupine

Dipeptid smo raztopili v THF, dodali LiOH (5 eq, 0,1 mol/l) ter pustili mešati nekaj časa. Potek hidrolize smo spremljali z razvijanjem TLC-ploščic (MF: DKM/MeOH = 9/1). Ko je hidroliza v celoti potekla, smo raztopino nakisali s HCl (37 %) do pH 6 in odparili topilo. Produkt smo očistili z reverzno fazno kromatografijo. Kot mobilno fazo smo uporabili vodo in acetonitril (gradient acetonitrila od 0 do 10 %).



Slika 12: Reakcijska shema splošnega postopka za odščito karboksilne skupine.

4.2 Sinteza (*S*)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanojske kisline (**1**)



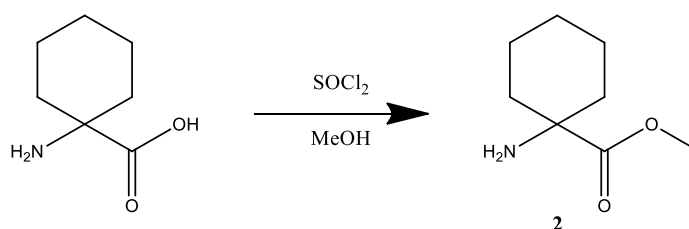
Slika 13: Reakcijska shema sinteze (*S*)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanojske kisline.

Suspenziji L-serina (10,50 g, 0,100 mol, 1,0 eq) v metanolu (63 ml) smo na ledeni kopeli med konstantnim mešanjem na magnetnem mešalu počasi dodajali acetil klorid (11,32 ml, 0,150 mol, 1,5 eq). Reakcijsko zmes smo segreli do refluxa in jo pustili mešati čez noč. Naslednji dan smo reakcijsko zmes ohladili na ledeni kopeli in ji dodali natrijev hidrogenkarbonat (29,82 g, 0,355 mol), natrijev jodid (3,75 g, 0,025 mol) ter benzil klorid (23,59 ml, 0,205 mol, 2,0 eq). Reakcijsko zmes smo segreli do refluxa in pustili mešati čez noč. Reakcijsko zmes smo ohladili na sobni temperaturi, filtrirali skozi Celite® in filtrirno pogačo sprali z metanolom (3 × 15 ml). Filtrirano metanolno raztopino smo dodali na ledu ohlajeni raztopini KOH (22,44 g, 0,400 mol) v vodi (52,50 ml) in reakcijsko zmes pustili mešati na ledeni kopeli čez noč. Dodali smo vodo in uravnali pH med 6,5 in 7,0 s 37 % HCl. Reakcijsko zmes smo segreli na sobno temperaturo in med mešanjem uravnali pH med 3,0 in 3,4. Reakcijsko zmes smo filtrirali in filtrirno pogačo sprali z vodo (30 ml) ter jo sušili v sušilniku do suhega.

(<i>S</i>)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanojske kisline (dibenzil serin)		M = 285,34 g/mol
Videz:	Beli kristali	
Tališče:	120–124 °C	

Izkoristek reakcije:	83 %
¹H-NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 3,26 (dd, $J_1 = 7,3$ Hz, $J_2 = 6,0$ Hz, 1H, CH), 3,61–3,67 (m, 3H, CH ₂ -Bn + CH ₂), 3,77–3,84 (m, 3H, CH ₂ -Bn + CH ₂), 4,71 (s, 1H, OH), 7,21–7,24 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,30–7,33 (m, 4H, 4 × Ar-H), 7,36–7,38 (m, 4H, 4 × Ar-H), 12,45 (s, 1H, CO-OH).

4.3.1 Sinteza metil 1-aminocikloheksankarboksilata (2)

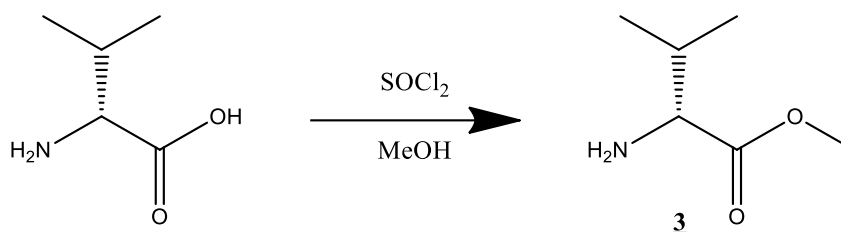


Slika 14: Reakcijska shema sinteze metil 1-aminocikloheksankarboksilata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za zaščito karboksilne skupine.

Metil 1-aminocikloheksankarboksilata		M = 157,21 g/mol
Videz:	Beli kristali	
T_{tal}:	191–196 °C	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,37	
Izkoristek reakcije:	63 %	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,37–1,50 (m, 6H, 6 × Cy-H), 1,64–1,69 (m, 2H, 2 × Cy-H), 1,92–1,97 (m, 2H, 2 × Cy-H), 3,74 (s, 3H, CH ₃), 7,29 (s, 2H NH ₂).	
MS (ESI)	Izračunano za C ₈ H ₁₅ NO ₂ [M+(H)] ⁺ (m/z):	158,12
	Izmerjena vrednost:	157,90

4.3.2 Sinteza (*R*)-metil 2-amino-3-metilbutanoata (3)

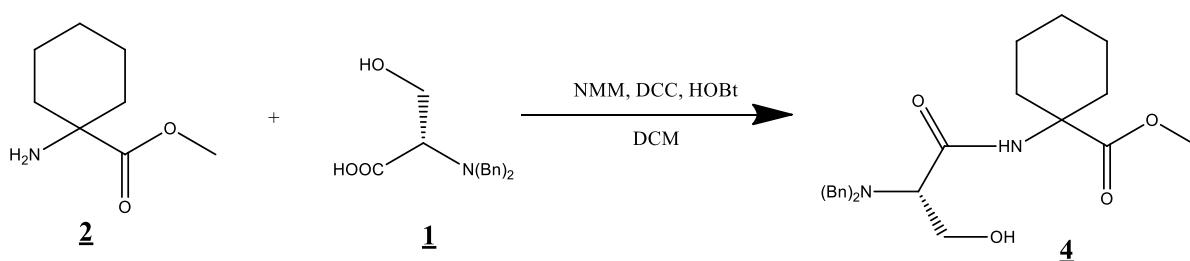


Slika 15: Reakcijska shema sinteze (*R*)-metil 2-amino-3-metilbutanoata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za zaščito karboksilne skupine.

(R)-metil 2-amino-3-metilbutanoat		M = 131,17 g/mol
Videz:	Beli kristali	
T_{tal}:	152–156 °C	
Izkoristek reakcije:	69 %	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 0,93 (d, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H, CH ₃), 0,98 (d, <i>J</i> = 7,0 Hz, 3H, CH ₃), 2,17–2,22 (m, 1H, CH), 3,74 (s, 3H, CH ₃ -O), 3,83 (s, 1H, CH), 8,67 (s, 2H, NH ₂).	
MS (ESI)	Izračunano za C ₆ H ₁₃ NO ₂ [M+(H)] ⁺ (m/z):	132,10
	Izmerjena vrednost:	132,06

4.4.1 Sinteza (S)-metil 1-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) cikloheksankarboksilata (**4**)



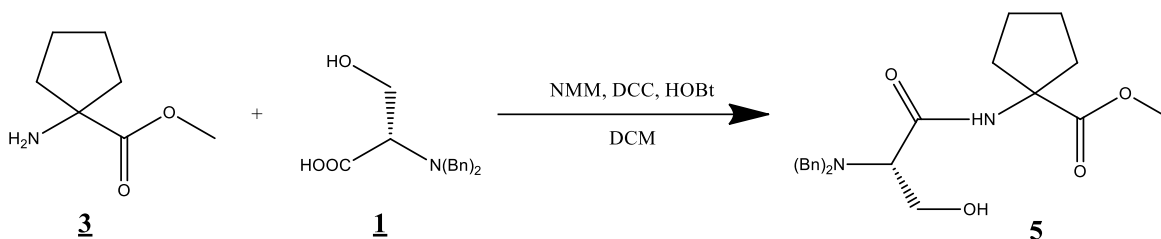
Slika 16: Reakcijska shema sinteze (S)-metil 1-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) cikloheksankarboksilata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za tvorbo amidne vezi s sklopitveno reakcijo. Za ekstrakcijo smo namesto citronske uporabili klorovodikovo kislino (1 M). Za čiščenje s kolonsko kromatografijo smo uporabili mobilno fazo: EtOAc/Hex = 2/1.

(S)-metil 1-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)cikloheksan-1-karboksilat		M = 424,53 g/mol
Videz:	Beli kristali	
T_{tal}:	102–105 °C	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex=2/1) = 0,23	
Izkoristek reakcije:	75 %	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 1,18–1,26 (m, 2H, 2 × Cy-H), 1,46–1,54 (m, 4H, 4 × Cy-H), 1,63–1,69 (m, 2H, 2 × Cy-H), 1,92–2,00 (m, 2H, 2 × Cy-H), 3,57 (s, 3H, CH ₃), 3,74–3,87 (m, 6H, 3 × CH ₂), 4,72 (t, <i>J</i> = 5,0 Hz, 1H, CH), 7,21–7,25 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,30–7,38 (m, 8H, 8 × Ar-H), 7,82 (s, 1H, NHCO).	

MS (ESI)	Izračunano za C ₂₅ H ₃₂ N ₂ O ₄ [M+(Na)] ⁺ (m/z):	447,52
	Izmerjena vrednost:	446,78

4.4.2 Sinteza (S)-metil 1-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksiopropanamido) ciklopentankarboksilata (**5**)

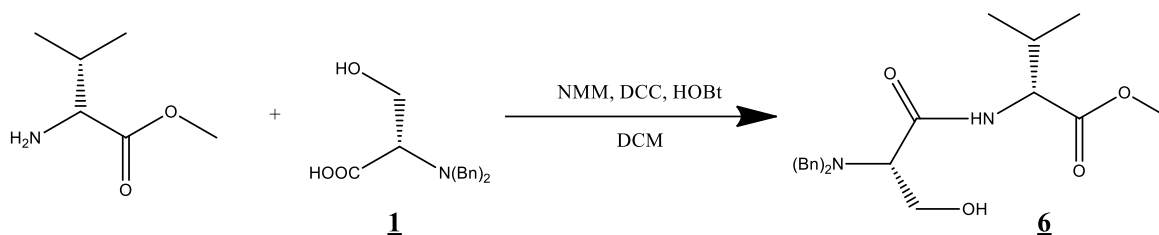


Slika 17: Reakcijska shema sinteze (S)-metil 1-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksiopropanamido) ciklopentankarboksilata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za tvorbo amidne vezi s sklopitveno reakcijo. Za čiščenje s kolonsko kromatografijo smo uporabili mobilno fazo: EtOAc/Hex = 2/1.

(S)-metil 1-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksiopropanamido) ciklopentankarboksilat		M = 410,51 g/mol
Videz:	Beli kristali	
T_{tal}:	117–119 °C	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 2/1) = 0,14	
Izkoristek reakcije:	36 %	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,63–1,86 (m, 4H, 4 × Cyp-H), 1,92–2,07 (m, 2H, 2 × Cyp-H), 2,15–2,22 (m, 1H, 1 × Cyp-H), 2,28–2,36 (m, 1H, 1 × Cyp-H), 3,33 (dd, <i>J</i> ₁ = 7,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 4,1 Hz, 1H, N-CH _{2a} -CH), 3,38 (bs, 1H, OH), 3,60 (d, <i>J</i> = 13,6 Hz, 2H, CH ₂ -Ph), 3,72 (s, 3H, CH ₃), 3,96–3,99 (m, 3H, CH ₂ -Ph + CH _{2b}), 4,12–4,16 (m, 1H, CH _{2a}), 7,29–7,32 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,34–7,40 (m, 8H, 8 × Ar-H), 7,77 (s, 1H, NH).	
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 24,51; 24,61; 36,38; 38,10; 52,59; 54,65; 57,73; 62,06; 65,58; 127,58; 128,59; 128,72; 138,64; 174,08; 174,36.	
MS (ESI)	Izračunano za C ₂₄ H ₂₆ N ₂ O ₆ [M+(Na)] ⁺ (m/z):	433,21
	Izmerjena vrednost:	432,84

4.4.3 Sinteza (*R*)-metil 2-((*S*)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)-3-metilbutanoata (**6**)

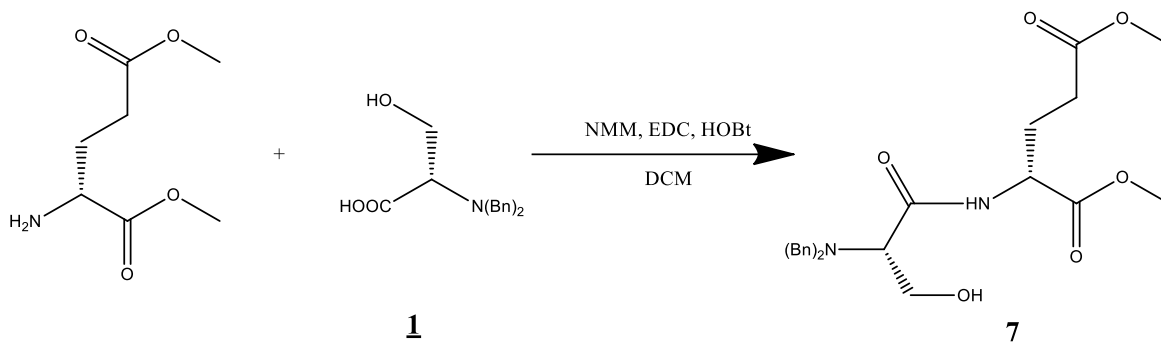


Slika 18: Reakcijska shema sinteze (*R*)-metil 2-((*S*)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)-3-metilbutanoata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za tvorbo amidne vezi s sklopitveno reakcijo. Uporabili smo zaestreno aminokislino v obliki soli s HCl. Zaestreno aminokislino smo že v začetku raztopili v DCM s spojino **1**, dodali NMM in mešali, dokler se ni vse raztopilo. Nato smo na ledeni kopeli dodali DCC in HOBT ter pustili mešati čez noč. Za čiščenje s kolonsko kromatografijo smo uporabili mobilno fazo EtOAc /Hex = 2/1.

(<i>R</i>)-metil 2-((<i>S</i>)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)-3-metilbutanoat		M = 398,50 g/mol
Videz:	Beli kristali	
T_{tal}:	79–81 °C	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 1:1) = 0,38	
Izkoristek reakcije:	46 %	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 0,72 (d, <i>J</i> = 6,8 Hz, 3H, CH ₃), 0,77 (d, <i>J</i> = 6,9 Hz, 3H, CH ₃), 2,01–2,09 (m, 1H, CH), 3,33–3,36 (t, <i>J</i> = 6,3 Hz, 1H, OH), 3,62 (s, 3H, CH ₃), 3,68 (d, <i>J</i> = 13,2 Hz, 2H, CH ₂), 3,91–3,96 (m, 1H, CH), 4,29 (d, <i>J</i> = 5,1 Hz, 1H, CH), 7,14–7,18 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,21–7,25 (m, 4H, 4 × Ar-H), 7,30–7,32 (m, 4H, 4 × Ar-H).	
¹³C-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 18,11; 19,38; 32,16; 52,65; 55,82; 58,38; 60,16; 63,90; 126,45; 129,58; 130,30; 140,64; 173,42; 174,45.	
MS (ESI)	Izračunano za C ₂₃ H ₃₀ N ₂ O ₄ [M+(Na)] ⁺ (m/z):	421,21
	Izmerjena vrednost:	420,56

4.4.4 Sinteza (*R*)-dimetil 2-((*S*)-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) pentadionata (**7**)

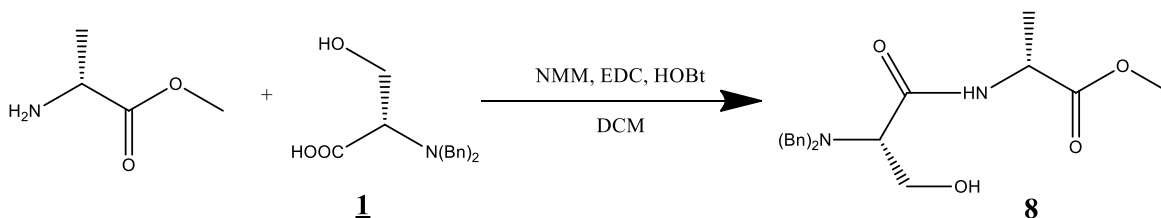


Slika 19: Reakcijska shema sinteze (*R*)-dimetil 2-((*S*)-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) pentadionata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za tvorbo amidne vezi s sklopitveno reakcijo. Zaestrena kislina je bila v obliki soli s HCl. Spojine **1** smo zatehtali 1,5 eq, HOBT 1,1 eq, namesto DCC pa smo uporabili EDC (1,3 eq).

