

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ANJA GREGORC

**SINTEZA ANALOGOVI MONOCIKLIČNIH *BETA*-LAKTAMOV NA OSNOVI 3-  
(2-OKSOAZETIDIN-1-IL)PROPANOJSKE KISLINE KOT POTENCIALNIH  
ZAVIRALCEV PENICILIN VEZOČIH PROTEINOV**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI  
FAKULTETA ZA FARMACIJO



ANJA GREGORC

**SYNTHESIS OF MONOCYCLIC *BETA*-LACTAM ANALOGUES BASED ON 3-(2-  
OXOAZETIDIN-1-YL)PROPANOIC ACID AS POTENTIAL INHIBITORS OF  
PENICILLIN-BINDING PROTEINS**

MAGISTRSKA NALOGA

ENOVITI MAGISTRSKI ŠTUDIJSKI PROGRAM FARMACIJA

Ljubljana, 2016

Magistrsko delo sem opravljala na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo pod mentorstvom doc. dr. Mateja Sove, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani (Center za masno spektrometrijo). Biokemijsko vrednotenje spojin je bilo izvedeno v Centru za proteinski inženiring v Liegu.

## **ZAHVALA**

Zahvaljujem se doc. dr. Mateju Sovi, mag. farm. za ves trud, pomoč in nasvete pri raziskovalnem delu in pisanju magistrske naloge. Zahvaljujem se tudi naslednjim bivšim in sedanjim sodelavcem s katedre za farmacevtsko kemijo: dr. Alešu Žuli, mag. farm., asist. dr. Marku Jukiču, mag. farm. in Damijani Zalar.

Za pregled magistrske naloge se zahvaljujem predsednici komisije prof. dr. Mirjani Gašperlin, mag. farm. in članici komisije doc. dr. Nini Kočevar Glavač, mag. farm.

Posebna zahvala gre tudi moji mami, Pavlu in Maji za vso podporo in nasvete pri pisanju magistrske naloge.

## **IZJAVA**

Izjavljam, da sem magistrsko delo samostojno izdelala pod vodstvom mentorja doc. dr. Mateja Sove, mag. farm.

Ljubljana, 2016

Anja Gregorc

# VSEBINA

KAZALO SLIK.....	V
KAZALO PREGLEDNIC.....	VI
POVZETEK .....	VII
ABSTRACT .....	VIII
OKRAJŠAVE.....	IX
1 UVOD.....	1
1.1 NEVARNOSTI BAKTERIJSKIH OKUŽB.....	1
1.2 ANTIBIOTIKI.....	1
1.3 ZAVIRANJE SINTEZE BAKTERIJSKE CELIČNE STENE .....	3
1.3.1 Celična stena: vloga, zgradba, sinteza.....	3
1.3.2 Penicilin vezoči proteini .....	4
1.3.3 Zaviralci biosinteze celične stene .....	5
1.3.3.1 Betalaktamski antibiotiki.....	5
1.4 BAKTERIJSKA REZISTENCA.....	7
1.4.1 Biološki mehanizmi odpornosti.....	9
1.4.2 Odpornost na betalaktamske antibiotike.....	10
1.4.2.1 MRSA in PBP2a .....	11
1.4.2.2 Nizkoafinitetni PBP pri enterokokih.....	11
1.5 BOJ PROTI ODPORNOSTI IN RAZVOJ NOVIH ANTIBIOTIKOV .....	12
1.5.1 Ceftobiprol.....	13
1.5.2 Ostali cefalosporini in karbapenemi v razvoju.....	14
1.5.3 Nove kombinacije $\beta$ -laktamov in zaviralcev $\beta$ -laktamaz .....	14
1.5.4 Razvoj novih monobaktamov.....	15
2 NAMEN IN NAČRT DELA .....	16
3 MATERIALI IN METODE .....	17

3.1	MATERIALI .....	17
3.1.1	Reagenti in topila.....	17
3.1.2	Laboratorijska oprema.....	17
3.1.3	Programska podpora za risanje in poimenovanje spojin .....	17
3.2	METODE .....	18
3.2.1	Kromatografske metode .....	18
3.2.2	Spektroskopske metode .....	18
3.2.3	Določanje temperature tališča .....	19
3.2.4	Biokemijsko vrednotenje spojin na PBP-jih iz rezistentnih sevov.....	19
4	EKSPERIMENTALNO DELO.....	20
4.1	SINTEZA OSNOVNE SPOJINE.....	20
4.1.1	Sinteza <i>terc</i> -butil (1-((benziloksi)amino)-3-hidroksi-1-oksopropan-2-il)karbamata (spojine 1).....	20
4.1.2	Sinteza <i>terc</i> -butil (1-(benziloksi)-2-oksoazetidin-3-il)karbamata (spojine 2). 21	
4.1.3	Sinteza <i>terc</i> -butil (2-oksoazetidin-3-il)karbamata (spojine 3).....	22
4.2	SINTEZA 3-(3-(2-(2-AMINOTIAZOL-4-IL)-2-(METOKSIIMINO)ACETAMIDO)-2-OKSOAZETIDIN-1-IL)PROPANOATA (SPOJINE 7).....	24
4.2.1	Sinteza etil 3-(3-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-2-oksoazetidin-1-il)propanoata (spojine 4).....	24
4.2.2	Sinteza etil 3-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)propanoata (spojine 5) .....	25
4.2.3	Sinteza etil 3-(3-(2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)propanoata (spojine 6).....	26
4.2.4	Sinteza 3-(3-(2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)propanoata (spojine 7).....	27
4.3	SINTEZA 3-(3-(5-KLOROTIOFEN-2-KARBOKSAMIDO)-2-OKSOAZETIDIN-1-IL)PROPANOJSKE KISLINE (SPOJINE 9) .....	29

4.3.1	Sinteza etil 3-(3-(5-klorotiofen-2-karboksamido)-2-oksoazetidin)-1-il)propanoata (spojine 8).....	29
4.3.2	Sinteza 3-(3-(5-klorotiofen-2-karboksamido)-2-oksoazetidin-1-il)propanojske kisline (spojine 9) .....	30
4.4	SINTEZA METIL 2-((3-(( <i>TERC</i> -BUTOKSIKARBONIL)AMINO)-2-OKSOAZETIDIN-1-IL)METIL)AKRILATA (SPOJINE 10).....	32
4.5	SINTEZA METIL 2-((-3-(( <i>TERC</i> -BUTOKSIKARBONIL)AMINO)-2-OKSOAZETIDIN-1-IL)BUTANOATA (SPOJINE 11) .....	33
5	REZULTATI IN RAZPRAVA .....	34
5.1	RAZLAGA SINTEZNIH POSTOPKOV .....	34
5.1.1	Sinteza osnovne spojine .....	34
5.1.2	Sinteza disubstituiranih derivatov .....	39
5.1.2.1	Sinteza propionatnega derivata .....	39
5.1.2.2	Sinteza ostalih derivatov .....	44
5.2	PRIMERJAVA STRUKTUR DERIVATOV S CEFTOBIPROLOM .....	45
5.3	BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE PRIPRAVLJENIH SPOJIN NA REZISTENTNIH PBP.....	47
6	SKLEP .....	49
	LITERATURA .....	50

## KAZALO SLIK

Slika 1: Shematski prikaz dveh tipov peptidoglikanske mreže, povzeto po (11).....	3
Slika 2: Sinteza peptidoglikana in mesta delovanja nekaterih antibiotikov, ki zavirajo sintezo celične stene, povzeto po (13).....	4
Slika 3: Shematski prikaz transpeptidacije, povzeto po (16). ....	5
Slika 4: Shematski prikaz delovanja $\beta$ -laktamov, povzeto po (16).....	5
Slika 5: Ceftobiprol medokaril (29). ....	14
Slika 6: BAL30072 (21). ....	15
Slika 7: Shematski prikaz načrta dela.....	16
Slika 8: Reakcijska shema sinteze spojine 1 .....	20
Slika 9: Reakcijska shema sinteze spojine 2 .....	21
Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine 3 .....	22
Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine 4 .....	24
Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine 5 .....	25
Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine 6 .....	26
Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine 7 .....	27
Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine 8 .....	29
Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine 9 .....	30
Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine 10 .....	32
Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine 11 .....	33
Slika 19: Mehanizem aktivacije kisline, povzeto po (35-37).....	34
Slika 20: Mehanizem nastanka amida, povzeto po (35, 36).....	34
Slika 21: Mehanizem nastanka amida v prisotnosti HOBt, povzeto po (35, 36). ....	35
Slika 22: Stranska reakcija, povzeto po (37). ....	35
Slika 23: Mehanizem Mitsunobujeve reakcije, povzeto po (40, 41).....	36
Slika 24: Primerjava številnih mobilnih faz za optimizacijo izolacije spojine 2.....	37
Slika 25: Mehanizem odščite Boc, povzeto po (44).....	41
Slika 26: Mehanizem tvorbe amidne vezi ob prisotnosti TBTU, povzeto po (36, 46).....	42

## KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica I: Razlike med prokariontsko in evkariontsko celico, povzeto po (4–9).....	2
Preglednica II: Novi cefalosporini in karbapenemi v razvoju, povzeto po (29, 31, 32).....	14
Preglednica III: Načrtovane strukture končnih spojin.....	16
Preglednica IV: Poskusne sinteze derivatov z daljšimi alkilnimi verigami .....	44
Preglednica V: Primerjava struktur ceftobiprola in sintetiziranih končnih spojin. ....	45
Preglednica VI: Režidualne aktivnosti (RA) sintetiziranih spojin, izražene v odstotkih. ...	47



## POVZETEK

Patogeni mikrobi v današnjem času še vedno predstavljajo veliko grožnjo našemu zdravju, saj pojav odpornosti na antibiotike narašča.  $\beta$ -laktami ostajajo eni najpogosteje uporabljenih antibiotikov, vendar je nanje odpornih vedno več patogenih bakterij. Odpornost se pojavi, ko pride pri penicilin vezočih proteinih, ki sodelujejo pri izgradnji bakterijske celične stene in so tarča  $\beta$ -laktamov, do sprememb. Primarni vzrok za odpornost je lahko mutacija obstoječih ali pridobitev novih genov, ki nosijo zapise za penicilin vezoče proteine.

Eden od načinov, kako rešiti ta problem, je iskanje novih potencialnih  $\beta$ -laktamskih antibiotikov, ki bi zavirali delovanje spremenjenih penicilin vezočih proteinov. Žal pa je v zadnjih nekaj letih na trg prišlo le malo novih antibiotikov. Eden izmed pomembnejših je ceftobiprol – cefalosporin, ki deluje na veliko število odpornih bakterij.

V magistrski nalogi smo želeli sintetizirati monobaktame, ki posnemajo strukturo ceftobiprola. Sinteza enega monobaktama je zajemala 8 stopenj. V prvem delu magistrske naloge smo sintetizirali osnovno spojino, ki smo jo v drugem delu uporabili za sintezo različnih disubstituiranih monobaktamov. Substituente, ki smo jih pripeli na osnovno spojino, smo izbrali glede na podobnost s substituenti na ceftobiprolu. Kljub temu, da naj bi bila sinteza monobaktamov enostavnejša od sinteze cefalosporinov, smo imeli pri izvedbi eksperimentalnega dela velike težave. Kar nekaj stopenj nujno potrebuje izboljšave. Spojine so bile tudi biokemijsko ovrednotene in čeprav rezultati niso spodbudni, nam sinteza in strukture sintetiziranih spojin lahko služijo kot osnova za nadaljnje načrtovanje novih monobaktamov.

**Ključne besede:** antibiotiki, bakterijska rezistenca,  $\beta$ -laktami, ceftobiprol, sinteza monobaktamov.

## ABSTRACT

The emergence of antibiotic resistance is increasing, causing pathogenic microbes to pose a great threat to our health.  $\beta$ -lactams remain one of the most commonly used antibiotics, but more and more pathogenic bacteria are becoming resistant to their activity. When the penicillin-binding proteins, which are involved in the construction of the bacterial cell wall and are the target of  $\beta$ -lactams, undergo changes, resistance occurs. The primary cause of resistance is either a mutation of existing genes or the acquisition of new genes encoding the penicillin-binding proteins.

One possible way to solve this problem is to search for new potential  $\beta$ -lactam antibiotics, which would inhibit the modified penicillin binding proteins. Unfortunately, only few new antibiotics have been approved over the last few years. One of the most important is Ceftobiprole - cephalosporin with activity against many resistant bacteria.

The aim of this master's thesis was to synthesize monobactams that mimic the structure of ceftobiprole. Synthesis of one monobactam consisted of 8 stages. In the first part of this master's thesis, we synthesized the basic compound, which was then used in the second part for the synthesis of various disubstituted monobactams. Substituents which were attached to the basic compound were selected according to the similarity of substituents on ceftobiprole. Despite the fact that the synthesis of monobactams is supposed to be simpler than the synthesis of cephalosporines, we had substantial problems in the execution of experimental work. Quite a few stages are in urgent need of improvement. Compounds were also evaluated biochemically and although the results are not encouraging, the synthesis and structure of the synthesized compounds can serve as a basis for the further planning of new monobactams.

**Keywords:** antibiotics, bacterial resistance,  $\beta$ -lactams, ceftobiprole, synthesis of monobactams.

## OKRAJŠAVE

AIDS	sindrom pridobljene imunske pomanjkljivosti (ang. acquired immune deficiency syndrome)
Ala	alanin
ang.	angleško
Boc	<i>tert</i> -butiloksikarbonil
DCC	<i>N,N</i> -dicikloheksilkarbodiimid
DEAD	dietil azodikarboksilat
DMF	dimetilformamid
DNA	deoksiribonukleinska kislina (ang. DNA - deoxyribonucleic acid)
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)karbodiimid
ESBL	betalaktamaze z razširjenim spektrom delovanja (ang. extended spectrum beta-lactamases)
ESI-HRMS	masna spektrometrija visoke ločljivosti z ionizacijo z elektrorazprševanjem (ang. high resolution electrospray ionization mass spectrometry)
G-	po Gramu negativne (bakterije)
G+	po Gramu pozitivne (bakterije)
Glu	glutaminska kislina
Gly	glicin
HOBt	hidroksibenzotriazol
IR	infrardeča spektroskopija
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
<i>J</i>	sklopitvena konstanta
Lys	lizin
MF	mobilna faza
MRSA	na meticilin odporen <i>Staphylococcus aureus</i> (ang. methicillin resistant <i>S. aureus</i> )
MS	masna spektroskopija
NAG	<i>N</i> -acetil glukozaamin (GlcNAc)
NAMA	<i>N</i> -acetil muraminska kislina (MurNAc)
NMM	<i>N</i> -metilmorfolin
NMR	nuklearna magnetna resonanca
PBP	penicilin vezoči protein (ang. penicillin binding protein)
PRSP	na penicilin odporen <i>Streptococcus pneumoniae</i> (ang. penicillin resistant <i>S. pneumoniae</i> )
Q-TOF	masni analizator časa preleta ionov s kvadrupolnim predanalizatorjem (ang. quadrupole time-of-flight)
RA	rezidualna aktivnost
Rf	retencijski faktor
SARS	sindrom akutne respiratorne stiske (ang. severe acute respiratory syndrome)
Sn	nukleofilna substitucija

TBAB	tetra- <i>n</i> -butilamonijev bromide
TBTU	<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil- <i>O</i> -(benzotriazol-1-il)uronijev tetrafluoroborat
TMS	tetrametilsilan
tRNA	prenašalna ribonukleinska kislina (ang. transfer ribonucleic acid)
Ttal	temperatura tališča
UDP	uridin difosfat
UV	ultravijolično
VRSA	na vankomicin odporen <i>Staphylococcus aureus</i> (ang. vancomycin resistant <i>S. aureus</i> )
δ	kemijski premik
λ	valovna dolžina

# 1 UVOD

## 1.1 NEVARNOSTI BAKTERIJSKIH OKUŽB

Trendi v razširjenosti, pojavnosti in globalnem bremenu okužb kažejo, da smo daleč od tega, da bi obvladovali infekcijske bolezni. Kljub temu, da zdravljenje z antibiotiki obstaja, infekcije še vedno predstavljajo eno večjih groženj za javno zdravje v tem stoletju. Če razvrstimo bolezni v svetovnem merilu glede na skupno breme, ki ga predstavljajo, se infekcijske bolezni uvrstijo čisto na vrh lestvice – predstavljajo namreč 31 odstotkov skupnega bremena. Poleg tega so okužbe drugi najpogostejši vzrok smrti na svetu (2,47 smrti / 1000 ljudi), za boleznimi srca in ožilja (2,63 smrti / 1000 ljudi) zaostajajo le malo. Znotraj Evropske unije infekcijske bolezni niso uvrščene tako visoko na lestvicah. Kljub temu pa okužbe z odpornimi bakterijami predstavljajo veliko grožnjo za zdravje. Pojav novih sevov bakterij, ki so odporni proti enemu ali več razredom antibiotikov, je povzročil resne zdravstvene in ekonomske posledice: višji stroški zdravljenja, daljše trajanje bolezni in hospitalizacij, večje tveganje za obolevnost in umrljivost ter širjenje bolezni (1). Zato so bakterijske okužbe in njihovo zdravljenje še danes pereč problem naše družbe.