(<i>R</i>)-dimetil 2-((<i>S</i>)-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido) pentadionat	M = 442,50 g/mol	
Videz:	Rumeno olje	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,28	
Izkoristek reakcije:	31 %	
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 27,23; 29,66; 51,15; 51,87; 52,60; 54,74; 57,68; 61,92; 127,60; 128,70; 128,89; 138,45; 171,92; 172,89; 174,09	
MS (ESI)	Izračunano za C ₂₄ H ₃₀ N ₂ O ₆ [M+(Na)] ⁺ (m/z):	465,20
	Izmerjena vrednost:	464,77

4.4.5 Sinteza (*R*)-metil 2-((*S*)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)-propanoata (**8**)

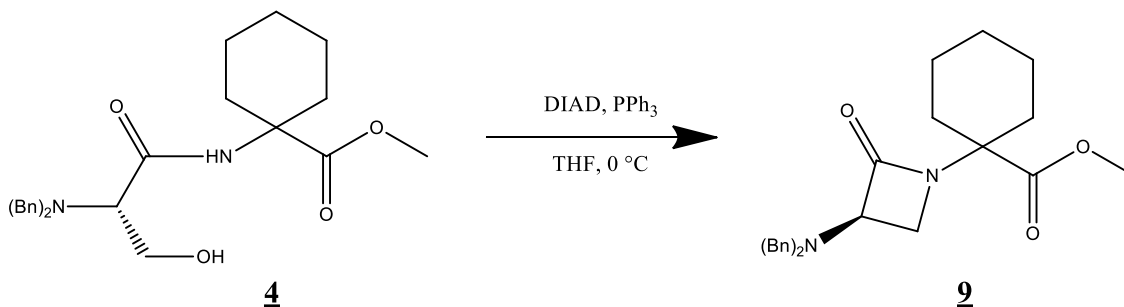


Slika 20: Reakcijska shema sinteze (*R*)-metil 2-((*S*)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)-propanoata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za tvorbo amidne vezi s sklopitveno reakcijo. Zaestrena kislina je bila v obliki soli s HCl. Zatehtali smo 1,5 eq spojine **1**, 1,1 eq HOBt, namesto DCC pa smo uporabili EDC (1,3 eq). Za čiščenje s kolonsko kromatografijo smo uporabili mobilni fazi EtOAc/Hex = 1/1 in EtOAc/Hex = 1/2.

(R)-metil 2-((S)-2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)-propanoat	M = 370,45 g/mol	
Videz:	Rumenkasto olje	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,32	
Izkoristek reakcije:	37 %	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,39 (d, J = 7,2 Hz, 3H, CH ₃), 3,32–3,37 (m, 2H, CH ₂), 3,54 (d, J = 13,4 Hz, 2H, CH ₂ -Ph), 3,73 (s, 3H, CH ₃), 3,92 (d, J = 13,4 Hz, 2H, CH ₂ -Ph), 3,99–4,01 (m, 1H, CH), 4,11–4,13 (m, 1H, CH), 4,52–4,59 (m, 1H, OH), 7,25–7,29 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,33–7,39 (m, 8H, 8 × Ar-H), 7,85 (d, J = 7,8 Hz, 1H, NH).	
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 18,32; 47,75; 52,54; 54,73; 57,68; 62,01; 127,57; 128,68; 128,84; 138,50; 173,12; 173,75.	
MS (ESI)	Izračunano za C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₄ [M+(Na)] ⁺ (m/z):	393,18
	Izmerjena vrednost:	392,87

4.5.1 Sinteza (R)-metil 1-(3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il) cikloheksankarboksilata (**9**)



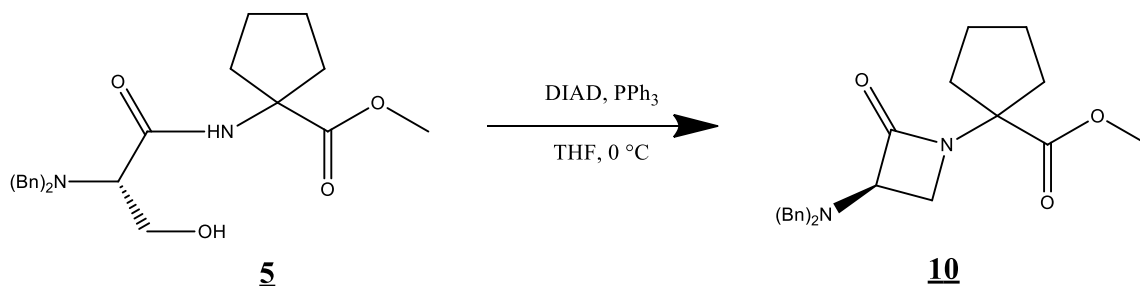
Slika 21: Reakcijska shema sinteze (R)-metil 1-(3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il) cikloheksankarboksilata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Mitsunobujevo reakcijo. Za čiščenje produkta s kolonsko kromatografijo smo uporabili mobilno fazo EtOAc/Hex = 1/4.

(R)-metil 1-(3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il) cikloheksankarboksilat	M = 406,52 g/mol	
Videz:	Beli kristali	

T_{tal}:	78–82 °C	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 1/4) = 0,36	
Izkoristek reakcije:	51 %	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,26–1,39 (m, 4H, 4 × Cy-H), 1,62–1,64 (m, 2H, 2 × Cy-H), 1,76–1,82 (m, 2H, 2 × Cy-H), 2,20–2,23 (m, 2H, 2 × Cy-H), 3,21 (t, <i>J</i> = 5,4 Hz, 1H, N-CH-CO), 3,26 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,5 Hz, 1H, N-CH _{2a} -CH), 3,69 (s, 3H, CH ₃), 3,72 (d, <i>J</i> = 13,7 Hz, 2H, CH ₂ -Ph), 3,86 (d, <i>J</i> = 13,7 Hz, 2H, CH ₂ -Ph), 4,26 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,6 Hz, 1H, N-CH _{2b} -CH), 7,26–7,27 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,31–7,34 (m, 4H, 4 × Ar-H), 7,39–7,41 (m, 4H, 4 × Ar-H).	
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 21,87; 21,91; 24,71; 31,35; 42,11; 52,56; 54,70; 63,04; 66,91; 127,23; 128,37; 129,01; 138,62; 169,91; 173,64.	
MS (ESI)	Izračunano za C ₂₅ H ₃₀ N ₂ O ₃ [M+(Na)] ⁺ (m/z):	429,22
	Izmerjena vrednost:	428,99

4.5.2 Sinteza (*R*)-metil 1-(3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)ciklopentankarboksilata (**10**)



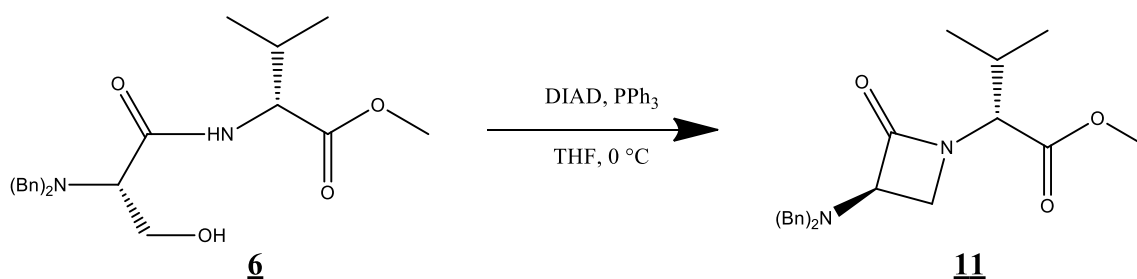
Slika 22: Reakcijska shema sinteze (*R*)-metil 1-(3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)ciklopentankarboksilata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Mitsunobujevo reakcijo. Za čiščenje produkta s kolonsko kromatografijo smo uporabili mobilno fazo EtOAc/Hex = 1/4.

(<i>R</i>)-metil 1-(3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1- il)ciklopentankarboksilat	M = 392,49 g/mol
Videz:	Rumeni kristali
T_{tal}:	60–64 °C
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 1/4) = 0,22
Izkoristek reakcije:	69 %
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,65–1,70 (m, 2H, 2 × Cyp-H), 1,76–1,87 (m, 2H, 2 × Cyp-H), 1,99–2,09 (m, 2H, 2 × Cyp-H), 2,33–2,40 (m, 2H, 2 ×

	Cyp-H), 3,19 (t, $J = 5,3$ Hz, 1H, CH ₂), 3,24 (dd, $J_1 = 5,3$ Hz, $J_2 = 2,6$ Hz, 1H, N-CH _{2a} -CH), 3,69–3,72 (m, 5H, CH ₃ + CH ₂ -Ph), 3,83–3,86 (m, 2H, CH ₂ -Ph), 4,23 (dd, $J_1 = 5,2$ Hz, $J_2 = 2,5$ Hz, 1H, N-CH _{2b} -CH), 7,23–7,27 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,30–7,34 (m, 4H, 4 × Ar-H), 7,38–7,40 (m, 4H, 4 × Ar-H).	
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 24,01; 35,29; 42,75; 52,65; 54,65; 66,81; 68,79; 127,22; 128,36; 129,01; 138,58; 169,56; 173,62.	
MS (ESI)	Izračunano za C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₃ [M+(Na)] ⁺ (m/z):	415,20
	Izmerjena vrednost:	414,82

4.5.3 Sinteza (*R*)-metil 2-((*R*)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)-3-metilbutanoata (**11**)

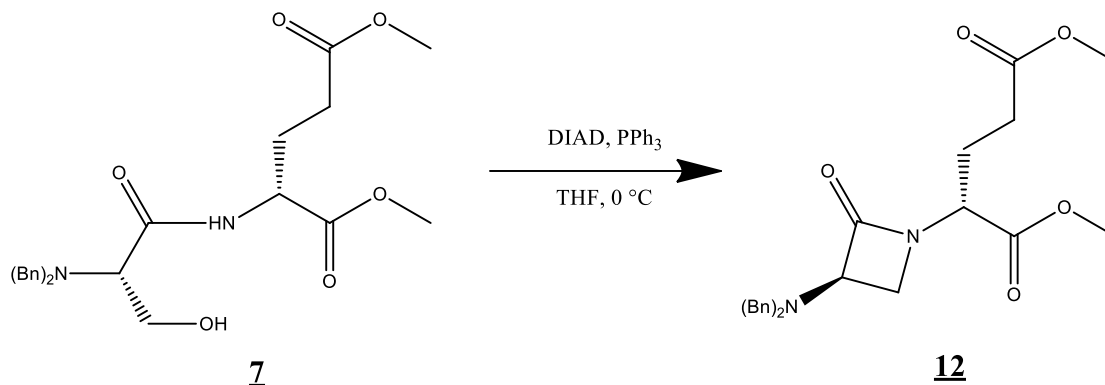


Slika 23: Reakcijska shema sinteze (*R*)-metil 2-((*R*)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)-3-metilbutanoata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Mitsunobujevo reakcijo. Za čiščenje produkta s kolonsko kromatografijo smo uporabili mobilno fazo EtOAc/Hex = 1/4.

(<i>R</i>)-metil 2-((<i>R</i>)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)-3-metilbutanoat	M = 380,48 g/mol	
Videz:	rumeno olje	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 1/4) = 0,18	
Izkoristek reakcije:	63 %	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 0,95–0,98 (m, 6H, 2 × CH ₃), 2,15–2,20 (m, 1H, CH), 3,32 (dd, $J_1 = 5,8$ Hz, $J_2 = 2,5$ Hz, 1H, N-CH _{2a} -CH), 3,55 (t, $J = 5,5$ Hz, 1H, CH), 3,67–3,71 (m, 5H, CH ₃ in CH ₂ -Ph), 3,81 (d, $J = 13,5$ Hz, 2H, CH ₂ Ph), 4,23 (d, $J = 7,9$ Hz, 1H, CH), 4,33 (dd, $J_1 = 5,2$ Hz, $J_2 = 2,5$ Hz, 1H, N-CH _{2b} -CH), 7,23–7,39 (m, 10H, 10 × Ar-H).	
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 19,35; 19,38; 29,50; 44,15; 52,03; 54,79; 59,06; 68,90; 127,34; 128,41; 129,04; 138,19; 169,61; 170,55.	
MS (ESI)	Izračunano za C ₂₃ H ₂₈ N ₂ O ₃ [M+(Na)] ⁺ (m/z):	403,20
	Izmerjena vrednost:	402,81

4.5.4 Sinteza (*R*)-dimetil 2-((*R*)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)pentandioata (12)

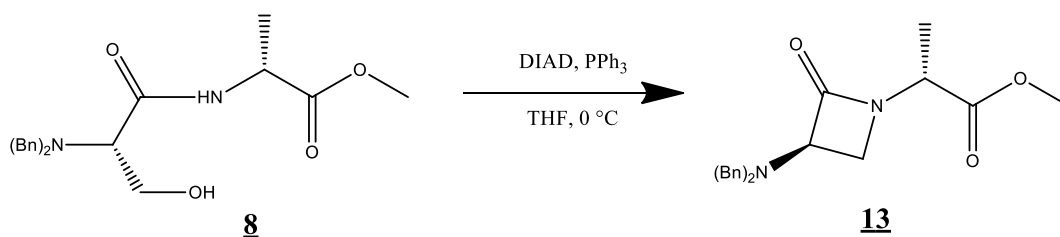


Slika 24: Reakcijska shema sinteze (*R*)-dimetil 2-((*R*)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)pentandioata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Mitsunobujevo reakcijo. Za čiščenje s kolonsko kromatografijo smo uporabili mobilno fazo EtOAc/Hex = 1/2.

(<i>R</i>)-dimetil il)pentandioat	2-((<i>R</i>)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-	M = 424,49 g/mol
Videz:	Rumeno olje	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,42	
Izkoristek reakcije:	0,84 %	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,95–2,04 (m, 1H, CH ₂), 2,21–2,30 (m, 1H, CH ₂), 2,38–2,42 (m, 2H, CH ₂), 3,25 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,5 Hz, 1H, N-CH _{2a}), 3,38 (t, <i>J</i> = 5,4 Hz, 1H, CH ₂), 3,65–3,68 (m, 4H, 1 × CH ₃ in 1 × CH _{2a} -Ph), 3,71–3,72 (m, 4H, 1 × CH ₃ in 1 × CH _{2b} -Ph), 3,77–3,82 (m, 2H, CH ₂ -Ph), 4,36 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,5 Hz, 1H, N-CH _{2b}), 4,42 (dd, <i>J</i> ₁ = 10,1 Hz, <i>J</i> ₂ = 5,2 Hz, 1H, CH), 7,24–7,28 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,31–7,39 (m, 8H, 8 × Ar-H).	
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 24,87; 30,59; 42,99; 51,92; 52,53; 53,02; 54,81; 68,65; 70,08; 127,35; 128,41; 129,02; 138,14; 169,63; 170,26; 172,57.	
MS (ESI)	Izračunano za C ₂₄ H ₂₈ N ₂ O ₅ [M+(Na)] ⁺ (m/z):	447,19
	Izmerjena vrednost:	446,72

4.5.5 Sinteza (*R*)-metil 2-((*R*)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)propanoata (**13**)

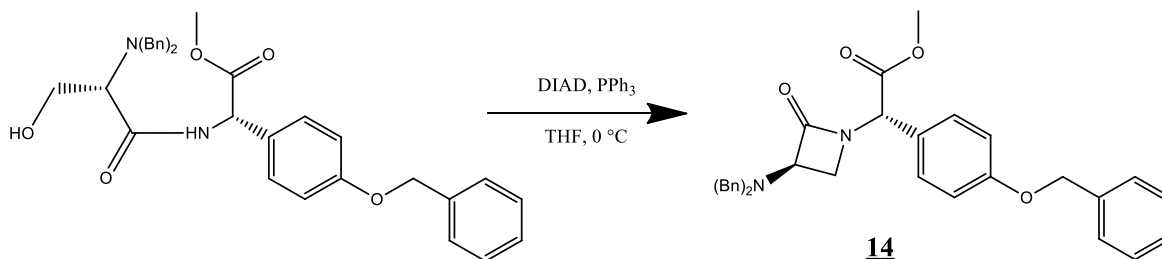


Slika 25: *Rakcijska shema sinteze (*R*)-metil 2-((*R*)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)propanoata.*

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Mitsunobujevo reakcijo. Pri reakciji smo uporabili 1,1 eq DIAD-a in 1,1 eq trifenilfosfina. Za čiščenje smo uporabili mobilni fazi EtOAc/Hex = 1/1 in EtOAc/Hex = 2/1.

(<i>R</i>)-metil 2-((<i>R</i>)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)propanoat		M = 352,43g/mol
Videz:	Rumeni kristali	
T_{tal}:	62–68 °C	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,54	
Izkoristek reakcije:	24 %	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,41 (d, <i>J</i> = 7,2 Hz, 3H, CH ₃), 3,35–3,39 (m, 2H, CH ₂), 3,56 (d, <i>J</i> = 13,2 Hz, 2H, CH ₂), 3,76 (s, 3H, CH ₃), 3,94 (d, <i>J</i> = 13,8 Hz, 2H, CH ₂), 4,21–4,26 (m, 1H, CH), 4,54–4,60 (m, 1H, CH), 7,29–7,32 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,34–7,41 (m, 8H, 8 × Ar-H).	
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 15,55; 42,51; 48,84; 52,46; 54,88; 66,32; 127,32; 128,39; 129,02; 138,24; 169,00; 171,38.	
MS (ESI)	Izračunano za C ₂₁ H ₂₄ N ₂ O ₃ [M+(Na)] ⁺ (m/z):	375,42
	Izmerjena vrednost:	374,89

4.5.6 Sinteza (*S*)-metil 2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((*R*)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)acetata (**14**)

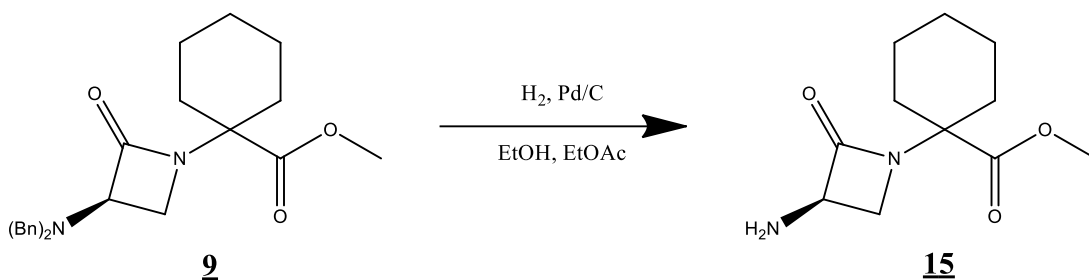


Slika 26: Reakcijska shema sinteze (*S*)-metil 2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((*R*)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)acetata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za Mitsunobujevo reakcijo. Izvedli smo jo v dveh paralelah pod enakimi pogoji. Za čiščenje s kolonsko kromatografijo smo uporabili mobilno fazo EtOAc/Hex = 1/4.

(<i>S</i>)-metil 2-(4-(benziloksi)fenil)-2-((<i>R</i>)-3-(dibenzilamino)-2-oksoazetidin-1-il)acetat		M = 520,62 g/mol
Videz:	Rumeno olje	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,4	
Izkoristek reakcije:	83 in 45 %	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 2,92 (t, J = 5,4 Hz, 0,6H, CH), 3,02 (dd, J_1 = 5,9 Hz, J_2 = 2,4 Hz, 0,4H, N-CH _{2a}), 3,46 (t, J = 5,2 Hz, 0,4H, CH), 3,51 (d, J = 13,5 Hz, 2H, CH ₂ -Ph), 3,55 (dd, J_1 = 5,7 Hz, J_2 = 2,3 Hz, 0,6H, N-CH _{2a}), 3,63–3,69 (m, 2H, CH ₂ -Ph), 3,71–3,72 (m, 3H, CH ₃), 3,77–3,80 (m, 2H, CH ₂ -Ph), 4,19 (dd, J_1 = 5,1 Hz, J_2 = 2,4 Hz, 0,6H, N-CH _{2b}), 4,31 (dd, J_1 = 5,0 Hz, J_2 = 2,4 Hz, 0,4H, N-CH _{2b}), 5,53 (s 0,6H, CH), 5,54 (s, 0,4H, CH), 6,99–7,02 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,17–7,43 (m, 17H, 17 × Ar-H).	
¹³C-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 43,85; 44,19; 53,17; 55,49; 55,66; 58,38; 58,53; 61,57; 69,15; 69,23; 71,05; 116,51; 116,53; 126,56; 127,03; 128,42; 128,44; 128,62; 129,01; 129,44; 129,59; 130,15; 130,18; 130,79; 138,43; 139,44; 139,65; 160,63; 171,13; 171,49.	
MS (ESI)	Izračunano za C ₃₃ H ₃₂ N ₂ O ₄ [M+(Na)] ⁺ (m/z):	543,23
	Izmerjena vrednost:	542,70

4.6.1 Sinteza (*R*)-metil 1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)cikloheksankarboksilata (**15**)

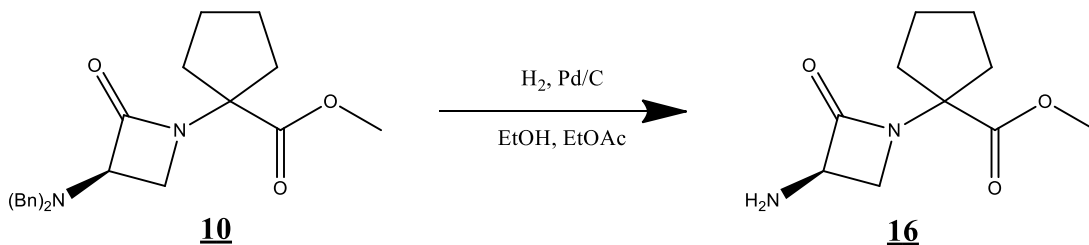


Slika 27: Reakcijska shema sinteze (*R*)-metil 1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)cikloheksankarboksilata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito aminske skupine. Za čiščenje produkta s kolonsko kromatografijo smo uporabili mobilno fazo DCM/MeOH = 20/1.

(<i>R</i>)-metil 1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)cikloheksankarboksilat		M = 226,27 g/mol
Videz:	prozorno olje	
TLC:	R _f (DCM/MeOH = 20/1) = 0,18	
Izkoristek reakcije:	64 %	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 1,30–1,52 (m, 3H, 3 × Cy-H), 1,64–1,67 (m, 3H, 3 × Cy-H), 1,78–1,88 (m, 2H, 2 × Cy-H), 2,07–2,11 (m, 1H, 1 × Cy-H), 2,29–2,32 (m, 1H, 1 × Cy-H), 3,04 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,5 Hz, 1H, N-CH _{2a} -CH), 3,56 (t, <i>J</i> = 5,5 Hz, 1H, NH ₂ -CH-CO), 3,74 (s, 3H, CH ₃), 4,12 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,5 Hz, 1H, N-CH _{2b} -CH).	
¹³C-NMR (100 MHz, aceton-d₆)	δ (ppm) = 21,71; 21,85; 24,71; 31,32; 31,37; 48,42; 52,67; 58,14; 63,14; 171,89; 173,57.	
MS (ESI-HRMS)	Izračunano za C ₁₁ H ₁₈ N ₂ O ₃ [M+(H)] ⁺ (m/z):	227,1396
	Izmerjena vrednost:	227,1399

4.6.2 Sinteza (*R*)-metil 1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)ciklopentankarboksilata (**16**)

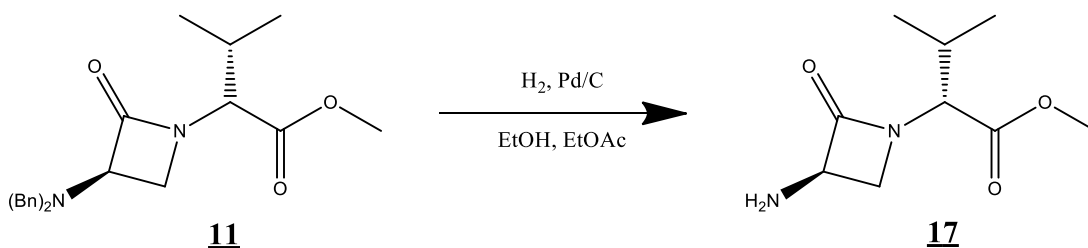


Slika 28: Reakcijska shema sinteze (*R*)-metil 1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)ciklopentankarboksilata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito aminske skupine. Za čiščenje produkta s kolonsko kromatografijo smo uporabili mobilno fazo DCM/MeOH = 20/1.

(R)-metil 1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)ciklopentankarboksilat		M = 212,25 g/mol
Videz:	Rumeno olje	
TLC:	R _f (DCM/MeOH = 20/1) = 0,15	
Izkoristek reakcije:	62 %	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 1,76–1,90 (m, 4H, 4 × Cyp-H), 2,05–2,13 (m, 2H, 2 × Cyp-H), 2,28–2,42 (m, 2H, 2 × Cyp-H), 3,11 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 1H, N-CH _{2a} -CH), 3,61 (t, <i>J</i> = 5,3 Hz, 1H, CH ₂), 3,76 (s, 3H, CH ₃), 4,06 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,3 Hz, 1H, N-CH _{2b} -CH).	
¹³C-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 24,96; 25,00; 36,20; 36,28; 49,96; 53,24; 58,24; 70,16; 172,83; 174,84.	
MS (ESI-HRMS)	Izračunano za C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ [M+(H)] ⁺ (m/z):	213,1239
	Izmerjena vrednost:	213,1235

4.6.3 Sinteza (R)-metil 2-((R)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-3-metilbutanoata (**17**)



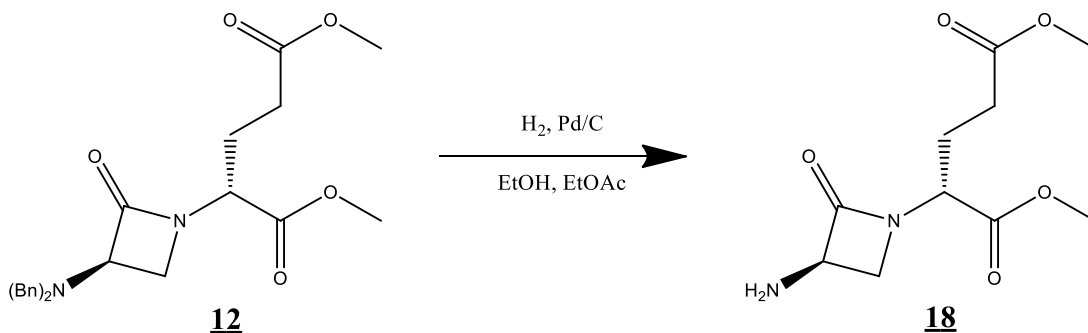
Slika 29: Rakcijska shema sinteze (R)-metil 2-((R)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-3-metilbutanoata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito aminske skupine. Za čiščenje produkta s kolonsko kromatografijo smo uporabili mobilno fazo DCM/MeOH = 20/1.

(R)-metil 2-((R)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-3-metilbutanoat		M = 200,23 g/mol
Videz:	Rumeno olje	
TLC:	R _f (DCM/MeOH = 20/1) = 0,18	
Izkoristek reakcije:	25 %	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 1,00–1,05 (m, 6H, 2 × CH ₃), 2,19–2,28 (m, 1H, CH), 3,22 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,6 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 1H, N-CH _{2a} -CH), 3,76 (s, 3H, CH ₃), 3,85 (t, <i>J</i> = 5,5 Hz, 1H, CH), 4,15 (d, <i>J</i> = 7,9 Hz, 1H, CH), 4,19 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 1H, N-CH _{2b} -CH).	
¹³C-NMR	δ (ppm) = 19,51; 30,66; 51,29; 52,65; 60,08; 60,96; 171,61;	

(400 MHz, MeOD)	172,86.	
MS (ESI-HRMS)	Izračunano za C ₉ H ₁₆ N ₂ O ₃ [M+(H)] ⁺ (m/z):	201,1239
	Izmerjena vrednost:	201,1235

4.6.4 Sinteza (*R*)-dimetil 2-((*R*)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)pentandioata (**18**)

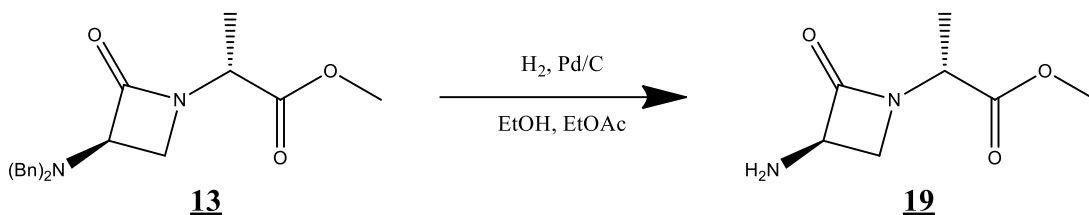


Slika 30: Reakcijska shema sinteze (*R*)-dimetil 2-((*R*)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)pentandioata.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito aminske skupine. Za čiščenje produkta s kolonsko kromatografijo smo uporabili mobilno fazo DCM/MeOH = 20/1.

(<i>R</i>)-dimetil 2-((<i>R</i>)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)pentandioat	M = 244,24 g/mol	
Videz:	Rumeno olje	
TLC:	R _f (DCM/MeOH = 20/1) = 0,16	
Izkoristek reakcije:	28 %	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 2,02–2,11 (m, 1H, CH ₂), 2,21–2,29 (m, 1H, CH ₂), 2,50–2,55 (m, 2H, CH ₂), 3,16–3,18 (m, 1H, N-CH _{2a}), 3,70–3,71 (m, 4H, 1 × CH ₃ in 1 × CH ₂), 3,77 (m, 3H, CH ₃), 4,20 (dd, J ₁ = 5,3 Hz, J ₂ = 2,3 Hz, 1H, N-CH _{2b}), 4,46 (dd, J ₁ = 10,2 Hz, J ₂ = 4,9 Hz, 1H, CH).	
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 25,75; 31,16; 52,29; 53,08; 54,58; 59,76; 171,61; 172,67; 174,64.	
MS (ESI-HRMS)	Izračunano za C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₅ [M+(H)] ⁺ (m/z):	245,1137
	Izmerjena vrednost:	245,1132

4.6.5 Sinteza (*R*)-metil 2-((*R*)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)propanoata (**19**)

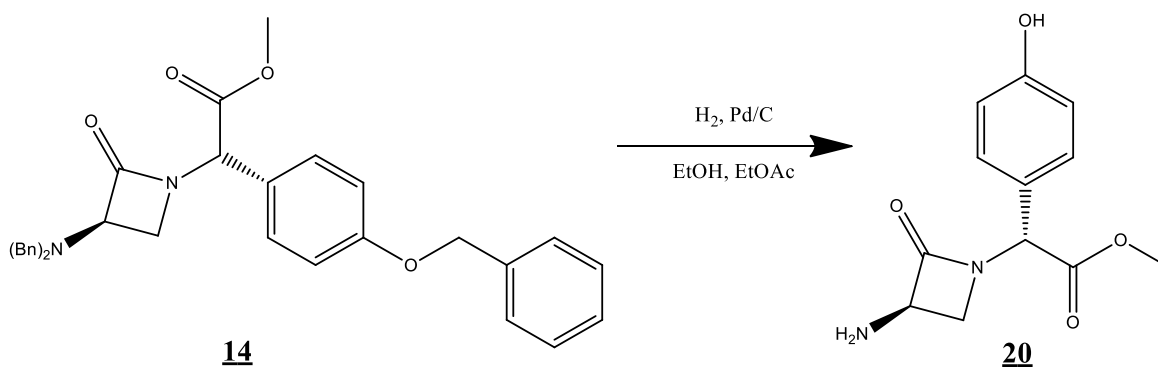


Slika 31: *Rakcijska shema sinteze (R)-metil 2-((R)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)propanoata.*

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito aminske skupine. Za čiščenje produkta s kolonsko kromatografijo smo uporabili mobilno fazo DCM/MeOH = 20/1.