## 1.2 ANTIBIOTIKI

Antibiotiki so zdravilne učinkovine, ki jih uporabljamo za zdravljenje bakterijskih infekcij (običajno sistemskih, lahko pa tudi lokalnih).

Glede na izvor jih lahko razdelimo na naravne, polysintezne in sintezne. Glede na učinek, ki ga imajo na bakterije, pa ločimo bakteriostatične in baktericidne. Bakteriostatični antibiotiki zavirajo rast bakterij, odstrani pa jih gostiteljev imunski sistem. Takšni antibiotiki so makrolidi, tetraciklini, kloramfenikol. Baktericidni antibiotiki, kot so na primer  $\beta$ -laktami, aminoglikozidi, glikopeptidi, pa ubijejo bakterije in jih ponavadi uporabljamo, ko je gostiteljev imunski sistem manj učinkovit pri odstranjevanju. V klinični praksi antibiotike največkrat definiramo kot široko- ali ozkospektralne. Širokospektralni delujejo na veliko število mikroorganizmov, ozkospektralni pa na specifično skupino mikroorganizmov, navadno tako, da motijo točno določen presnovni proces, ki je značilen le za to skupino (1). Antibiotike lahko razdelimo tudi glede na mehanizem delovanja in strukturo, kar bo predstavljeno v naslednjem odstavku.

## DELITEV GLEDE NA TARČO IN GLEDE NA STRUKTURO

Cilj delovanja antibiotika je, da ustavi rast oziroma ubije bakterije, hkrati pa ne škodi gostitelju. Želimo si zaviranja samo tistih procesov, ki so lastni bakterijam in ne človeku, zato morajo biti antibiotiki selektivno toksični (2). Pogosto je selektivna toksičnost le relativna, kar pomeni, da je koncentracija antibiotika, ki ga gostitelj še vedno dobro prenaša, škodljiva za mikroorganizme, večje koncentracije pa bi povzročile škodo tudi gostitelju (3). Razlike med evkariontsko in prokariontsko celico so prikazane v preglednici I. Lastnosti, ki jih najpogosteje izkoriščamo za delovanje antibiotikov, so v odebeljenem tisku.

**Preglednica I: Razlike med prokariontsko in evkariontsko celico, povzeto po (4–9).**

CELIČNE LASTNOSTI/ KOMPONENTE/PROCESI	PROKARIONTI	EVKARIONTI
velikost	0,5–8 $\mu\text{m}$	10–100 $\mu\text{m}$
<b>celična stena</b>	<b>je prisotna, glavna sestavina je peptidoglikan</b>	<b>če je prisotna, je iz celuloze ali hitina (človeška celica nima celične stene)</b>
membranski celični organeli	večinoma niso prisotni	so prisotni
<b>ribosomi</b>	<b>70S (50S/30S)</b>	<b>80S (60S/40S)</b>
jedro	ni jedra	jedro z membrano
dedni zapis	ena krožna DNA + plazmidi	več linearnih molekul DNA, stabiliziranih z bazičnimi proteini + izvenkromosomska DNA v mitohondrijih
delitev	cepitev (ni sodelovanja delitvenega vretena)	mitotska ali mejotska delitev (s sodelovanjem delitvenega vretena)
<b>topoizomeraze IIa</b>	<b>DNA giraza, topo IV</b>	<b>topo II</b>
<b>izvor dihidrofolne kisline</b>	<b>lastna sinteza</b>	<b>hrana</b>

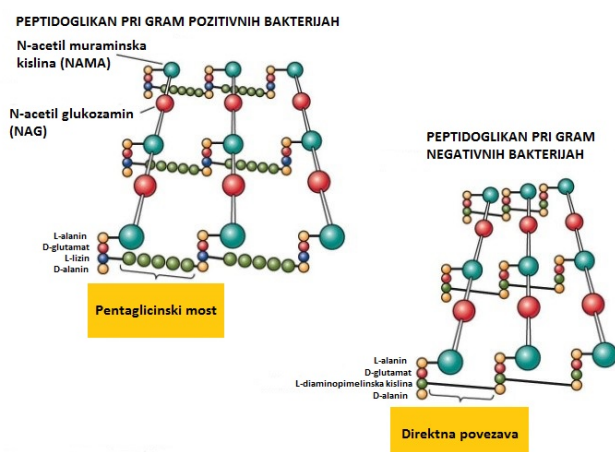
Na podlagi teh razlik antibiotike razdelimo v pet osnovnih skupin, ki se med seboj razlikujejo po mehanizmu delovanja (2, 3):

1. zaviranje presnove (antimetaboliti): sulfonamidi in diaminopirimidini,
2. zaviranje prepisovanja, podvajanja in zvijanja DNA: kinoloni, rifampicin,
3. interakcije s celično membrano: polimiksini,
4. zaviranje sinteze bakterijskih proteinov: tetraciklini, aminoglikozidi, kloramfenikol, makrolidi, linkozamidi, oksazolidindioni,
5. zaviranje sinteze bakterijske celične stene: glikopeptidi,  $\beta$ -laktami.

## 1.3 ZAVIRANJE SINTEZE BAKTERIJSKE CELIČNE STENE

### 1.3.1 Celična stena: vloga, zgradba, sinteza

Prisotnost celične stene je ena od glavnih razlik med bakterijsko in človeško celico, zato njena sinteza predstavlja odlično tarčo za delovanje antibiotikov. Celična stena ima pri večini bakterij tri vloge. Prva je, da tvori pregrado med notranjostjo celice in zunanjim svetom in jo tako ščiti pred škodljivimi vplivi. Druga vloga je zagotavljanje oblike celice in tretja preprečevanje raztrganja celične membrane zaradi visokega osmotskega tlaka v notranjosti celice (3, 10).

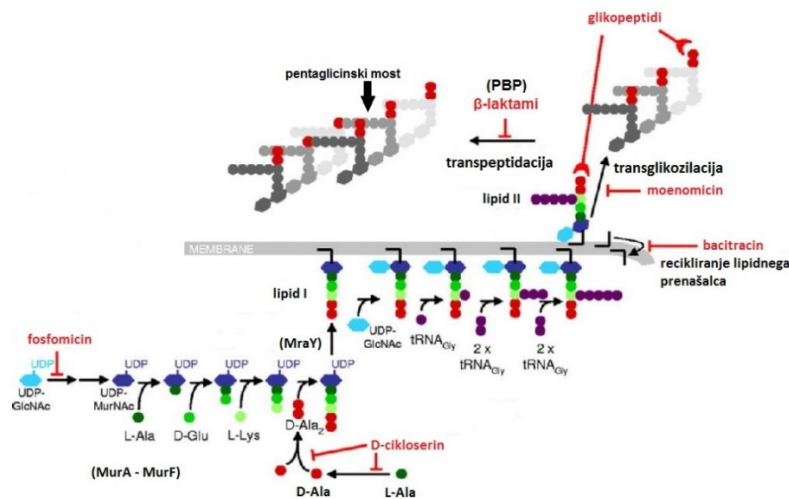


Slika 1: Shematski prikaz dveh tipov peptidoglikanske mreže, povzeto po (11).

Peptidoglikan je sestavljen iz glikanskih verig, kjer se izmenjujeta *N*-acetil glukozamin (NAG) in *N*-acetil muraminska kislina (NAMA). Na vsako molekulo NAMA je pripet tetrapeptid (L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala), preko katerega so glikanske verige med seboj prečno premrežene (lahko s pentaglicinskim mostom ali pa direktno, kot je prikazano na sliki 1) (3, 10, 11).