(<i>R</i>)-metil 2-((<i>R</i>)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)propanoat		M = 172,18 g/mol
Videz:	rumenkasto olje	
TLC:	R _f (DCM/MeOH = 20/1) = 0,11	
Izkoristek reakcije:	39 %	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 1,45–1,50 (m, 3H, CH ₃), 3,18–3,20 (m, 1H, CH ₂), 3,68–3,71 (m, 1H, CH ₂), 3,76–3,77 (m, 3H, CH ₃), 4,19–4,21 (m, 1H, CH), 4,47–4,52 (m, 1H, CH).	
MS (ESI-HRMS)	Izračunano za C ₇ H ₁₂ N ₂ O ₃ [M+(H)] ⁺ (m/z):	173,0926
	Izmerjena vrednost:	173,0924

4.6.6 Sinteza (*R*)-metil 2-((*R*)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)acetata (**20**)

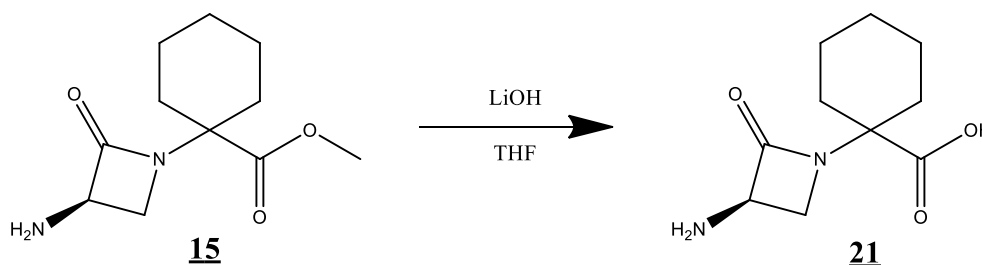


Slika 32: *Reakcijska shema sinteze (R)-metil 2-((R)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)acetata.*

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito aminske skupine. Za čiščenje produkta s kolonsko kromatografijo smo uporabili mobilno fazo DCM/MeOH z gradientom od 20/1 do 10/1.

(R)-metil hidroksifenil)acetat	2-((R)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-	M = 250,25 g/mol
Videz:	Belo-rumeni kristali	
T_{tal}:	50–56 °C	
TLC:	R _f (DCM/MeOH = 20/1) = 0,05	
Izkoristek reakcije:	29 %	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 2,85–2,88 (m, 0,5H, N-CH _{2a}), 3,37–3,39 (m, 1H, N-CH _{2a} +CH), 3,75–3,77 (m, 3H, CH ₃), 3,82 (t, <i>J</i> = 5,3 Hz, 0,5H, CH), 4,06 (dd, <i>J</i> ₁ = 4,9 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,5 Hz, 0,5H, N-CH _{2a}), 4,18 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,3 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 0,5H, N-CH _{2a}), 5,48 (s, 1H, CH), 6,81–6,84 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,13–7,17 (m, 2H, 2 × Ar-H).	
¹³C-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 50,33; 53,11; 58,50; 59,60; 116,84; 125,23; 130,64; 130,84; 159,33; 171,73; 172,02.	
MS (ESI-HRMS)	Izračunano za C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₄ [M+(H)] ⁺ (m/z):	251,1032
	Izmerjena vrednost:	251,1038

4.7.1 Sinteza (R)-1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)cikloheksankarboksilne kisline (**21**)



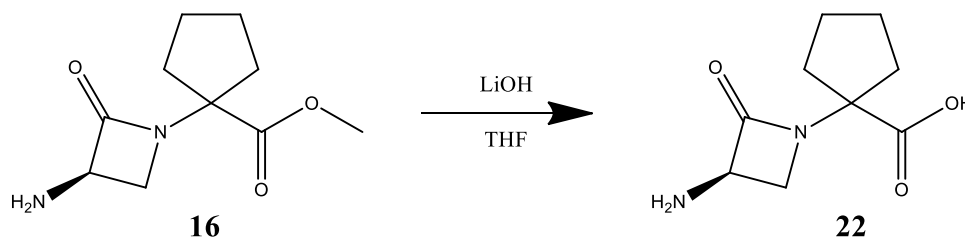
Slika 33: Reakcijska shema sinteze (R)-1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)cikloheksankarboksilne kisline.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito karboksilne skupine. Pustili smo jo poteči čez noč in naslednji dan preverili potek hidrolize s TLC. Produkt smo po reverznofazni kromatografiji očistili še s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/MeOH/H₂O = 4/2/1).

(R)-1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)cikloheksankarboksilna kislina	M = 212,25 g/mol
Videz:	Beli kristali

T_{tal}:	187–192 °C	
TLC:	R _f (EtOAc/MeOH/H ₂ O = 4/2/1) = 0,30	
Izkoristek reakcije:	52 %	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 1,22–1,41 (m, 3H, 3 × Cy-H), 1,51–1,55 (m, 3H, 3 × Cy-H), 1,74–1,81 (m, 2H, 2 × Cy-H), 1,94–1,98 (m, 1H, 1 × Cy-H), 2,12–2,16 (m, 1H, 1 × Cy-H), 3,01 (dd, J ₁ = 5,4 Hz, J ₂ = 2,2 Hz, N-CH _{2a} -CH), 3,48 (t, J = 5,3 Hz, 1H, NH ₂ -CH-CO), 3,94 (bs, 1H, N-CH _{2b} -CH).	
¹³C-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 21,37; 21,53; 23,58; 26,32; 26,54; 32,53; 32,75; 32,86; 34,65; 42,28; 59,07; 176,70; 177,58; 179,68.	
MS (ESI-HRMS)	Izračunano za C ₁₀ H ₁₆ N ₂ O ₃ [M+(H)] ⁺ (m/z):	213,1239
	Izmerjena vrednost:	213,1242

4.7.2 Sinteza (*R*)-1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)ciklopentankarboksilne kisline (**22**)



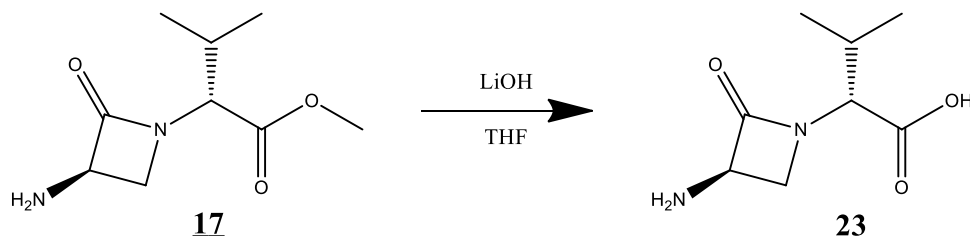
Slika 34: *Rakcijska shema sinteze (R)-1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)ciklopentankarboksilne kisline.*

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito karboksilne skupine. Pustili smo jo poteči čez noč in naslednji dan preverili potek hidrolize s TLC. Produkt smo po reverznofazni kromatografiji očistili še s kolonsko kromatografijo (MF: EtOH → EtOH/H₂O = 9/1).

(R)-1-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)ciklopentankarboksilna kislina		M = 198,22 g/mol
Videz:	Beli kristali	
T_{tal}:	197–201 °C	
TLC:	R _f (EtOAc/MeOH/H ₂ O = 4/2/1) = 0,2	
Izkoristek reakcije:	33 %	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 1,33–1,53 (m, 3H, 3 × Cy-H), 1,61–1,65 (m, 3H, 3 × Cy-H), 1,83–1,92 (m, 2H, 2 × Cy-H), 2,05–2,09 (m, 1H, 1 × Cy-H), 2,23–2,26 (m, 1H, 1 × Cy-H), 3,10–3,11 (m, 1H, CH ₂), 3,58 (t, J = 5,1 Hz, 1H, CH ₂), 4,03 (s, 1H, CH).	

¹³C-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 25,18; 25,21; 26,54; 26,78; 36,24; 39,80; 39,90; 43,64; 57,74; 58,65; 67,26; 73,13; 172,35; 176,69; 177,82; 179,72.	
MS (ESI-HRMS)	Izračunano za C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₃ [M+(H)] ⁺ (m/z):	197,0926
	Izmerjena vrednost:	197,0929

4.7.3 Sinteza (*R*)-2-((*R*)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-3-metilbutanojske kisline (**23**)

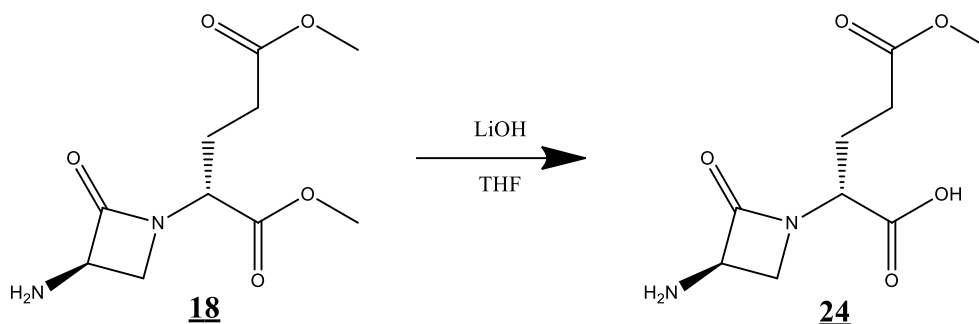


Slika 35: Reakcijska shema sinteze (*R*)-2-((*R*)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-3-metilbutanojske kisline.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito karboksilne skupine.

(<i>R</i>)-2-((<i>R</i>)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-3-metilbutanojska kislina	M = 186,21 g/mol	
Videz:	Beli kristali	
T_{tal}:	Spojina razpade	
TLC:	R _f (EtOAc/MeOH/H ₂ O = 4/2/1) = 0,17	
Izkoristek reakcije:	>100 % (prisotne soli)	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 1,01–1,04 (m, 6H, 2 × CH ₃), 2,17–2,27 (m, 1H, CH), 3,16 (dd, J ₁ = 5,8 Hz, J ₂ = 2,3 Hz, 1H, N-CH _{2a} -CH), 3,89–3,97 (m, 2H, 2 × CH), 4,12 (dd, J ₁ = 5,8 Hz, J ₂ = 2,3 Hz, 1H, N-CH _{2b} -CH).	
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 19,81; 20,23; 30,58; 51,49; 59,42; 64,79; 172,89; 176,79.	
MS (ESI-HRMS)	Izračunano za C ₈ H ₁₄ N ₂ O ₃ [M+(H)] ⁺ (m/z):	185,0926
	Izmerjena vrednost:	185,0929

4.7.4 Sinteza (*R*)-2-((*R*)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-5-metoksi-5-oksopentanojske kisline (**24**)

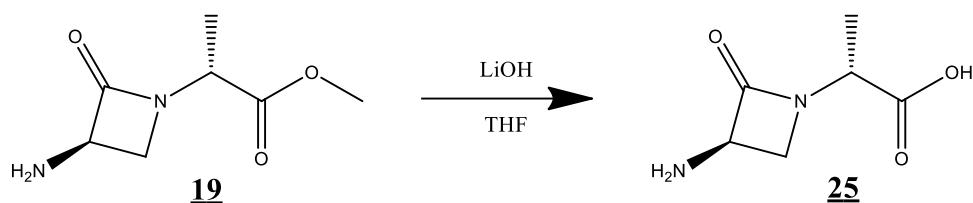


Slika 36: Reakcijska shema sinteze (*R*)-2-((*R*)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-5-metoksi-5-oksopentanojske kisline.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito karboksilne skupine. Produkt smo po reverznofazni kromatografiji očistili še s kolonsko kromatografijo (MF: DKM/MeOH/H₂O = 4/2/1).

(<i>R</i>)-2-((<i>R</i>)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-5-metoksi-5-oksopentanojska kislina		M = 216,19 g/mol
Videz:	Prozorno olje	
TLC:	R _f (DKM/MeOH/H ₂ O = 4/2/1) = 0,22	
Izkoristek reakcije:	25 %	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 1,90–2,00 (m, 1H, CH ₂), 2,10–2,20 (m, 1H, CH ₂), 2,34–2,41 (m, 2H, CH ₂), 3,00–3,01 (m, 1H, N-CH _{2a}), 3,57–3,58 (m, 3H, CH ₃), 3,64–3,66 (m, 1H, CH ₂), 3,97–4,00 (m, 1H, CH), 4,15–4,21 (m, 1H, CH).	
¹³C-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 23,29; 26,84; 32,29; 41,71; 52,15; 58,76; 172,81; 175,29; 176,52.	
MS (ESI-HRMS)	Izračunano za C ₉ H ₁₄ N ₂ O ₅ [M+(H)] ⁺ (m/z):	229,0824
	Izmerjena vrednost:	229,0819

4.7.5 Sinteza (*R*)-2-((*R*)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)propanojske kisline (**25**)

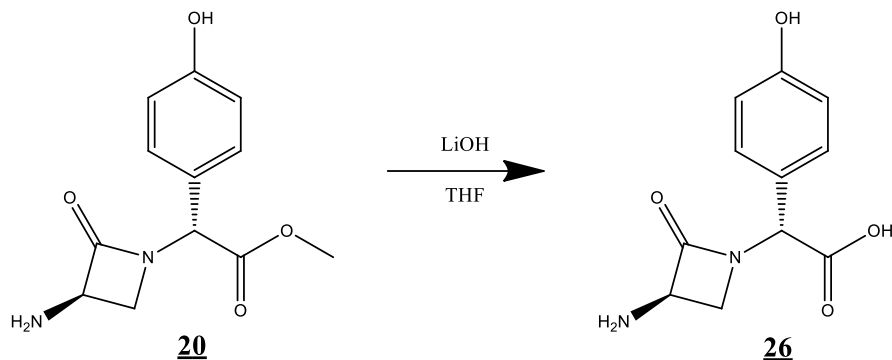


Slika 37: Reakcijska shema sinteze (*R*)-2-((*R*)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)propanojske kisline.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito karboksilne skupine. Produkt smo po reverznofazni kromatografiji očistili še s kolonsko kromatografijo (MF: DKM/MeOH/H₂O = 4/2/1).

(<i>R</i>)-2-((<i>R</i>)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)propanojska kislina		M = 158,16 g/mol
Videz:	Beli kristali	
T_{tal}:	158–165 °C	
TLC:	R _f (EtOAc/MeOH/H ₂ O = 4/2/1) = 0,14	
Izkoristek reakcije:	27 %	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 1,38–1,39 (m, 3H, CH ₃), 3,13–3,16 (m, 1H, CH ₂), 3,14–3,45 (m, 1H, CH ₂), 3,74 (t, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H, CH ₂), 3,90 (t, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1H, CH ₂), 4,14–4,19 (m, 1H, CH).	
¹³C-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 16,45; 16,59; 17,72; 44,17; 45,02; 47,14; 53,69; 53,97; 54,03; 54,95; 56,01; 57,07; 58,30; 58,77; 169,14; 173,76; 174,74; 175,34; 177,27; 178,04; 178,18.	
MS (ESI)	Izračunano za C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₃ [M+(H)] ⁺ (m/z):	157,06
	Izmerjena vrednost za C ₆ H ₁₀ N ₂ O ₃ [M+(H)] ⁺ :	157,04

4.7.6 Sinteza (*R*)-2-((*R*)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)ocetne kisline (26**)**



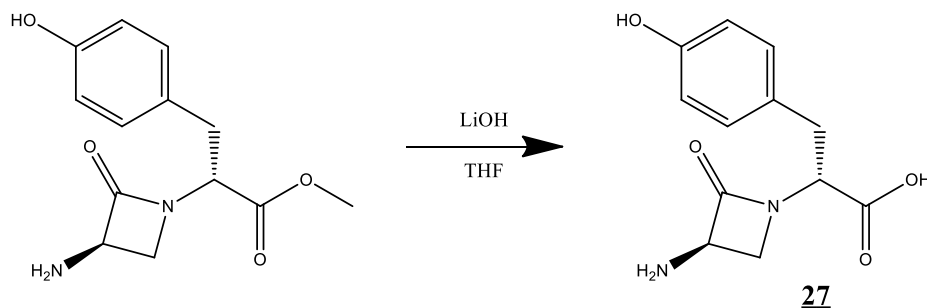
Slika 38: Reakcijska shema sinteze (*R*)-2-((*R*)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)ocetne kisline.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito karboksilne skupine.

(<i>R</i>)-2-((<i>R</i>)-3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-2-(4-hidroksifenil)ocetna kislina		M = 236,23 g/mol
Videz:	Oranžni kristali	
T_{tal}:	Spojina razpade	
TLC:	R _f (EtOAc/MeOH/H ₂ O = 4/2/1) = 0,27	
Izkoristek reakcije:	57 %	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 3,23 (t, <i>J</i> = 5,4 Hz, 1H, CH ₂), 3,35 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,3 Hz, 1H, N-CH _{2a}), 3,92 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,1 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,4 Hz, 1H, N-CH _{2b}), 5,25 (s, 1H, CH), 6,71–6,74 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,12–7,14 (m, 2H, 2 × Ar-H).	
¹³C-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 49,81; 59,08; 61,47; 117,33; 126,61; 130,94, 161,07; 171,78; 176,87.	
MS (ESI-HRMS)	Izračunano za C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₄ [M+(H)] ⁺ (m/z):	235,0719
	Izmerjena vrednost:	235,0722

4.7.7 Sinteza 2-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-3-(4-hidroksifenil)propanojske kisline

(27)

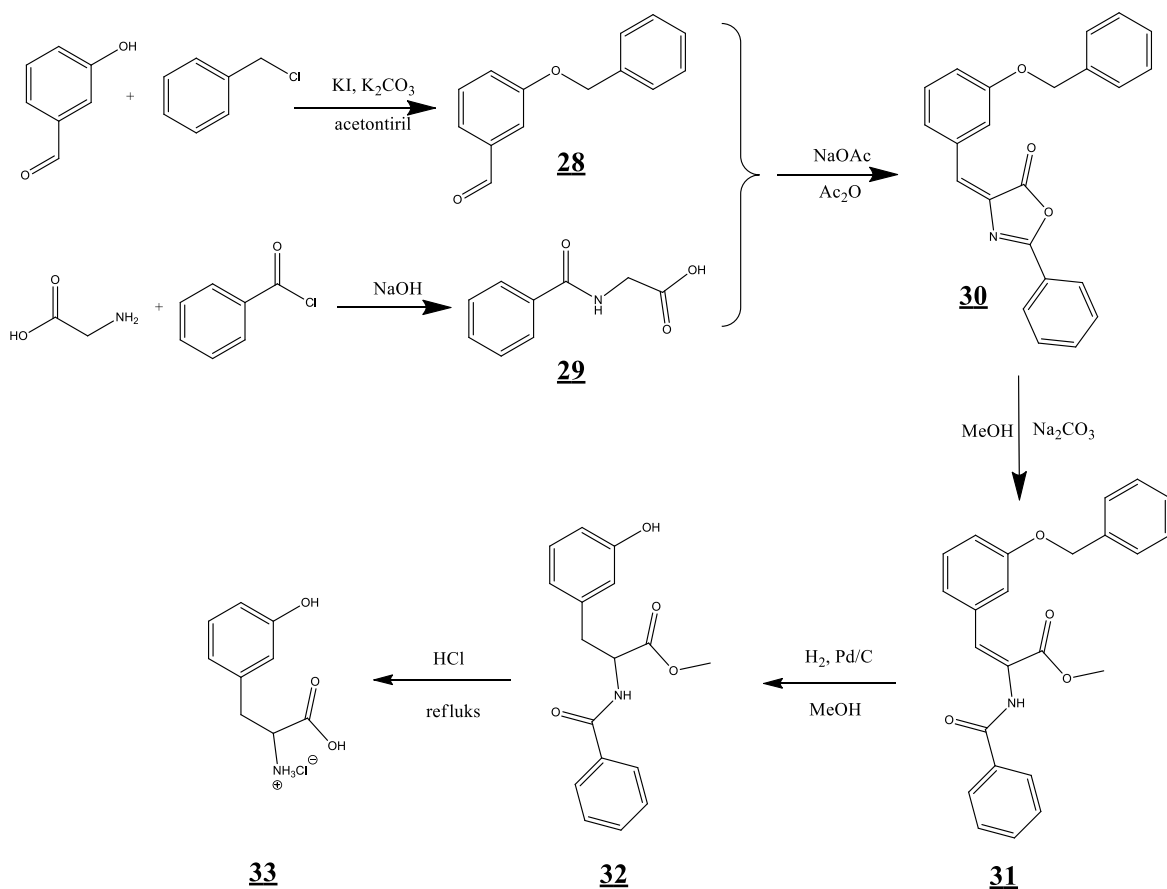


Slika 39: Reakcijska shema sinteze 2-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-3-(4-hidroksifenil)propanojske kisline.

Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za odščito karboksilne skupine. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/MeOH/H₂O = 4/2/1).

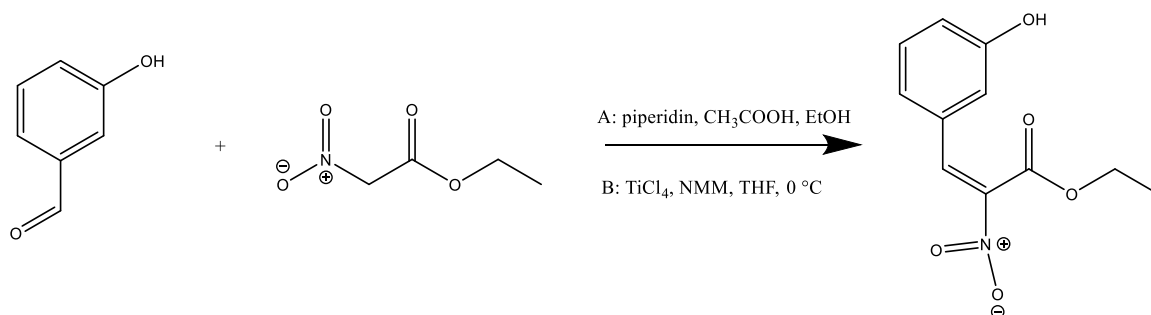
2-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)-3-(4-hidroksifenil)propanojska kislina		M = 250,25 g/mol
Videz:	Beli kristali	
T_{tal}:	Spojina razpade	
TLC:	R _f (EtOAc/MeOH/H ₂ O = 4/2/1) = 0,23	
Izkoristek reakcije:	64 %	
¹H-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 2,92–3,00 (m, 2H, CH ₂), 3,23 (dd, <i>J</i> ₁ = 14,4 Hz, <i>J</i> ₂ = 4,6 Hz, 1H, CH ₂), 3,67 (t, <i>J</i> = 5,4 Hz, 1H, CH ₂), 3,99 (dd, <i>J</i> ₁ = 5,2 Hz, <i>J</i> ₂ = 2,3 Hz, 1H, CH), 4,34 (dd, <i>J</i> ₁ = 10,8 Hz, <i>J</i> ₂ = 4,7 Hz, 1H, CH), 6,73 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 2H, 2 × Ar-H), 7,14 (d, <i>J</i> = 8,3 Hz, 2H, 2 × Ar-H).	
¹³C-NMR (400 MHz, MeOD)	δ (ppm) = 36,81; 50,53; 59,20; 60,11; 116,33; 130,49; 130,99; 157,39; 172,68; 176,90.	
MS (ESI-HRMS)	Izračunano za C ₁₂ H ₁₄ N ₂ O ₄ [M+(H)] ⁺ (m/z):	249,0875
	Izmerjena vrednost:	249,0871

4.8 Sinteza 2-amino-3-(3-hidroksifenil)propanojske kisline



Slika 40: Reakcijska shema sinteze 2-amino-3-(3-hidroksifenil)propanojske kisline.

4.8.1 Sinteza (E)-etil-3-(3-hidroksifenil)-2-nitroakrilata



Slika 41: Reakcijska shema sinteze (E)-etil-3-(3-hidroksifenil)-2-nitroakrilata.

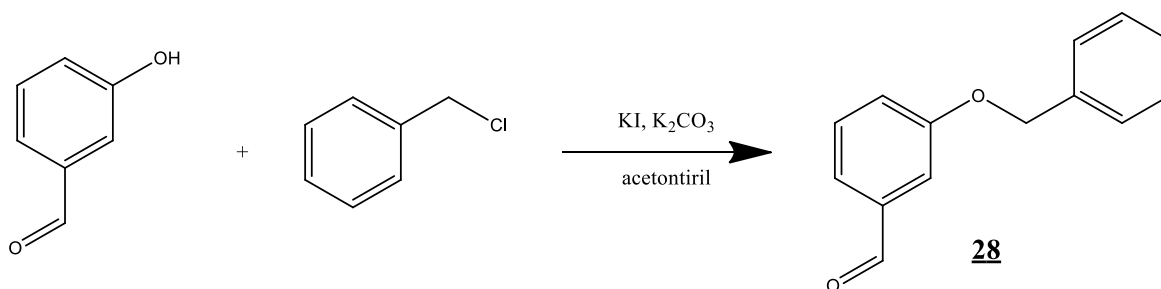
A: Natehtali smo 3-hidroksibenzaldehid (2 g, 16,4 mmol, 2 eq) in etil nitroacetat (0,909 ml, 8,2 mmol, 1 eq), dodali piperidin (0,162 ml, 1,6 mmol, 0,2 eq) in očetno kislino (0,094 ml, 1,6 mmol, 0,2 eq) ter vse skupaj raztopili v etanolu (50 ml). Reakcijsko zmes smo čez noč segrevali na refluxu, nato pa reakcijski zmesi uparili etanol in zaostanek

raztopili v etil acetatu. Organsko fazo smo sprali z vodnimi raztopinami HCl (1 mol/l), NaHCO₃ in nasičeno raztopino NaCl. Topilo smo uparili in produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF: etilacetat/heksan = 1/3).

B: Natehtali smo 3-hidroksibenzaldehid (2 g, 16,4 mmol, 1,2 eq) in etilnitroacetat (1,515 ml, 13,6 mmol, 1 eq), bučko prepihali z argonom, z iglo dodali brezvodni tetrahidrofuran 30 ml) in pustili mešati na ledeni kopeli. Dodali smo titanov tetraklorid (4 ml, 36,5 mmol, 2,7 eq) in pustili mešati na ledeni kopeli 2 uri. Nato smo počasi v razmaku dveh ur dodali še *N*-metil morfolin (5,981 ml, 54,4 mmol, 4,0 eq) in pustili mešati čez noč na sobni temperaturi. Naslednji dan smo odparili topilo, zaostanek suspendirali v etil acetat in organsko fazo sprali z vodnimi raztopinami HCl (1 mol/l), natrijevega hidrogenkarbonata in z nasičeno raztopino natrijevega klorida ter organsko fazo sušili z natrijevim sulfatom. Zmes smo filtrirali in odparili topilo.

Etil (E)-3-(3-hidroksifenil)-2-nitroakrilat		M = 237,21 g/mol
Videz:	Rjavo olje	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 1/4) = 0,32	
Izkoristek reakcije:	A: 0 %; B: 5 %	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,37–1,41 (m, 3H, CH ₃), 4,41 (q, <i>J</i> = 7,1 Hz), 6,89–6,90 (m, 1H, 1 × Ar-H), 6,98–7,03 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,28–7,34 (m, 1H, 1 × Ar-H), 7,51 (s, 1H, CH).	
MS (ESI)	Izračunano za C ₁₁ H ₁₁ NO ₅ [M+(Na)] ⁺ (m/z):	260,05
	Izmerjena vrednost:	259,77

4.8.2 Sinteza 3-(benziloksi)benzaldehyda (**28**)



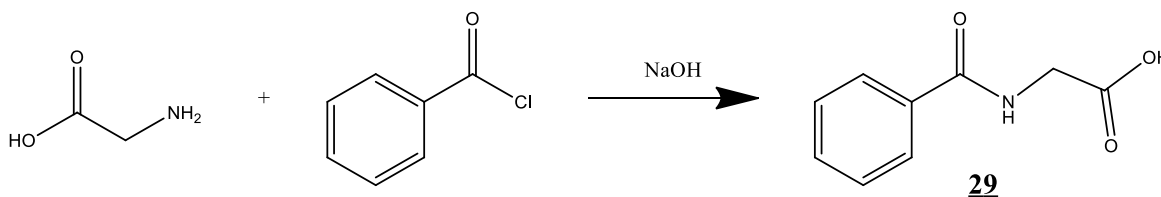
Slika 42: Reakcijska shema sinteze 3-(benziloksi)benzaldehyda.

V bučko smo zatehtali 3-hidroksibenzaldehid (10g, 81,9 mmol, 1 eq), kalijev karbonat (16,976g, 122,3 mmol, 1,5 eq) in kalijev jodid (1,359 g, 8,2 mmol, 0,1 eq) ter vse skupaj suspendirali v acetonitrilu. Med mešanjem smo počasi dodali benzilchlorid in na refluxu

pustili mešati čez noč. Reakcijski zmesi smo uparili toilo in zaostanek suspendirali v etil acetatu. Organsko fazo smo sprali z vodnimi raztopinami HCl (1 mol/l), natrijevega hidrogenkarbonata in z nasičeno raztopino natrijevega klorida, sušili z natrijevim sulfatom in odparili topilo.

3-(benziloksi)benzaldehyd		M = 212,25 g/mol
Videz:	Rumeni kristali	
T_{tal}:	47–50 °C	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,75	
Izkoristek reakcije:	99 %	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 5,20 (s, 2H, CH ₂), 7,32–7,43 (m, 4H, 4 × Ar-H), 7,47–7,49 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,52–7,54 (m, 3H, 3 × Ar-H), 9,99 (s, 1H, CHO).	

4.8.3 Sinteza benzoilglicina (**29**)

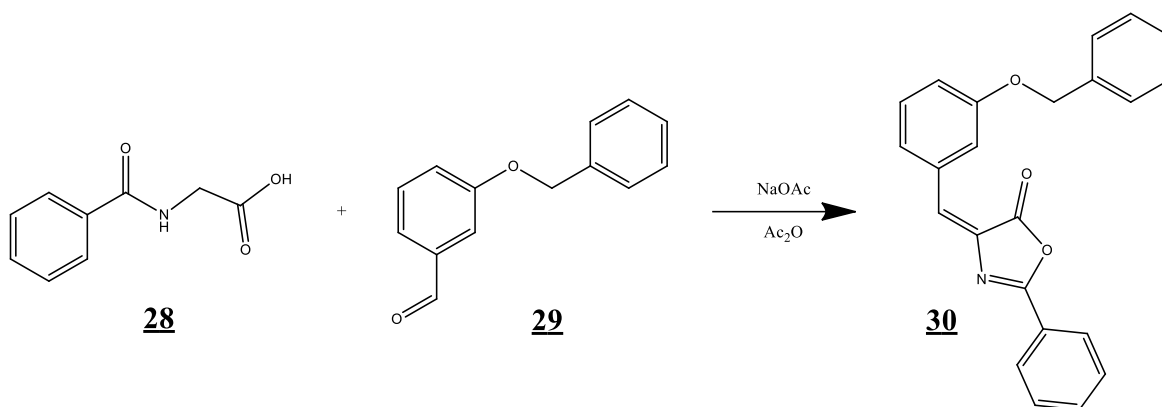


Slika 43: Reakcijska shema sinteze benzoilglicina.

V bučko smo netehtali glicin (5 g, 66,6 mmol, 1 eq) in ga raztopili v natrijevem hidroksidu (10 %, 50 ml). Nato smo v petih delih dodali benzoil klorid (10 ml, 86 mmol, 1,3 eq) in mešali pri sobni temperaturi še nadaljnjih 30 minut. Raztopino smo prenesli v čašo s 50 g zdrobljenega ledu in po kapljicah dodali koncentrirano HCl (37 %) do pH 2–3. Zmes smo odnučali in sprali z vodo. Produkt smo prekrystalizirali iz vrele vode ter ga posušili v sušilniku.

Benzoilglicin (hipurna kislina)		M = 179,18 g/mol
Izgled:	Beli kristali	
T_{tal}:	187–191 °C	
Izkoristek reakcije:	80 %	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 3,94 (d, <i>J</i> = 6,0 Hz, 2H, CH ₂), 7,47–7,51 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,53–7,57 (m, 1H, 1 × Ar-H), 7,87–7,90 (m, 2H, 2 × Ar-H), 8,86 (t, <i>J</i> = 6,0 Hz, 1H, NH), 12,63 (s, 1H, COOH).	