Sintezo peptidoglikana v bakterijski citoplazmi prične šest encimov Mur (MurA do MurF) (slika 2). Encima MurA in MurB katalizirata nastanek UDP-MurNAc iz prekursorja UDP-GlcNAc. Encimi MurC, MurD, MurE in MurF katalizirajo pripenjanje petih aminokislin na UDP-MurNAc. Ta molekula se s pomočjo membranskega proteina MraY poveže z membranskim fosfolipidom. Nastala molekula se imenuje Lipid I. *N*-acetilglukozaminiltransferaza MurG katalizira pripenjanje UDP-GlcNAc na lipid I. Nastala molekula, lipid II, je disaharidni prekursor za biosintezo peptidoglikana in substrat za PBP. Lipid II s pomočjo flipaze preide na zunanjo stran membrane, kjer PBP katalizirajo polimerizacijo in prečno premreženje (12).

Pomemben del celične stene predstavlja mureinska (peptidoglikanska) mreža. Glede na delež peptidoglikana v celični steni delimo bakterije na po Gramu pozitivne – G<sup>+</sup> (do sto plasti peptidoglikana) in po Gramu negativne – G<sup>-</sup> (ena ali dve plasti peptidoglikana). Zaradi razlike v količini in sestavi peptidoglikana so G<sup>+</sup> in G<sup>-</sup> bakterije različno občutljive na različne



**Slika 2: Sinteza peptidoglikana in mesta delovanja nekaterih antibiotikov, ki zavirajo sintezo celične stene, povzeto po (13).**

### 1.3.2 Penicilin vezoči proteini

Penicilin vezoči proteini so encimi, ki se nahajajo na zunanji površini celične membrane in so potrebni za izgradnjo peptidoglikana. Večina bakterij vsebuje tri do osem PBP, vendar so za sintezo celične stene nujno potrebni največ štiri, lahko tudi manj (14). Že njihovo ime pove, da imajo v svoji strukturi domeno, ki izkazuje afiniteto do penicilina ( $\beta$ -laktamov).

Po velikosti lahko penicilin vezoče proteine razdelimo v dve glavni kategoriji: PBP z veliko molekulsko maso (HMM PBP – ang. high molecular mass PBP) in PBP z majhno molekulsko maso (LMM PBP – ang. low molecular mass PBP). PBP z veliko molekulsko maso so multimodularni in so odgovorni za polimerizacijo peptidoglikana in vključitev novo nastajajoče verige v obstoječo celično steno. Glede na strukturo in reakcije, ki jih katalizirajo, jih lahko dodatno razdelimo na razred A in razred B. Razred A bifunkcionalnih PBP katalizira reakciji transpeptidacije (prečno premreženje verig) in transglikozilacije (polimerizacije peptidoglikanske verige). Transglikozilacija se lahko nadaljuje kljub blokiran domeni za transpeptidacijo (vzrok so lahko penicilini, mutacije ali delecija domene). Obratno pa inaktivacija transglikolazne domene (z mutacijo ali moenomycinom) popolnoma zaustavi polimerizacijo peptidoglikana. Razred B monofunkcionalnih PBP katalizira le transpeptidacijo. Bakterije nosijo zapis tudi za PBP, ki katalizirajo reakcijo karboksipeptidacije, kjer pride do hidrolize pentapeptidov v tetrapeptide, posledično pa je nadaljnje prečno premreženje peptidoglikanske verige preprečeno (10, 15). Transpeptidacija je podrobneje opisana v naslednjem poglavju.

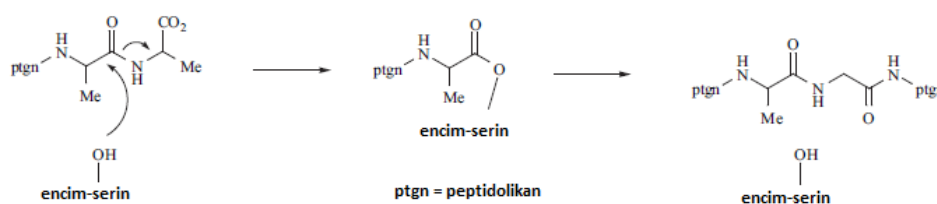


### 1.3.3 Zaviralci biosinteze celične stene

Zaviralce biosinteze celične stene glede na strukturo razdelimo na betalaktamske antibiotike in glikopeptide, poleg teh dveh podskupin pa imajo takšen mehanizem delovanja še nekateri drugi posamezni antibiotiki (na primer bacitracin) (14).

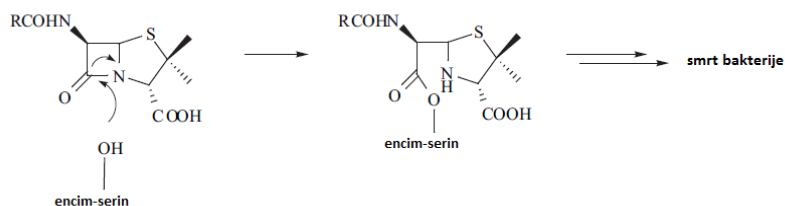
#### 1.3.3.1 Betalaktamski antibiotiki

Za tvorbo povezave med dvema vzporednima peptidoglikanskima verigama je odgovoren encim D-alanin-transpeptidaza, ki ga uvrščamo med penicilin vezoče proteine. Hitremu reverzibilnemu oblikovanju Henri-Michaelisovega kompleksa med encimom in pentapeptidom sledi napad proste OH skupine serina v aktivnem mestu na karbonilni ogljikov atom C-terminalne peptidne vezi D-Ala-D-Ala, kar vodi v oblikovanje intemediata acil-encim (slika 3). Pri tem se odcepi zadnji D-alanin v verigi pentapeptida (L-Ala-D-Glu-L-Lys-D-Ala-D-Ala) in tako dobimo tetrapeptid. Ko se pentaglicin (oziroma v določenih primerih kar pentapeptid) vzporedno potekajoče sladkorne verige dovolj približa, se med D-alaninom in zadnjim glicinom tvori amidna vez, serinska OH skupina v aktivnem mestu encima pa se sprostí – pride do hidrolize. (3, 10, 16, 17).



Slika 3: Shematski prikaz transpeptidacije, povzeto po (16).

Betalaktamski antibiotiki posnemajo strukturo substrata D-alanin transpeptidaze (dipeptid D-Ala-D-Ala), se kovalentno vežejo v aktivno mesto encima in ga ireverzibilno zavirajo (3, 17). Posledično peptidoglikan ne nastaja pravilno in celična stena ni zmožna opravljati svoje naloge, saj postane šibka in podvržena raztrganju, kar vodi v propad bakterije (slika 4) (8).



Slika 4: Shematski prikaz delovanja  $\beta$ -laktamov, povzeto po (16).

Med klasične  $\beta$ -laktame prištevamo peniciline in cefalosporine, med neklasične pa oksapeneme, karbapeneme, karbacefeme in monobaktame (16, 17).

- Penicilini

So derivati penama, kar pomeni, da je osnovni biciklični sistem sestavljen iz  $\beta$ -laktamskega obroča 2-oksoazetidina in prikondenziranega tiazolidina.  $\beta$ -laktamski obroč je bolj napet in zaradi tega bolj reaktiven, kot če bi imeli le monociklični sistem. Posledica takšne reaktivnosti pa ni le visoka aktivnost, ampak tudi hipersenzitivnost pri posameznikih z vrsto različnih manifestacij, od blagih alergijskih reakcij, kot je kožni izpuščaj (1–4 %), do anafilaktičnega šoka (pri 0,2 % pacientov). Penicilini delujejo predvsem na G+ bakterije, vendar lahko delovanje s sintezo ustreznih derivatov (različne acilne verige in substitucije  $\beta$ -laktamskega obroča) razširimo oziroma preusmerimo na G– bakterije (3, 17).

- Zaviralci  $\beta$ -laktamaz

Največjo oviro pri delovanju  $\beta$ -laktamov predstavlja sposobnost bakterije, da proizvaja družino encimov, imenovanih  $\beta$ -laktamaze. Ti encimi hidrolizirajo  $\beta$ -laktamski obroč, ki je nujen za zaviralno aktivnost in protibakterijsko delovanje (16). Po naravi so  $\beta$ -laktamaze podobne transpeptidazam. Glavna razlika je, da se  $\beta$ -laktamaze lahko znebijo hidroliziranega  $\beta$ -laktama iz aktivnega mesta, transpeptidaze pa tega niso zmožne. Med zaviralci  $\beta$ -laktamaz najpogostje uporabljamo klavulansko kislino, sulbaktam in tazobaktam. Antibiotična aktivnost samih zaviralcev  $\beta$ -laktamaz je zanemarljiva, vendar pa so zelo dobrodošli v kombinaciji s penicilini, neodpornimi na  $\beta$ -laktamaze, saj ireverzibilno zavirajo omenjeni encim in na ta način omogočijo delovanje beta-laktamskemu antibiotiku. Najbolj znana je kombinacija amoksicilina s klavulansko kislino.