4.8.4 Sinteza (E)-4-(3-(benziloksi)benziliden)-2-feniloksazol-5(4H)-ona (**30**)

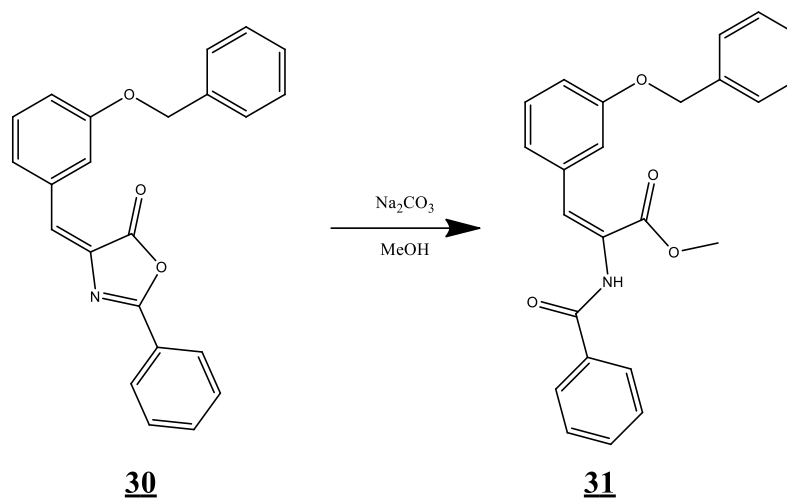


Slika 44: Reakcijska shema sinteze (E)-4-(3-(benziloksi)benziliden)-2-feniloksazol-5(4H)-ona.

V bučko smo natehtali 3-(benziloksi)benzalhid (**29**) (5,936g, 28,0 mmol, 1 eq), hipurno kislino (**28**) (5,500 g, 30,7 mmol, 1,1 eq) in natrijev acetat (2,374 g, 28,9 mmol, 1 eq). Dodali smo acetanhidrid (13 ml, 137,5 mmol, 4,9 eq), zmes utekočinili s pištolo na vroč zrak in segrevali na oljni kopeli pri 100 °C 2 uri. Reakcijsko zmes smo ohladili na sobno temperaturo, dodali na ledu ohlajen etanol (50 ml) in zlili v 15 ml ledene vode. Reakcijsko zmes smo pustili nekaj časa na sobni temperaturi, filtrirali in dali sušit v sušilnik. Surovi produkt smo uporabili na naslednji stopnji.

(E)-4-(3-(benziloksi)benziliden)-2-feniloksazol-5(4H)-on		M = 355,39 g/mol
Videz:	Rumeno olje	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,64	
Izkoristek reakcije:	92 %	
¹H-NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 5,22 (s, 2H, CH ₂), 7,17–7,20 (m, 1H, 1 × Ar-H), 7,32–7,87 (m, 12H, 1 × CH in 11 × Ar-H), 8,08–8,10 (m, 2H, 2 × Ar-H).	

4.8.5 Sinteza metil (E)-2-benzamido-3-(3-(benziloksi)fenil)akrilata (**31**)

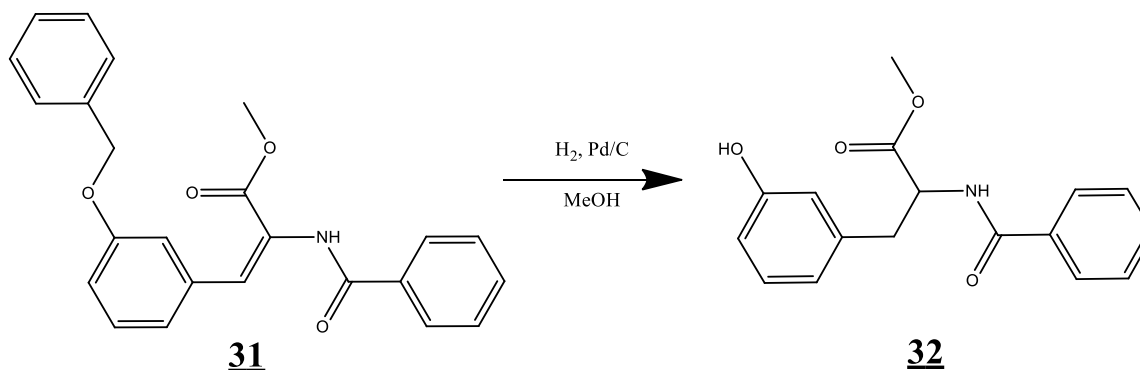


Slika 45: Reakcijska shema sinteze metil (E)-2-benzamido-3-(3-(benziloksi)fenil)akrilata.

V bučko smo zatehtali spojino **30** (8,985 g, 25,3 mmol, 1 eq), dodali metanol in diklorometan v razmerju 1 : 1 (100 ml) ter natrijev karbonat (1,5 g, 14,2 mmol, 0,6 eq). Reakcijsko zmes smo pustili mešati na sobni temperaturi čez noč, nato pa smo jo filtrirali skozi celite in topilo uparili. Surovi produkt smo uporabili v naslednji stopnji.

Metil (E)-2-benzamido-3-(3-(benziloksi)fenil)akrilata	M = 387,44 g/mol
Videz:	Rumeno olje
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,4
Izkoristek reakcije:	86 %

4.8.6 Sinteza metil 2-benzamido-3-(3-hidroksifenil)propanoata (**32**)



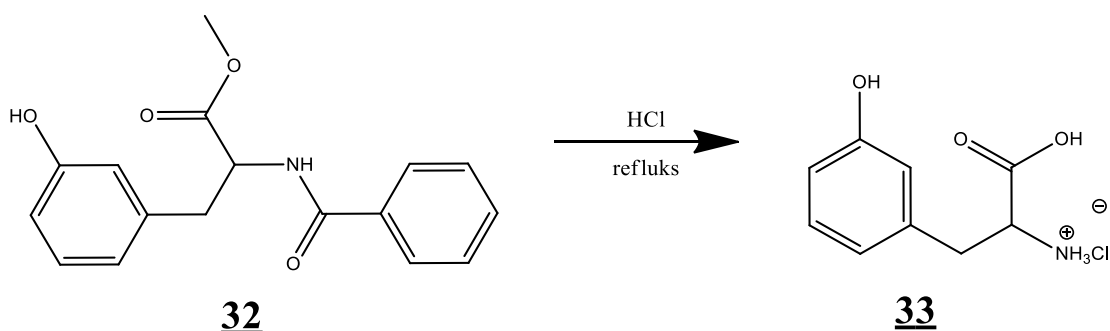
Slika 46: Reakcijska shema sinteze metil 2-benzamido-3-(3-hidroksifenil)propanoata.

Spojino **31** (14,092g, 37,2 mmol) smo raztopili v metanolu (150 ml), prepihali z argonom, dodali paladij na ogljiku (1,591 g), prepihali z vodikom in mešali preko noči.

Reakcijsko zmes smo prepihali z argonom, filtrirali skozi guč, topilo uparili in produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/Hex = 1/1).

Metil 2-benzamido-3-(3-hidroksifenil)propanoat		M = 299,33 g/mol
Videz:	Rumeno olje	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 1/1) = 0,31	
Izkoristek reakcije:	91 %	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 3,09–3,21 (m, 2H, CH ₂), 3,69 (s, 3H, CH ₃), 4,99–5,04 (m, 1H, CH), 6,64–6,66 (m, 1H, 1 × Ar-H), 6,75–6,77 (m, 1H, 1 × Ar-H), 6,95–6,97 (m, 1H, 1 × Ar-H), 7,09–7,14 (m, 1H, 1 × Ar-H), 7,32–7,36 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,42–7,46 (m, 1H, 1 × Ar-H), 7,69–7,71 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,94 (s, 1H, NH).	
¹³C-NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ (ppm) = 37,62; 52,56; 53,77; 114,49; 116,27; 120,79; 127,14; 128,68; 129,79; 132,03; 133,40; 137,26; 156,88; 167,91; 172,24	

4.8.7 Sinteza 1-karboksi-2-(3-hidroksifenil)etan-1-amonijev klorida (**33**)

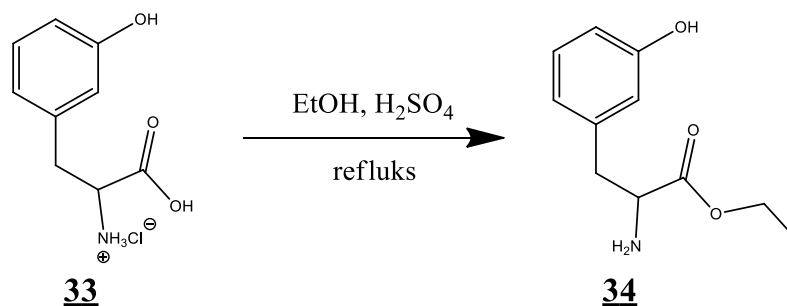


Slika 47: Reakcijska shema sinteze 1-karboksi-2-(3-hidroksifenil)etan-1-amonijev klorida.

Pripravili smo 4 M HCl (70 ml) in jo dodali k spojini **32** (9,110 g, 41,9 mmol) ter reakcijsko zmes mešali na refluku čez noč. Naslednji dan smo odparili topilo, produkt sprali z etrom (3 × 15 ml), eter odlili in dali produkt sušit v eksikator. Surov produkt smo uporabili v naslednji stopnji.

1-karboksi-2-(3-hidroksifenil)etan-1-amonijev klorid		M = 217,65 g/mol
Videz:	Rjavo olje	
TLC:	R _f (DKM/MeOH = 9/1 + očetna kislina) = 0	
Izkoristek reakcije:	72 %	

4.8.8 Sinteza etil 2-amino-3-(3-hidroksifenil)propanoata (**34**)

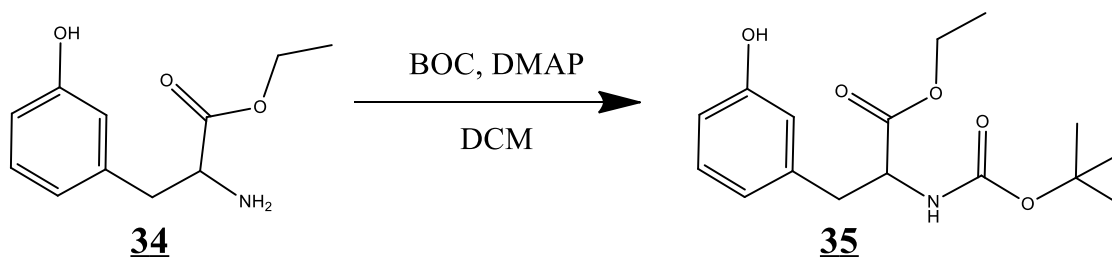


Slika 48: Reakcijska shema sinteze etil 2-amino-3-(3-hidroksifenil)propanoata.

Spojino **33** (5,386g, 34,7 mmol) smo raztopili v etanolu (100 ml), na ledeni kopeli dodali H₂SO₄ in čez noč segrevali na refluxu. Reakcijsko zmes smo zlili na led (100 ml), dodali Na₂CO₃ (8,007 g) in z NaHCO₃ uravnali pH na 9. Uparili smo etanol in naš produkt ekstrahirali v etil acetat, ki smo ga nato uparili. Surovi produkt smo uporabili na naslednji stopnji.

Etil 2-amino-3-(3-hidroksifenil)propanoat	M = 209,25 g/mol
Videz:	rjavo olje
TLC:	R _f (DKM/MeOH = 9/1 + NH ₃) = 0,47
Izkoristek reakcije:	82 %

4.8.9 Sinteza etil 2-((terc-butoksikarbonil)amino)-3-(3-hidroksifenil)propanoata (**35**)



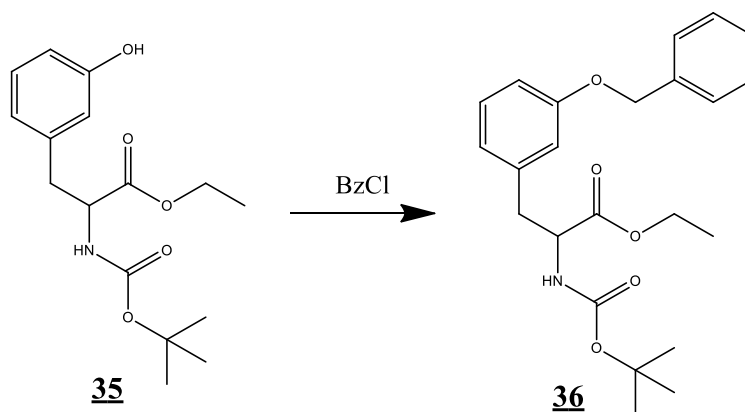
Slika 49: Reakcijska shema sinteze etil 2-((terc-butoksikarbonil)amino)-3-(3-hidroksifenil)propanoata.

Spojino **34** (4,250 g, 20,3 mmol, 1 eq) smo raztopili v DCM (100 ml), dodali žličko DMAP-a (1,497g, 12,3 mmol, 0,6 eq) in na ledeni kopeli še anhidrid BOC (4,876 g, 22,3 mmol, 1,1 eq). Reakcijsko zmes smo pustili mešati čez noč, nato pa jo ekstrahirali z vodno raztopino citronske kisline in nasičeno raztopino NaCl. Zbrali smo organsko fazo, jo sušili z Na₂SO₄, filtrirali in uparili topilo. Surovi produkt smo uporabili na naslednji stopnji.

Etil 2-amino-3-(3-hidroksifenil)propanoat	M = 309,36 g/mol
Videz:	rjavno olje
TLC:	R _f (Ea/Hex = 1/1) = 0,52
Izkoristek reakcije:	84 %

4.8.10 Sinteza etil 3-(3-(benziloksi)fenil)-2-((tercbutoksikarbonil)amino)propanoata

(**36**)

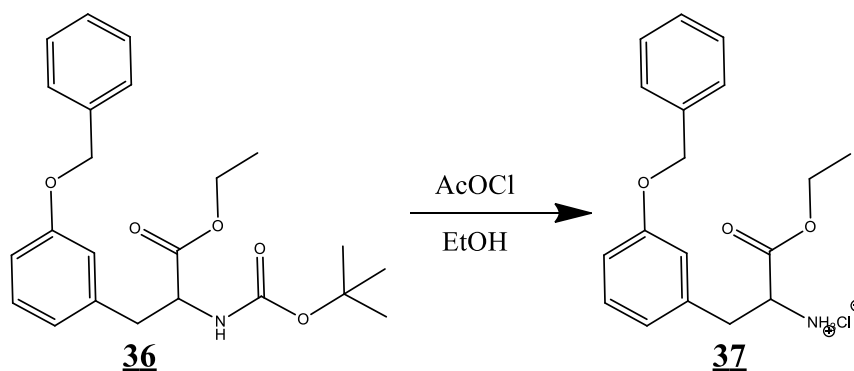


Slika 50: Reakcijska shema sinteze etil 3-(3-(benziloksi)fenil)-2-((tercbutoksikarbonil)amino)propanoata.

Spojino **35** (5,005 g, 16,2 mmol, 1 eq) smo raztopili v acetonu (130 ml), dodali K₂CO₃ (3,354 g, 24,3 mmol, 1,5 eq), KI (2,926 g, 17,6 mmol, 1,1 eq) in benzil klorid (1,95 ml, 16,9 mmol, 1,05 eq) ter mešali na oljni kopeli (T = 55 °C) do naslednjega dne. Nato smo uparili topilo in produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF: EtOAc/Hex = 1/4 → čisti EtOAc).

Etil 3-(3-(benziloksi)fenil)-2-((tercbutoksikarbonil)amino)propanoat	M = 399,49 g/mol	
Videz:	Rumeno olje	
TLC:	R _f (EtOAc/Hex = 4/1) = 73 %	
Izkoristek reakcije:	44 %	
¹H-NMR (400 MHz, CDCl₃)	δ (ppm) = 1,19–1,24 (m, 3H, CH ₃), 1,49–1,58 (m, 9H, 3 × CH ₃), 3,07–3,11 (m, 2H, CH ₂), 4,10–4,16 (m, 2H, CH ₂), 4,72–4,77 (m, 1H, CH), 4,90–5,07 (m, 1H, CH ₂), 5,26–5,29 (m, 1H, CH ₂), 6,97–7,06 (m, 5H, 5 × Ar-H), 7,24–7,31 (m, 3H, 3 × Ar-H), 7,38–7,43 (m, 1H, 1 × Ar-H), 7,73–7,79 (m, 1H, NH)	
MS (ESI)	Izračunano za C ₂₃ H ₂₉ NO ₅ [M+(H)] ⁺ (m/z):	398,20
	Izmerjena vrednost:	398,01

4.8.11 Sinteza 3-(3-(benziloksi)fenil)-1-etoksi-1-oksopropan-2-amonijev klorida (**37**)

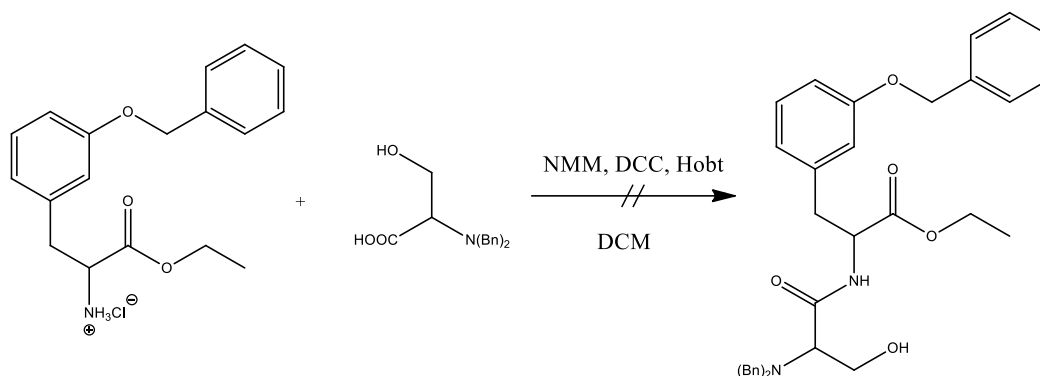


Slika 51: Reakcijska shema sinteze 3-(3-(benziloksi)fenil)-1-etoksi-1-oksopropan-2-amonijev klorida.

V bučko smo natehtali spojino **36** (2,712 g, 6,8 mmol), dodali brezvodni etanol (20 ml), na ledu ohladili in po kapljicah dodali acetil klorid (3 ml). Topilo smo odparili in produkt ekstrahirali v eter. Surovi produkt smo uporabili na naslednji stopnji.

3-(3-(benziloksi)fenil)-1-etoksi-1-oksopropan-2-amonijev klorid	M = 335,83 g/mol
Videz:	Rjavo olje
TLC:	R _f (DCM/M = 20/1 + NH ₃) = 0,16
Izkoristek reakcije:	57 %
¹H-NMR (400 MHz, DMSO)	δ (ppm) = 2,80–2,83 (m, 2H, CH ₂), 3,63–3,90 (m, 2H, CH ₂), 4,00–4,11 (m, 3H, CH ₃), 4,29–4,34 (m, 1H, CH), 6,48–6,63 (m, 5H, 5 × Ar-H), 7,04–7,09 (m, 2H, 2 × Ar-H), 7,28–7,55 (m, 2H, 2 × Ar-H), 9,34 (s, 2H, NH ₂).

4.8.12 Poskus sinteze etil 3-(3-(benziloksi)fenil)-2-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)propanoata



Slika 52: Reakcijska shema poskusa sinteze etil 3-(3-(benziloksi)fenil)-2-(2-(dibenzilamino)-3-hidroksipropanamido)propanoata.

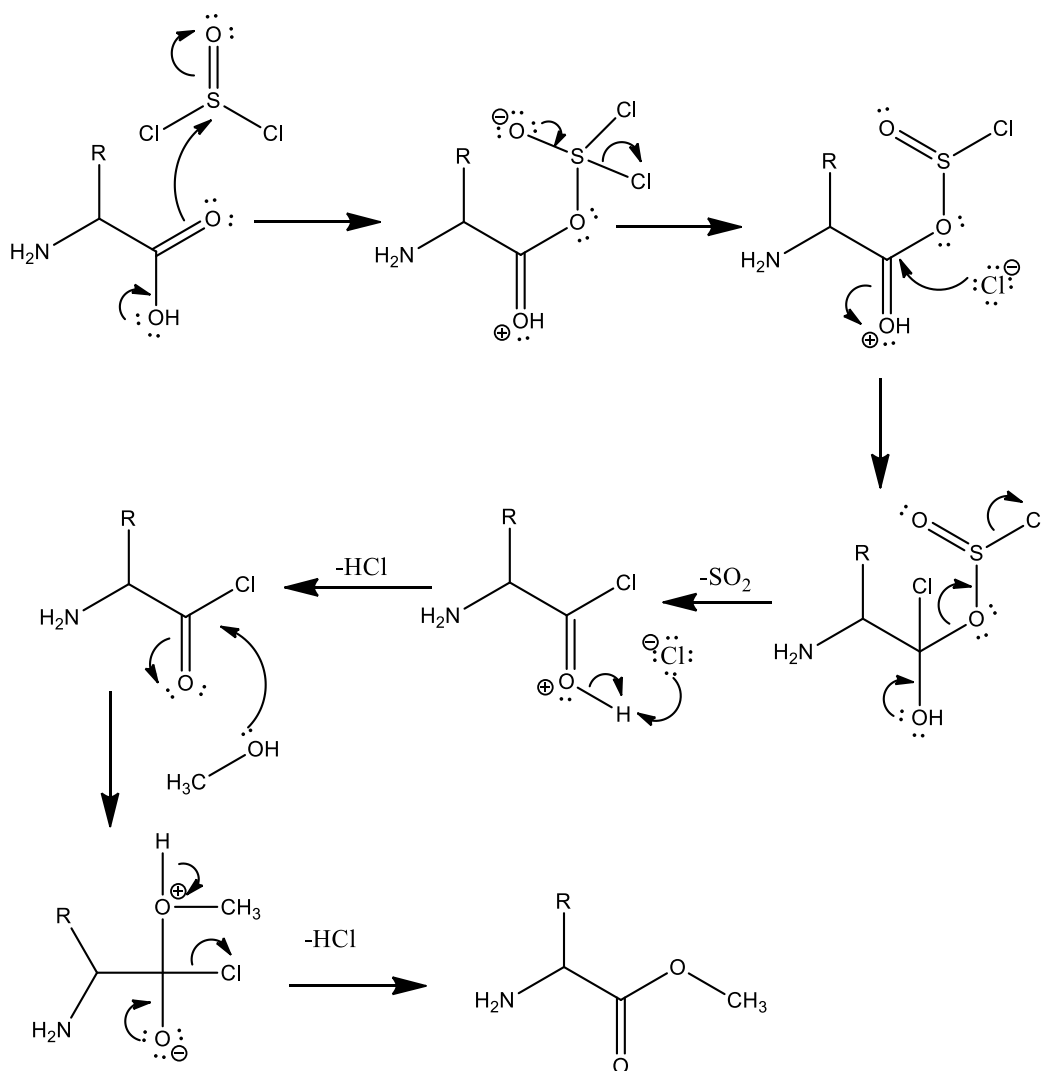
Reakcijo smo izvedli po splošnem postopku za tvorbo amidne vezi s sklopitveno reakcijo. Nismo uspeli izolirati želene spojine.

5 REZULTATI IN RAZPRAVA

5.1 Komentar sinteznih postopkov

5.1.1 Zaščita karboksilne skupine

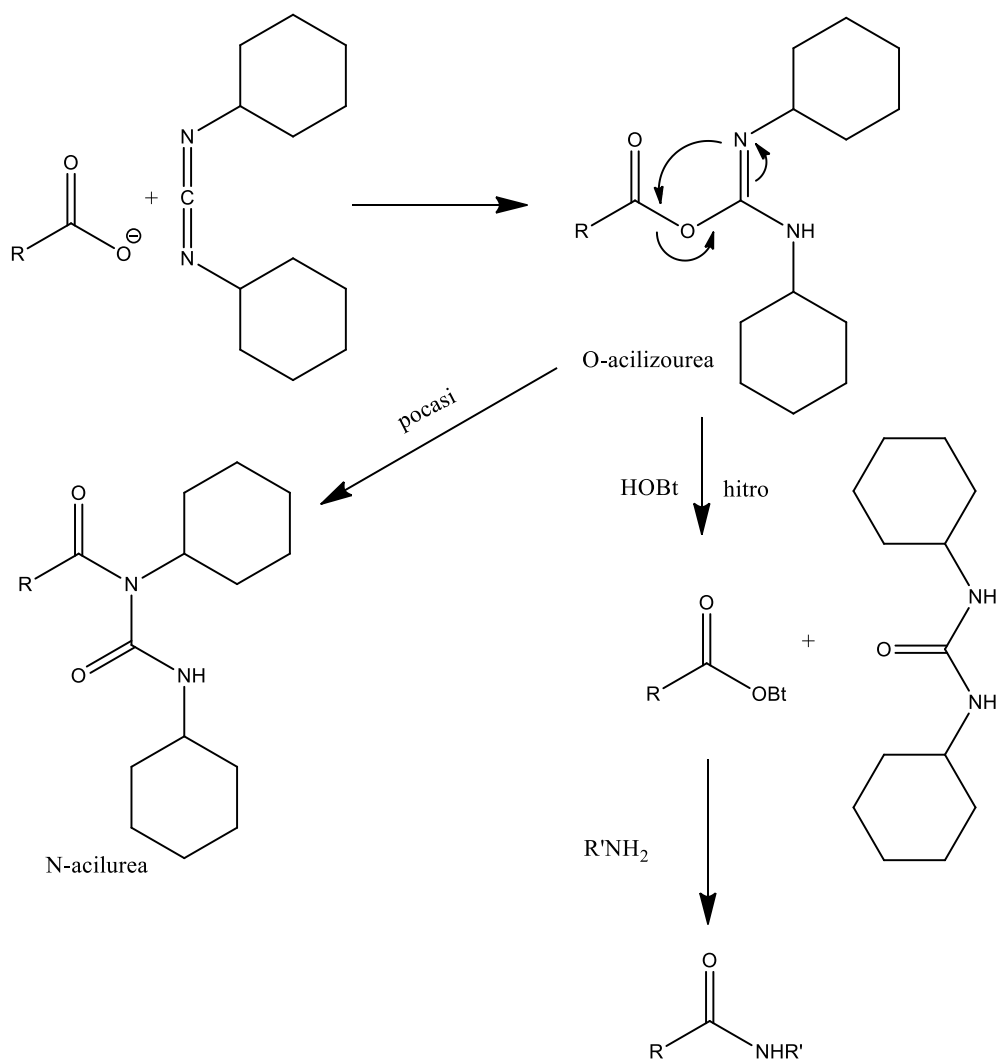
Karboksilno skupino izhodnih aminokislin smo zaščitili z metilnim estrom zaradi potencialne reaktivnosti v naslednji stopnji reakcije. Tionil klorid je s karboksilno skupino tvoril kislinski klorid in jo aktiviral za tvorbo estra s skupino OH. Nukleofilni napad metanola je povzročil nastanek tetraedričnega intermedijata, z eliminacijo HCl pa je nastal ester. Nastali produkt smo izolirali z ekstrakcijo v etilacetatu z nasičeno vodno raztopino NaHCO_3 , s čimer smo se znebili ostanka kisline in izhodne spojine, ki sta se raztopili v NaHCO_3 (aq), naš produkt pa je ostal v organski fazi.



Slika 53: Mehanizem tvorbe estra prek kislinskega klorida.

5.1.2 Tvorba amidne vezi s sklopitveno reakcijo

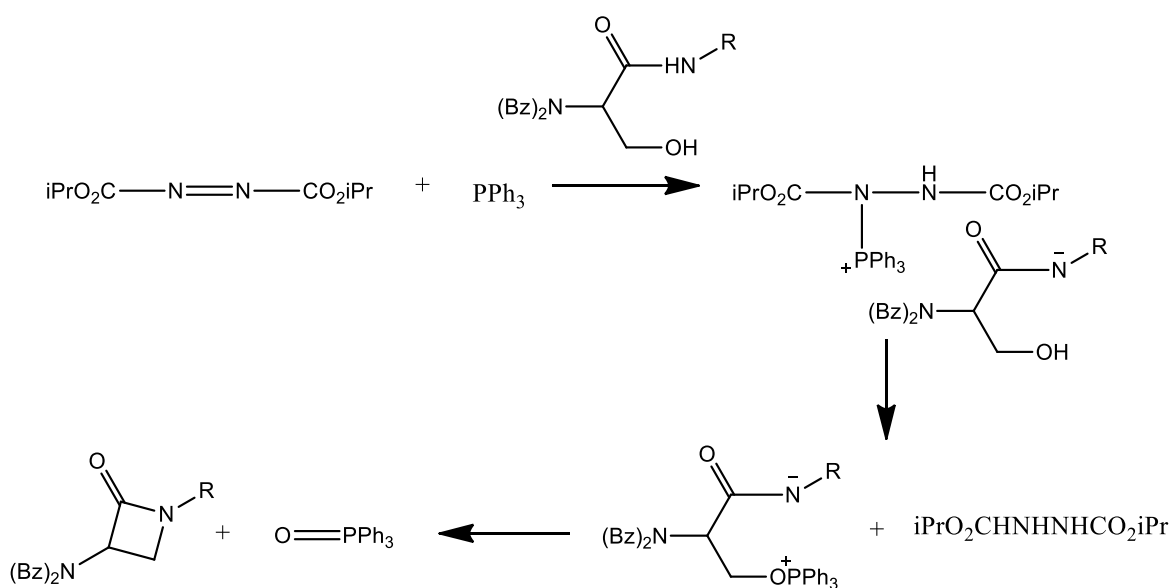
Dipeptid smo sintetizirali s pomočjo sklopitvenih reagentov DCC (ali EDC) in HOBt. DCC je reagiral s karboksilno kislino in z njo tvoril mešani anhidrid O-acilizouree. Ta intermediat lahko neposredno reagira z aminom in tvori amid in sečninski stranski produkt. Pri tej neposredni reakciji pogosto pride do racemizacije in prenosa acetilne skupine ter nastanka nereaktivne N-aciluree. Tej stranski reakciji smo se izognili tako, da smo pred dodatkom amina zmes ohladili na 0 °C in z dodatkom HOBt-a, ki je kot nukleofil reagiral hitreje kot kompetitivni prenos acilne skupine in tvoril intermediat, ki je nato reagiral z aminom (39). NMM smo uporabili kot bazo za nevtralizacijo kisline.



Slika 54: Mehanizem reakcije nastanka amida (38).

5.1.3 Mitsunobujeva reakcija

Mitsunobujeva reakcija je vsestranska in široko uporabljena metoda za dehidrativno sklopitev alkohola s kislino/pronukleofilom z uporabo kombinacije oksidacijskega azo reagenta (diizopropil azodikarboksilat – DIAD) in redukcijskega fosfinskega reagenta (trifenilfosfin – PPh₃). Uporabnost te reakcije izhaja iz dejstva, da je visoko stereoselektivna in poteče s popolno inverzijo na stereogenem centru do neracemiziranega produkta (40). PPh₃ reagira z DIAD-om in nastane fosfonijev intermediat, ki se veže na kisik skupine OH in jo aktivira kot dobro izstopajočo skupino. Reakcija se zaključi s substitucijo aktivirane skupine z nukleofilom, v našem primeru je ta nukleofil skupina NH v amidu (slika 10). Pri reakciji so nastali tudi številni stranski produkti kot na primer hidrazidi iz DIAD-a in fosfinski oksidi iz PPh₃, kar nam je otežilo čiščenje naših produktov in močno zmanjšalo izkoristke reakcij. Mitsunobujeva reakcija je ključna reakcija pri naši sintezni poti za sintezo beta laktamov, saj smo eni izmed prvih, ki smo se po tej poti lotili sinteze, kar je velik uspeh glede na to, da so beta laktami še vedno zelo aktualne učinkovine.



Slika 55: *Mehanizem Mitsunobujeve reakcije (39).*

5.1.4 Odščita aminske skupine

Reakcijo odščite dibenzilne zaščitne skupine na amski skupini smo izvajali z uvajanjem vodika v raztopino. Kot katalizator smo uporabili paladij na ogljiku (Pd/C), zato

smo morali zagotoviti inertne pogoje v bučki, saj je paladij ob stiku s kisikom močno reaktiven in bi lahko prišlo do vžiga reakcijske zmesi.

5.1.5 Odščita karboksilne skupine

Metilno zaščito na karboksilni skupini smo odstranili s hidrolizo v bazičnem z LiOH. Potek hidrolize smo spremljali z razvijanjem ploščic TLC, saj smo hoteli reakcijo takoj po poteku ustaviti, da ne bi prišlo do racemizacije. Produkti so bili zelo polarni, zato sta bila čiščenje in izolacija zelo težavna.