- Cefalosporini

So derivati cefema, katerega biciklični sistem je soroden penamu, le da je na mestu tiazolidina 6-členski obroč z dvojno vezjo (3,6-dihidro-2*H*-1,3-tiazin). Delovanje je enako kot pri penicilinih (zaviranje transpeptidaze), strukturna podobnost se odraža tudi v podobnih lastnostih in slabostih. Zamenjava 5-členskega obroča s 6-členskim povzroči manjšo sterično napetost in večjo stabilnost  $\beta$ -laktamskega obroča, kar vodi do manjše reaktivnosti in tudi manjše možnosti za alergijsko reakcijo pri posameznikih v primerjavi s

penicilini. Cefalosporine ločimo po generacijah. Razlike med generacijami so predvsem v substituentih (na mestih 3 in 7) in posledično tudi v tarčnih mikroorganizmih (17).

- Karbapenemi

Glavna strukturna razlika v osnovnem skeletu med karbapenemi in penicilini je zamenjava žvepla z ogljikom (se pravi, da je 5-členski obroč 2-pirolin). Premer ogljikovega atoma je pol manjši od premera žveplovega atoma, zato je obroč v primerjavi s penicilini bolj napet, kar poleg dvojne vezi povzroči, da je betalaktamski obroč zelo nestabilen. Karbapenemi imajo zelo širok spekter delovanja in zavirajo delovanje številnih  $\beta$ -laktamaz, zato jih uporabljamo pri hujših bakterijskih infekcijah. Slabost nekaterih karbapenemov, kot sta na primer imipenem in tienamicin, pa je, da niso peroralno uporabni, kar jih omeji na bolnišnično uporabo (17).

- Monobaktami

Monobaktami so monociklični  $\beta$ -laktamski antibiotiki, za katere je značilna entiteta 2-oksoazetidin-1-sulfonska kislina. Spojine, ki se pojavljajo v naravi, običajno izkazujejo šibko protibakterijsko aktivnost, sintezni derivati pa so učinkoviti antibiotiki, katerih odpornost na  $\beta$ -laktamaze je enaka ali večja kot pri cefalosporinih tretje generacije (18). Odkritje monobaktamov je privedlo do spoznanja, da konformacijsko omejena biciklična struktura ni nujna za protibakterijsko aktivnost  $\beta$ -laktamov. Sintezni analogi, ki so jih začeli po tem odkritju pospešeno sintetizirati, so imeli širok spekter delovanja proti G<sup>-</sup> bakterijam, niso pa izkazovali aktivnosti proti G<sup>+</sup> bakterijam, kot je na primer *Staphylococcus aureus*. Aztreonam je bil prvi klinično uporaben monobaktam. Lahko ga uporabljamo pri ljudeh z alergijami na peniciline in cefalosporine. Je ozkospektralni (G<sup>-</sup>) in je odporen proti nekaterim betalaktamazam (3, 8, 16, 17).

Monobaktami imajo poleg antibiotičnega delovanja še druge aplikacije. Delujejo tudi kot zaviralci encimov, antituberkulotiki in zaviralci absorpcije holesterola (16, 19).

## 1.4 BAKTERIJSKA REZISTENCA

Dostop do prvih sistemskih antibiotikov (sulfonamidov in penicilina) splošni javnosti ni bil takoj omogočen, saj so bile te učinkovine takrat redke, drage in zato rezervirane predvsem za vojaško uporabo med drugo svetovno vojno. Z odkrivanjem novih antibiotikov so se proizvodni procesi poenostavili, razvili so nove formulacije in posledično je bil dostop do

antibiotikov močno olajšan, kar je privedlo do razširjene uporabe. Antibiotike so videli kot čudežna zdravila, uporabljali so jih za zdravljenje tudi najbolj običajnih in manj pomembnih tipov okužb, med drugim tudi tistih, ki niso bile bakterijske. Sir Alexander Fleming je že leta 1945 opozoril na neustrezno uporabo penicilina, ki bi lahko privedla do selekcije odpornih »mutiranih oblik« bakterije *Staphylococcus aureus*. O kliničnih primerih *S. aureus*, odpornega na penicilin, so poročali tri leta po začetku uporabe zdravila in že po prvem desetletju uporabe penicilina je bilo več kot 60 odstotkov bolnišničnih okužb s *S. aureus* rezistentnih. Stvari se do danes niso kaj prida izboljšale. Vsak dan je več poročil o razvoju odpornosti pri bakterijah, ki so bile prej občutljive na delovanje »običajnih« antibiotikov. Takšne bakterije so najprej povzročale nevarne bolnišnične okužbe in so bile razlog za veliko obolevnost in smrtnost pri hospitaliziranih pacientih, nedavno pa so se začele širiti tudi izven bolnišnic in povzročajo huda obolenja pri sicer zdravih in neizpostavljenih pacientih (1, 20).

O pojavu bakterijske rezistence govorimo, ko se bakterije spremenijo v takšni meri, da zaradi na novo pridobljenih lastnosti antibiotiki niso več učinkoviti. Bakterije imajo zelo dobro razvito sposobnost prilagajanja, saj so sposobne razviti različne mehanizme odpornosti na večino starih in tudi novejših antibiotikov (1, 20). Bakterije so lahko odporne proti enemu antibiotiku oziroma skupini antibiotikov ali pa proti več skupinam antibiotikov (večkratno odporne bakterije; ang. *multi-drug resistance* – MDR) (3).

Odpornost je lahko naravna (intrinzična) ali pridobljena. Intrinzična odpornost je odpornost, ki jo običajno najdemo pri celi bakterijski vrsti ali rodu. Je posledica normalnega (genetskega, strukturnega in fiziološkega) stanja organizma. Posamezne vrste oziroma rodovi bakterij so naravno odporni proti določenim antibiotikom iz dveh razlogov: 1.) ne vsebujejo ustrezne tarče ali 2.) celična stena s svojo značilno sestavo preprečuje določenim antibiotikom dostop do mesta delovanja. Pridobljena odpornost bakterij na antibiotike je značilna le za posamezne seve določene bakterijske vrste ali rodu. Razvije se lahko kot posledica mutacije na kromosomu ali plazmidu ali pa kot posledica pridobitve novega genskega materiala.

#### *Pridobljena odpornost kot posledica mutacije*

Spontane mutacije v (bakterijskih) celicah so sicer dokaj pogoste, še posebej zaradi hitrega razmnoževanja in napak v DNA, ki pri tem nastanejo, vendar jih popravljalni mehanizmi v večini primerov uspejo odpraviti. Naključne mutacije, ki nastanejo v odsotnosti antibiotika

in vodijo v odpornost, so tako veliko redkejši pojav kot mutacije, ki nastanejo kot posledica selekcijskega pritiska antibiotika. Mikroekološki pritisk, ki ga izvaja antibiotik, je močan stimulus, ki izzove prilagoditveni odgovor pri bakteriji in je najpogostejši razlog za bakterijsko odpornost na antibiotike (3, 20).

#### *Pridobljena odpornost kot posledica genetskega prenosa*

Bakterije si med sabo lahko izmenjujejo genetski material, med drugim tudi gene za odpornost, kar je precej pogost pojav. Obstajajo trije načini genetskega prenosa. Konjugacija poteka tako, da se dve bakteriji povežeta preko mostu iz pilusov, preko katerega si direktno izmenjata genetski material (običajno plazmide). Pri transdukciji prenos genetskega materiala poteka s pomočjo vektorja (bakteriofaga). Če genetski material, ki ga ti virusi privzamejo iz bakterijske celice, vsebuje informacijo o odpornosti, bo naslednja bakterijska celica, ki jo okužijo, postala odporna. Pri transformaciji pa gre za privzem prostih odsekov DNA, ki se nahajajo v neposredni bližini sprejemajoče bakterije, in njihovo vgraditev v bakteriji lastno DNA. Običajno ti odseki DNA izvirajo iz odmrlih bakterij v bližini. Lahko vključujejo zapise za različne lastnosti, med drugim tudi za odpornost na antibiotike (1, 3, 20).