Pri spojinah **21** in **23** smo iz spektrov NMR sklepali, da je pri hidrolizi estra nastalo 20 % drugega diastereomera, pri spojini **25** pa je bil ta delež 40 %. H ob stereogenem centru je namreč precej kisel, zato je ob prisotnosti baze prišlo do odcepa tega protona in posledično do racemizacije. Verjetno je bil odstotek racemiziranega produkta večji pri substituentih, ki so povečali kislost tega protona na stereogenem centru. Pri spojini **24** pa smo na podlagi NMR in masnih spektrov sklepali, da je prišlo do odščite samo ene od dveh karboksilnih skupin.

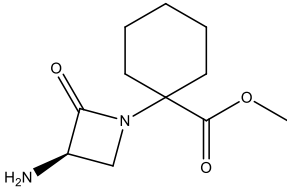
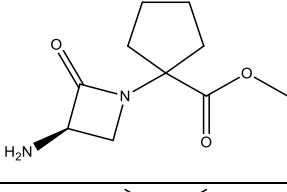
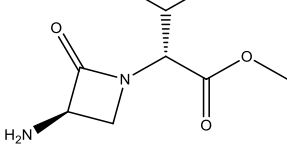
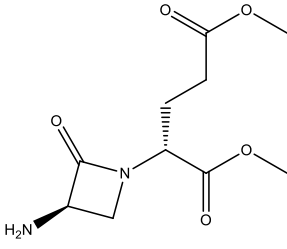
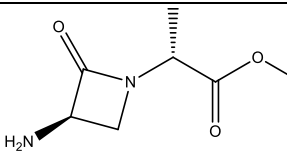
5.1.6 Sinteza 2-amino-3-(3-hidroksifenil)propanojske kisline

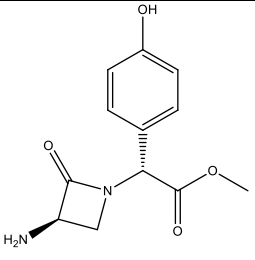
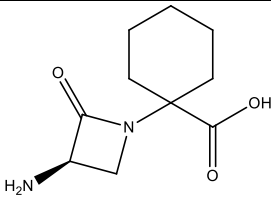
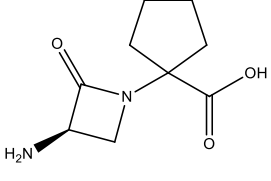
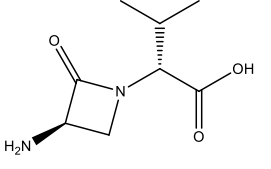
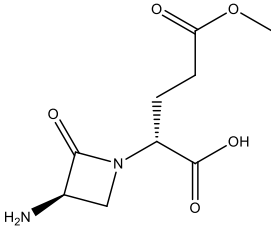
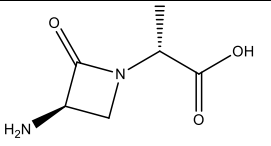
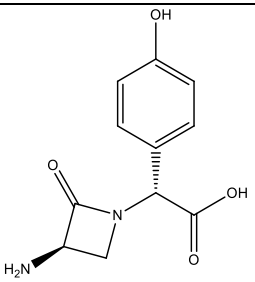
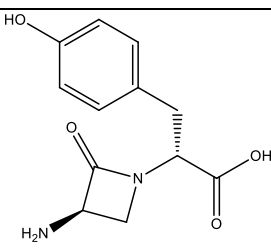
2-amino-3-(3-hidroksifenil)propanojsko kislino (spojina **33**) smo poskušali sintetizirati po različnih postopkih, ki smo jih poiskali s pomočjo programa SciFinder Scholar. Najprej smo želeno aminokislino poskušali sintetizirati z reakcijo med 3-hidroksibenzaldehidom in etil nitroacetatom z različnimi reagenti in pod različnimi pogoji, a so bili izkoristki prenizki ali pa reakcija ni potekla v pravi smeri. Spojino **33** smo bili primorani sintetizirati po daljši sintezni poti (40, 41). Spojino **28**, ki smo jo pripravili z zaščito skupine OH 3-hidroksibenzaldehida, smo kondenzirali s hipurno kislino (spojina **29**) v prisotnosti acetanhidrida in natrijevega acetata, da smo sintetizirali azlakton (spojina **30**). Temu smo dodali metanol v prisotnosti natrijevega karbonata in dobili nenasičen ester (spojina **31**). Uvajanje vodika s katalizatorjem Pd/C je reduciralo dvojno vez in odstranilo benzilno zaščito, pri čemer smo dobili amido ester (spojina **32**). S hidrolizo v kislem smo cepili amidno vez in nastala je zelena aminokislina (spojina **33**). Tej spojini smo nato zaščitili karboksilno,aminsko in hidroksilno skupino ter odstranili aminske skupine, da smo dobili spojino **37**, ki smo jo želeli sklopiti s spojino **1**, a reakcija ni potekla oz. nismo izolirali pravega produkta.

5.2 Rezultati biokemijskega testiranja

Sintetizirane spojine smo biokemijsko ovrednotili z določanjem zaviralnega delovanja na izoliranih encimih MurF in DdlB iz *E. coli*. Uporabili smo test na osnovi barvila malahitno zeleno. Rezultate smo podali z rezidualno aktivnostjo (RA), ki je razmerje med aktivnostjo encima v prisotnosti zaviralca in aktivnostjo encima brez prisotnosti zaviralca. Poleg osnovnega testa inhibicije smo preverili tudi, ali spojine delujejo kot lažni substrati za MurF.

Tabela 3: Rezultati biokemijskega testiranja.

Oznaka spojine	Strukturna formula	RA (%) pri 1 mM DdlB <i>E. coli</i>	RA (%) pri 1 mM MurF <i>E. coli</i>	RA (%) pri 2,5 mM MurF <i>E. coli</i> <i>Lažni substrat</i>
<u>15</u>		98	93	9
<u>16</u>		95	91	8
<u>17</u>		98	92	9
<u>18</u>		99	98	5
<u>19</u>		100	95	6

<u>20</u>		98	92	9
<u>21</u>		98	93	10
<u>22</u>		95	95	8
<u>23</u>		96	98	5
<u>24</u>		91	96	4
<u>25</u>		94	96	5
<u>26</u>		95	100	4
<u>27</u>		99	100	14

5.2.1 Komentar biokemijskega testiranja

Iz vrednosti RA vidimo, da nobena izmed spojin ni pokazala zaviralnega delovanja na izoliranih encimih MurF in DdlB iz *E. coli* (RA > 90 %). Najboljše rezultate sta pokazali spojina **24** na encimu MurF in spojina **16** na encimu DdlB (RA = 91 %), a so ti rezultati znotraj eksperimentalne napake (+/- 10 %), zato smo vse spojine opredelili kot neaktivne.

Poleg običajnega testa za inhibicijo smo preverili, ali spojine delujejo kot lažni substrati za MurF. Pri testu na MurF smo namesto osnovnega substrata D-Ala-D-Ala v reakcijsko mešanico dodali le naše spojine, ki oponašajo dipeptid. Pri večini spojin encim ni delal v prisotnosti naših spojin (RA < 10 %), kar nakazuje na to, da se spojine ne vgrajujejo v nastajajoči pentapeptid. Pri spojinah **21** in **27** smo opazili, da encim izkazuje manjšo aktivnost. Ti dve spojini bi se lahko vgradili v nastajajoči pentapeptid in tako delovali kot lažni substrat.

6 ZAKLJUČEK

Sintetizirali smo serijo novih potencialnih zaviralcev encimov MurF in DdlB iz skupine monobaktamskih protibakterijskih učinkovin. V okviru celotne raziskave smo razvili sintezni postopek za sintezo beta laktamov, kjer je bila ključna Mitsunobujeva reakcija za ciklizacijo beta laktamskega obroča. Reakcije so kljub nizkim izkoristkom potekle dobro in produkte smo uspešno izolirali.

Končnim spojinam smo določili zaviralno delovanje na izoliranih encimih MurF in DdlB iz *E. coli*. Spojine niso pokazale zaviralne aktivnosti na nobenem izmed encimov, zato smo preverili še, ali spojine delujejo kot lažni substrati na MurF. Pri spojinah **21** in **27** smo opazili, da encim izkazuje manjšo aktivnost. Ti dve spojini bi se lahko vgradili v nastajajoči pentapeptid in tako delovali kot lažni substrat.

V drugem delu magistrske naloge smo razvijali sintezni postopek za sintezo nove aminokislina (spojina **33**). Spojino smo uspešno izolirali, ni pa nam je uspelo pretvoriti v monobaktam.

Rezultati testiranja naših spojin kot lažnih substratov na MurF so spodbudni in predstavljajo dobro izhodišče za nadaljnje načrtovanje in optimizacijo potencialnih protibakterijskih učinkovin z monobaktamskim skeletom.

7 LITERATURA

1. Lemke TL, Williams DA: Foye's principles of medicinal chemistry, 6th Edition, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2008: 1028–1036.
2. Alanis AJ: Resistance to antibiotics: Are We in the Post-Antibiotic Era? *Archives of Medical Research* 2005, 36 (6): 697–705.
3. Patrick GL: *An Introduction to Medicinal Chemistry*, 4th Edition, Oxford University Press, New York, 2009: 421–421.
4. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Hendersson G: *Rang and Dale's Pharmacology*, 7th Edition, Churchill Livingstone, Edinburgh, 2012: 609–621.
5. Clark MA, Finkel R, Rey JA, Whalen K: *Lippincott's Illustrated Reviews. Pharmacology*, 5th Edition, Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2012: 369–380.
6. *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*, World Health Organization, France, 2014: 9–10.
7. Alekshun MN, Levy SB: Molecular Mechanisms of Antibacterial Multidrug Resistance. *Cell press*, 2007, 128 (6): 1037–1050.
8. Jones JA, Virga KG, Gumina G, Hevener KE: Recent advances in the rational design and optimization of antibacterial agents. *Medicinal Chemistry Communications*, 2016, 7: 1694–1715.
9. Davies J, Davies D: Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2010, 74 (3): 417–433.
10. Tortora GJ, Funke BR, Case CL: *Microbiology, An Introduction*, 4th Edition, The Benjamin/Cummings Publishing Company, 1992: 77–79.
11. Cooper GM, Hausman RE: *The Cell A Molecular Approach*, 5th Edition, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA, 2009: 571–572.
12. Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP: *Brock: Biology of Microorganisms*, 13th Edition, Pearson Education, Inc., San Francisco, 2012: 86-91, 150–151.
13. Silhavy TJ, Kahne D, Walker S: The Bacterial Cell Envelope. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2010;2:a000414.
14. Vollmer W, Blanot D, de Pedro MA: Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32: 149–167.

15. Johnson JW, Fisher JF, Mobashery S: Bacterial cell-wall recycling. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2012, 1277: 54–75.
16. Heijenoort J: Recent advances in the formation of the bacterial peptidoglycan monomer unit. *Natural Product Reports*, 2001, 18: 503–519.
17. Scheffers DJ, Pinho MG: Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69 (4): 585–607.
18. Vollmer W, Bertsche U: Murein (peptidoglycan) structure, architecture and biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2008, 1778: 1714–1734.
19. Barreteau H, Kovč A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D: Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32 (2): 168–207.
20. Sova M, Kovač A, Turk S, Hrast M, Blanot D, Gobec S: Phosphorylated hydroxyethylamines as novel inhibitors of the bacterial cell wall biosynthesis enzymes MurC to MurF. *Bioorganic Chemistry*, 2009, 37: 217–222.
21. Koudimi I, Levesque RC, Paradis-Bleau C: The biology of Mur ligases as an antibacterial target. *Molecular Microbiology*, 2014, 94 (2): 242–253.
22. Moraes GL, Gomes GC, Sousa PRM, Alves CN, Govender T, Kruger HG, Mguire GEM, Lamichhane G, Lameira J: Structural and functional features of enzymes of *Mycobacterium tuberculosis* peptidoglycan biosynthesis as target for drug development. *Tuberculosis*, 2015, 95 (2): 95–111.
23. Yan Y, Munshi S, Leiting B, Andersson MS, Chrzas J, Chen Z: Crystal Structure of *Escherichia coli* UDPMurNAc-tripeptide D-alanyl-D-alanine-adding Enzyme (MurF) at 2.3 Å Resolution. *Journal of Molecular Biology*, 2000, 304: 435–445.
24. Stamper GF, Longenecker KL, Fry EH, Jakob KG, Florjancic AS, Gu YG, Anderson DD, Cooper CS, Zhang T, Clark RF, Cia Y, Black-schaefer CL, McCall JO, Lerner CG, Hajduk PJ, Beutel BA, Stoll VS: Structure-based Optimization of MurF Inhibitors. *Chemical Biology & Drug Design*, 2006, 67: 58–65.
25. Hrast M, Sosič I, Šink R, Gobec S: Inhibitors of the peptidoglycan biosynthesis enzymes MurA-F. *Bioorganic Chemistry*, 2014, 55: 2–15.
26. Gu YG, Florjancic AS, Clark RF, Zhang T, Cooper CS, Anderson DD, Lerner CG, McCall JO, Cia Y, Black-schaefer CL, Stamper GF, Hajduk PJ, Beutel BA: Structure-

- activity relationship of novel potent MurF inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 2004, 14: 267–270.
27. Hrast M, Anderluh M, Knez D, Randall CP, Bareteau H, O'Neill AJ, Blanot D, Gobec S: Design synthesis and evaluation of second generation MurF inhibitors based on a cyanothiophene scaffold. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014, 73: 83–96.
28. Sosič I, Štefane B, Kovač A, Turk S, Blanot D, Gobec S: The synthesis of novel 2,4,6-trisubstituted 1,3,5-triazines: a search for potential MurF enzyme inhibitors. *Heterocycles*, 2010, 81: 91–115.
29. Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Abbanat D, Foleno B, Maden A, Goldschmidt R, Bush K: Utility of Muropeptide Ligase for Identification of Inhibitors of the Cell Wall Biosynthesis Enzyme MurF. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50 (1): 230–236.
30. Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Foleno BD, Simon LD, Guillemont J, Macielag M, Bush K: MurF Inhibitors with Antibacterial Activity: Effect on Muropeptide Levels. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009, 53 (8): 3240–3247.
31. Baum EZ, Crespo-Carbone SM, Kilinger A, Foleno BD, Turchi I, Macielag M, Bush K: A MurF inhibitor that disrupts cell wall biosynthesis in *Escherichia coli*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007, 51 (12): 4420–4426.
32. Hrast M, Vehar B, Turk S, Konc J, Gobec S, Janežič D: Function of the D-Alanine:D-Alanine Ligase Lid Loop: A Molecular Modeling and Bioactivity Study. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2012, 55: 6849–6856.
33. Enzymatic characterization and crystal structure analysis of the D-alanine-D-alanine ligase from *Helicobacter pylori*. *Proteins*, 2008, 72 (4): 1148–1160.
34. Tytgat I, Colacino E, Tulkens PM, Poupaert JH, Prévost M, Van Bambeke F: DD-Ligases as a Potential Target for Antibiotics: Past, Present and Future. *Current Medicinal Chemistry*, 2009, 16 (20): 2566–2580.
35. Bruning JB, Murillo AC, Chacon O, Barleta RG, Sacchettini JC: Structure of the *Mycobacterium tuberculosis* d-Alanine:d-Alanine Ligase, a Target of the Antituberculosis Drug d-Cycloserine. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2011, 55 (1): 291–301.
36. Chakravarty PK, Greenlee WJ, Parson WH, Patchett AA, Combs P, Roth A, Busch RD, Mellin TN: (3-Amino-2-oxoalkyl)phosphonic Acids and Their Analogues as Novel Inhibitors of D-alanine:D-alanine Ligase. *J. Med. Chem.* 1989, 32: 1886–1890.

37. Neuhaus FC, Hammes WP: Inhibition of cell all biosynthesis gy analogues of alanine. *Pharmacology & Therapeutics*, 1981, 14: 265–319.
38. Montalbetti CAGN, Falque V: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 2005, 61: 10827–10852.
39. But TYS, Toy PH: The Mitsunobu Reaction: Origins, Mechanism, Improvementss, and Applications. *Chemistry – An Asian Journal*, 2007, 2: 1340–1355.
40. Konkel JT, Fan J, Jayachandran B, Kirk KL: Synthesis of 6-fluoro-*meta*-tyrosine and of its metabolites. *Journal of Fluorine Chemistry*, 2002, 115(1): 27–32.
41. Cordes M, Jacques O, Köttgen A, Jasper C, Boudebous H, Giese B: Development of a Model System for the Study of Long Distance Electron Transfer in Peptides. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2008, 350 (7–8): 1053–1062.