### **1.4.1 Biološki mehanizmi odpornosti**

Do odpornosti pride šele, ko se prenesen ali mutiran gen izrazi in povzroči nastanek določenega biološkega učinka, ki privede do izgube aktivnosti antibiotika (20).

Poznamo pet osnovnih mehanizmov, na katerih temelji pridobljena odpornost na antibiotike (14, 20):

- Preprečevanje dostopa antibiotika do tarče: bakterijska celična stena se spremeni tako, da je njena propustnost zmanjšana.
- Aktivno črpanje antibiotika iz celice: mikroorganizem je sposoben razviti aktiven transport, ki črpa molekule antibiotika, ki so uspele prodreti v notranjost celice, v zunanji medij. Črpanje traja, vse dokler koncentracija v notranjosti celice ne pade pod vrednost, ko antibiotik nima več protibakterijske aktivnosti. Efluks črpalke se kot oblika odpornosti pojavlja predvsem pri tetraciklinih, makrolidih in tudi fluorokinolonih.
- Sprememba tarčnega mesta oziroma prijemališča antibiotika.

Bakterija spremeni znotrajcelično tarčo oziroma receptor za antibiotik, kar prepreči vezavo in posledično tudi kakršenkoli protibakterijski učinek. Spremembe v strukturi PBP pripeljejo do odpornosti na penicilin, spremembe v ribosomih privedejo do odpornosti na aminoglikozide, makrolide in tetracikline, spremembe DNA-giraze pa povzročijo odpornost na fluorokinolone.

- Encimska razgradnja ali modifikacija antibiotika

Bakterija proizvaja enega ali več encimov, ki kemično razgradijo ali modificirajo antibiotik in s tem postane neučinkovit. Najstarejši in tudi najbolj razširjen primer so  $\beta$ -laktamaze v primeru  $\beta$ -laktamov.

- Sprememba presnovne poti, na katero deluje antibiotik.

### **1.4.2 Odpornost na betalaktamske antibiotike**

Za odpornost na betalaktamske antibiotike sta pri G<sup>+</sup> bakterijah v veliki večini odgovorna le dva od zgoraj naštetih petih mehanizmov – sprememba tarčnega mesta (sprememba PBP) in razgradnja antibiotika (z  $\beta$ -laktamazami). Pri G<sup>-</sup> bakterijah sta poleg omenjenih mehanizmov za odpornost v manjši meri odgovorna še dva: zmanjšana propustnost zunanje membrane zaradi sprememb porinov in aktivno črpanje antibiotikov iz bakterijske celice (14).

#### Odpornost kot posledica prisotnosti $\beta$ -laktamaz

$\beta$ -laktamaze so encimi, ki hidrolizirajo  $\beta$ -laktamski obroč in s tem onemogočijo delovanje  $\beta$ -laktamskih antibiotikov, še preden ti pridejo v stik s PBP. Tvorba  $\beta$ -laktamaz je najpomembnejši mehanizem odpornosti pri G<sup>-</sup> bakterijah. Te izločajo  $\beta$ -laktamaze v periplazemski prostor (prostor med zunanjo in notranjo membrano) v majhnih količinah, vendar to vseeno predstavlja učinkovit mehanizem odpornosti proti tistim betalaktamskim antibiotikom, ki jih je mogoče zlahka in hitro hidrolizirati. Odpornost proti antibiotikom, pri katerih je hidroliza počasnejša, pa bakterije zagotovijo s povečano tvorbo encima ali oviranjem vstopa antibiotika v celico (prek sprememb porinov). Mutacije, ki se odražajo v zamenjavi posamezne aminokislina v bližini aktivnega mesta, povzročijo razvoj betalaktamaz z razširjenim spektrom delovanja (ESBL). Te poleg penicilinov in ozkospektralnih cefalosporinov hidrolizirajo tudi monobaktame in oksiminocefalosporine (14).

#### Odpornost kot posledica spremembe penicilin vezočih proteinov

Odpornost prek spremembe PBP se lahko razvije na dva različna načina, cilj je v obeh primerih enak: prisotnost PBP, ki imajo zmanjšano afiniteto do penicilinov. Prvi način temelji na nastanku novih PBP (na primer PBP2a pri *S. aureus*), drugi pa na spremembi že obstoječih PBP (na primer PBP5 pri *Enterococcus faecium*). Običajno pride pri odpornosti do sprememb PBP razreda B (redkeje razreda A). Sprememba PBP je pri G+ bakterijah zelo pomemben in pogost mehanizem odpornosti na betalaktamske antibiotike, medtem ko se pri G- bakterijah pojavlja redkeje (10, 14).

Organizmi, ki povzročajo veliko skrbi tako na področju bolnišničnih kot zunajbolnišničnih okužb, so na meticilin odporni in koagulazo negativni stafilokoki in MRSA. Vzrok številnim bolnišničnim okužbam, ki jih ni mogoče pozdraviti z večino trenutno odobrenih antibiotikov, so tudi večkratno odporne G- bakterije (21).

#### 1.4.2.1 MRSA in PBP2a

*S. aureus* je G+ kok. Najpogostejši vzrok odpornosti *S. aureus* na  $\beta$ -laktame je prisotnost penicilaz. Za absolutno odpornost MRSA na  $\beta$ -laktamske antibiotike pa je nujno potrebna pridobitev in ekspresija gena *mecA*. Ta gen nosi zapis za PBP2a – dodaten PBP iz razreda B, ki ima nizko občutljivost na  $\beta$ -laktame. Predvidevajo, da je bil gen *mecA* pridobljen prek horizontalnega prenosa iz na koagulazo negativne stafilokokne vrste, najverjetneje *Staphylococcus sciuri*. Zmanjšana občutljivost PBP2a na  $\beta$ -laktame je posledica zmanjšane tvorbe začetnega nekovalentnega kompleksa in zmanjšane acilacije (vrednost konstante je zmanjšana za kar tri velikostne razrede). Transpeptidazna domena PBP2a lahko gradi celično steno, ko so transpeptidazne domene drugih PBP blokirane z  $\beta$ -laktami. Okužba s *S. aureus* se lahko manifestira kot vrsta različnih bolezni vse od benignih kožnih infekcij (folikulitis, furunkuloza), do življenje ogrožajočih stanj (globoki absces, pljučnica, osteomielitis, sepsa, endokarditis). Heterogenost teh bolezni in sposobnost *S. aureus*, da razvije odpornost na protimikrobne učinkovine, kažeta na izredno zmogljivost prilagajanja na različna okolja (12, 22, 23).

#### 1.4.2.2 Nizkoafinitetni PBP pri enterokokih

Enterokoki so splošno gledano deset- do tisočkrat manj občutljivi na  $\beta$ -laktame kot streptokoki. Ta naravna odpornost je povezana s produkcijo PBP iz razreda B z nizko afiniteto do  $\beta$ -laktamov. V primeru *E. faecium* gre za PBP5fm. Ko so drugi PBP zavirani z antibiotiki, PBP5fm prevzame katalitično vlogo. Povečana produkcija PBP5fm je odgovorna za zmerno odpornost. Mutacije v sekvenci za PBP5fm pa lahko privedejo do

razvoja zelo odpornih sevov (12, 24, 25). Iz kristalne strukture kompleksa acil-encim med PBP5 in benzilpenicilinom so raziskovalci ugotovili, da se aktivno mesto razlikuje od aktivnih mest drugih PBP s poznano strukturo. Peptidna zanka, ki tvori eno stran aktivnega mesta, je bolj rigidna, kot so zanke občutljivih PBP, in kaže strukturne podobnosti z nizkoafinitetnim PBP2a v sevih MRSA. V aktivnem mestu PBP5 *E. faecium* se nahaja tudi hidrofobni valin, za katerega domnevajo, da zmanjša dostopnost  $\beta$ -laktamom do aktivnega mesta (26).

## **1.5 BOJ PROTI ODPORNOSTI IN RAZVOJ NOVIH ANTIBIOTIKOV**

Sanje znanstvenikov iz dvajsetega stoletja, da bi v prihodnosti izkoreninili večino najpogostejših kužnih bolezni, se najverjetneje ne bodo uresničile. Nedavne izkušnje s pojavom novih nalezljivih bolezni (AIDS, SARS, ipd.) in epidemiološki trendi bakterijske odpornosti kažejo celo obratno – stanje se bo verjetno slabšalo, vedno več bo novih nalezljivih bolezni, vedno več bakterij bo razvilo odpornost na več razredov antibiotikov hkrati in delež teh bakterij se bo še naprej širil iz bolnišničnega okolja med zdravo populacijo. Rezultat bo še večja obolevnost, umrljivost, večji stroški in manjšanje števila uporabnih antibiotikov za zdravljenje okužb. Dobro poznavanje razvoja bakterijske odpornosti je pogoj za razvoj novih strategij boja proti problematičnim mikroorganizmom (20).

Odpornost skušamo reševati na dva načina. Prvi način je preprečevanje oziroma omejevanje pojava odpornosti (z zmanjšanjem celotne uporabe antibiotikov v zdravstvu in prehranski industriji – živinoreji, s predpisovanjem ozkospektralnih antibiotikov in z ugotavljanjem, ali je antibiotik sploh potreben) in s tem podaljšanje časovnega obdobja, ko je antibiotik visoko učinkovit (1). Če se bo bakterijska odpornost še naprej širila, se lahko zgodi, da bo veliko naprednih kirurških posegov, ki jih poznamo danes, postalo preveč tveganih za izvajanje zaradi prevelike možnosti okužbe med samim posegom. Tudi določene »stare« bolezni (na primer tuberkuloza in gonoreja), za katere smo mislili, da smo se jih znebili, se že vračajo (3). Toda pojav odpornosti po določenem času je v večini primerov neizbežen, zato je nujen tudi drugi ukrep: razvoj novih antibiotikov, ki bi nadomestili stare (1, 26).



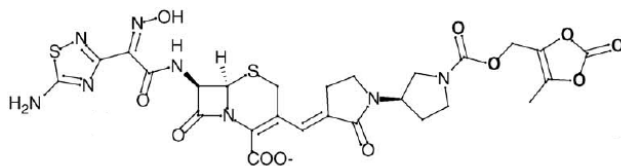
Eden od pristopov, kako odkriti nove antibiotike, je načrtovanje in sinteza novih razredov antibiotikov (z do sedaj nepoznanimi strukturami in/ali drugačnimi mehanizmi delovanja). Akademске in manjše biotehnične skupine se ukvarjajo z iskanjem zaviralcev transpeptidacije, ki po kemijski strukturi ne posnemajo  $\beta$ -laktamov in je zato malo verjetno, da bi povzročili pojav navzkrižne odpornosti, in iskanjem zaviralcev transglikozilazne domene PBP, ki je za večino bakterij življenjskega pomena. Novejši pristopi razvoja antibiotikov vključujejo identifikacijo zaviralcev, ki delujejo na predhodno neraziskane esencialne bakterijske tarče, kot so na primer peptidna deformilaza ali določene presnovne poti (biosinteza maščobnih kislin) (12, 21, 26).

Drug pristop k odkrivanju novih antibiotikov je kontinuirano spreminjanje obstoječih razredov predhodno učinkovitih antibiotikov. Za zdravljenje okužb z večkratno odpornimi patogeni so trenutno v razvoju novi fluorokinoloni, aminoglikozidi, tetraciklini in  $\beta$ -laktami. Zaradi hitre razširitve hidrolitične sposobnosti na več kot tisoč različic  $\beta$ -laktamaz s širokospektralno aktivnostjo je žal postala učinkovitost  $\beta$ -laktamov močno ogrožena. Kot odgovor raziskovalci razvijajo nove  $\beta$ -laktame in zaviralce  $\beta$ -laktamaz, ki so sočasno odporni na hidrolitično aktivnost več različnih  $\beta$ -laktamaz, ki se lahko pojavijo v enem samem bakterijskem sevu (21).

### 1.5.1 Ceftobiprol

Ceftobiprol medokaril (slika 5) je eden redkih  $\beta$ -laktamov v zadnjih letih, ki je prišel na tržišče. Je širokospektralni cefalosporin pete generacije, njegova *in vitro* aktivnost zajema delovanje proti širokemu spektru  $G^+$  in  $G^-$  patogenih bakterij. Poleg običajnih organizmov, ki so občutljivi na delovanje cefalosporinov, ceftobiprol izkazuje aktivnost tudi pri na meticilin odpornih stafilokokih (MRSA, na meticilin odporen *Staphylococcus Epidermidis*,... ), VRSA, na penicilin odporen *Streptococcus pneumoniae* (PRSP) in celo za *Enterococcus faecalis*, je pa splošno neaktiven proti *E. faecium* (27, 28). Aktivnost ceftobiprola proti  $G^+$  kokom lahko pripišemo enako močnemu zaviranju na penicilin občutljivih PBP in na  $\beta$ -laktame odpornih PBP (npr. PBP2a). Ceftobiprol hitro reagira s svojo tarčo in tvori stabilen inhibitorski kompleks (prek multiplih interakcij s proteinom). Ravno tako tudi z mutiranimi proteini tvori dolgo obstojne komplekse. Zaenkrat niso opazili razvoja stabilne rezistence. Ceftobiprol je relativno stabilen proti  $\beta$ -laktamazam razreda C, je pa, tako kot mnogi cefalosporini, občutljiv na delovanje cefalosporinaz razreda A,  $\beta$ -laktamaz razširjenega spektra (ESBL) in metalo- $\beta$ -laktamaz razreda B.

Dokazali so, da je ceftobiprol statistično enakovreden vankomicinu (93,3 % pacientov, zdravljenih s ceftobiprolom, je klinično ozdravelo, 93,5 % pa z vankomicinom). Neželeni učinki so bili primerljivi med skupinama (29, 30).



Slika 5: Ceftobiprol medokaril (29).

### 1.5.2 Ostali cefalosporini in karbapenemi v razvoju

Poleg ceftobiprola so se in se še vedno razvijajo tudi drugi  $\beta$ -laktami (preglednica II). Cefalosporin ceftarolin pokriva podoben spekter mikroorganizmov kot ceftobiprol, je pa podvržen inaktivaciji z  $\beta$ -laktamazami razreda C. Karbapenem RO4908643 ima močnejšo zaviralno aktivnost na PBP2a kot oba omenjena cefalosporina in ima tudi močnejšo *in vitro* aktivnost proti MRSA. Cefalosporin LB11058 ima močno aktivnost proti MRSA, vendar pa pokriva manjši spekter G<sup>-</sup> patogenov (29, 31).

**Preglednica II: Novi cefalosporini in karbapenemi v razvoju, povzeto po (29, 31, 32).**

ceftarolin (oziroma PPI0903)	
RO4908643 (oziroma CS-023)	
LB11058	

### 1.5.3 Nove kombinacije $\beta$ -laktamov in zaviralcev $\beta$ -laktamaz

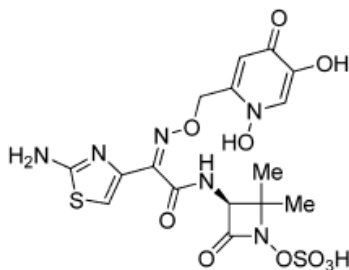
Kombinacije  $\beta$ -laktamov z  $\beta$ -laktamaznimi zaviralci uspešno uporabljamo pri zdravljenju okužb z organizmi, ki so razvili odpornost zaradi proizvodnje  $\beta$ -laktamaz. Prva vpeljana kombinacija je vključevala klavulansko kislino, sledile pa so še kombinacije s sulbaktamom in tazobaktamom. Zaradi pojava velikega števila različnih  $\beta$ -laktamaz so te prvotne kombinacije postale neučinkovite.

NXL104 je nov biciklični nebetalaktamski zaviralec  $\beta$ -laktamaz. V kombinaciji s ceftarolinom izkazuje učinkovitost proti tistim mikroorganizmom iz družine Enterobacteriaceae, ki ne proizvajajo večjih količin omenjenih encimov. Hkrati pa ima ta kombinacija, zaradi učinkovitosti ceftarolina proti MRSA, potencialno dobro klinično vrednost tako proti G<sup>+</sup> kot G<sup>-</sup> patogenom (21). V študijah je tudi kombinacija ceftarolina in avibaktama (CAZ104) – kombinacija  $\beta$ -laktamaznega zaviralca in cefalosporina. Zgodnji rezultati kažejo na učinkovito *in vitro* delovanje proti MRSA in mikroorganizmom iz družine Enterobacteriaceae (33).

#### 1.5.4 Razvoj novih monobaktamov

Monobaktami so zaradi svojega pretežno G<sup>-</sup> spektra delovanja in enostavne strukture v današnji dobi še vedno privlačni za razvoj, predvsem zaradi okužb, ki jih povzročajo večkratno odporni G<sup>-</sup> patogeni. Sinteza monobaktamov je v primerjavi s sintezo drugih  $\beta$ -laktamov enostavnejša, zato se ti v zadnjih letih ponovno obujajo (16).

Eden izmed najpomembnejših novejših monobaktamov je sideroforni monosulfaktam BAL30072 (slika 6). Deluje po principu »trojanskega konja« – za vstop v celico izkoristi sistem za privzem železa, nato pa se veže na esencialne encime za sintezo celične stene in povzroči celično smrt. Značilen je širok spekter delovanja proti G<sup>-</sup> bakterijam (21).



Slika 6: BAL30072 (21).

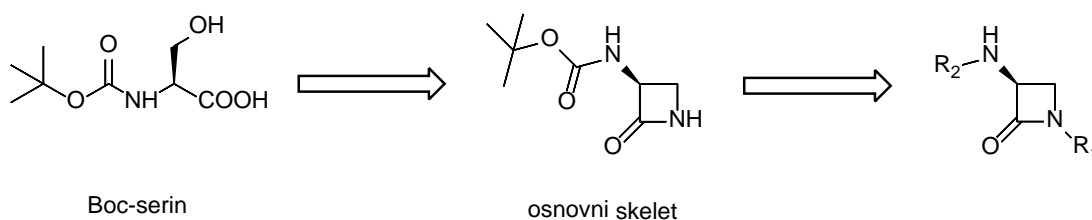
## 2 NAMEN IN NAČRT DELA

Namen magistrske naloge je sintetizirati disubstituirane derivate azetidin-2-ona (slika 7) in ovrednotiti jakost zaviranja penicilin vezočih proteinov (PBP). Pri načrtovanju derivatov azetidin-2-ona bomo kot osnovo uporabili strukturo ceftobiprola, cefalosporina pete generacije, ki dokazano deluje na številne odporne seve.

Prvi del magistrskega dela bo namenjen tristopenjski sintezi osnovnega skeleta (*tert*-butil (2-oksoazetidin-1-il)karbamata) (slika 7). Drugi del pa bo zajemal sintezo končnih spojin – disubstituiranih derivatov (preglednica III) in optimizacijo posameznih stopenj. Namen optimizacije bo skrajšati čas poteka reakcije in doseči čim večji izkoristek.

Primarno se bomo osredotočili na sintezo derivatov 3-(2-oksoazetidin-1-il)propanojske kisline, poleg tega pa bomo poizkušali sintetizirati tudi derivate butanojske in akrilne kisline. Na ta način bomo lahko ovrednotili vpliv dolžine verige na zaviralno delovanje na PBP.

Sintetizirane spojine bodo biokemijsko ovrednotene – njihovo zaviralno delovanje bo testirano na PBP iz rezistentnih in nerezistentnih sevov.



Slika 7: Shematski prikaz načrta dela

Preglednica III: Načrtovane strukture končnih spojin

R <sub>1</sub>			
R <sub>2</sub>			

## 3 MATERIALI IN METODE

### 3.1 MATERIALI

#### 3.1.1 Reagenti in topila

Pri delu v laboratoriju smo uporabljali reagente in topila različnih proizvajalcev: Acros Organics, Carlo Erba, Fluka, Janssen, Merck, Panreac in Sigma-Aldrich.

Uporabli smo naslednje reagente: *O*-benzilhidroksilamonijev klorid, DCC, HOBt, Et<sub>3</sub>N, nasičena raztopina citronske kisline, nasičena raztopina NaHCO<sub>3</sub>, nasičena raztopina NaCl, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, PPh<sub>3</sub>, DEAD, Raney-Ni, TBAB, K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, Cs<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, NaI, 18-krona-6, etil 3-bromopropionat, metil 2-(bromometil)akrilat, metil, 2-bromobutanoat, 4M HCl, CF<sub>3</sub>COOH, NMM, TBTU, 2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)ocetna kislina, 5-klorotiofen-2-karboksilna kislina, 1M NaOH, 1M LiOH.

Topila, ki smo jih uporabljali pri sintezi in izolaciji: DMF, diklorometan, etilacetat, *n*-heksan, metanol, acetonitril, dietileter, petroleter, očetna kislina.

#### 3.1.2 Laboratorijska oprema

- Tehnica: Mettler Toledo PB403-S,
- rotavapor: Buchi rotavapor R114,
- magnetno mešalo z grelnikom: IKA RTC basic,
- UV svetilka: CAMAG UV Cabinet II,
- grelna pištola: SKIL 8000,
- sušilnik: instrumentaria ZAGREB sterimatic ST11.

#### 3.1.3 Programska podpora za risanje in poimenovanje spojin

Za risanje in poimenovanje struktur spojin ter risanje shem reakcij smo uporabili računalniški program ChemBioDraw Ultra 13.0, ki spada v programski sklop ChemBioOffice 2012 (proizvajalec je CambridgeSoft).

## 3.2 METODE

### 3.2.1 Kromatografske metode

- Tankoplastna kromatografija

Za izvedbo tankoplastne kromatografije smo uporabljali plošče Silica gel 60 F254 z 0,22 mm debelim nanosom silikagela z dodanim fluorescenčnim indikatorjem na aluminijskem nosilcu proizvajalca Merck. Kot mobilno fazo smo uporabljali različne kombinacije topil, ki so nam bila na voljo. Spojine na kromatografskih ploščicah smo detektirali s pomočjo UV svetilke (valovna dolžina svetlobe  $\lambda = 254$  nm) in orositvenih reagentov. Najpogosteje smo uporabljali orositveni reagent z ninhidrinom, s katerim detektiramo amine in karbamate, po segrevanju z grelno pištolo pa tudi amide. Uporabljali smo tudi bromkrezolovo zeleno in fosfomolibdat.

- Kolonska kromatografija

S kolonsko kromatografijo smo čistili spojine v steklenih kolonah različnih velikosti. Uporabljali smo različne mobilne faze (glej spodaj). Za stacionarno fazo smo uporabljali Silikagel 60 s premerom delcev 0,04–0,063 mm (»flash« silikagel) proizvajalca Merck. Pri pripravi kolon smo uporabljali tudi vato (Tosama) in pesek (Sigma-Aldrich).

- Mobilne faze

Pri tankoplastni in kolonski kromatografiji smo uporabljali naslednje mobilne faze:

EtOAc : *n*-heksan = 9 : 1 / 2:1 / 1 : 1

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 30 : 1 / 20:1 / 19:1 / 9:1 / 5:1

CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : eter : MeOH = 5 : 5 : 1

EtOAc : MeOH = 3 : 2 + 1 % očetne kisline

### 3.2.2 Spektroskopske metode

- Jedrska magnetna resonanca

<sup>1</sup>H-NMR in <sup>13</sup>C-NMR spektre smo posneli na Bruker Avance III 400 MHz spektrometru na Fakulteti za farmacijo. Za snemanje smo uporabili naslednja devterirana topila: CDCl<sub>3</sub>, DMSO-d<sub>6</sub>. Topila so vsebovala TMS kot interni standard. NMR spektre smo analizirali z računalniškim programom MestRe-C 4.8.6.0 proizvajalca Mestrelab Research S.L.

Na spektrih smo asignirali naslednje signale: d – dublet, dd – dublet dubleta, ddd – dublet dublet dubleta, m – multiplet, q – kvartet, qd – kvartet dubleta, rs – razširjeni singlet, s – singlet, t – triplet.

- Masna spektroskopija

Masne spektre spojin smo posneli na masnem spektrometru Q-TOF Premier proizvajalca Micromass z ESI in HR-MS tehniko v Centru za masno spektrometrijo na Inštitutu Jožef Štefan v Ljubljani.

### **3.2.3 Določanje temperature tališča**

Temperature tališč smo določali s Kofflerjevim mikroskopom z ogrevalno mizico proizvajalca Leica.

### **3.2.4 Biokemijsko vrednotenje spojin na PBP-jih iz rezistentnih sevov**

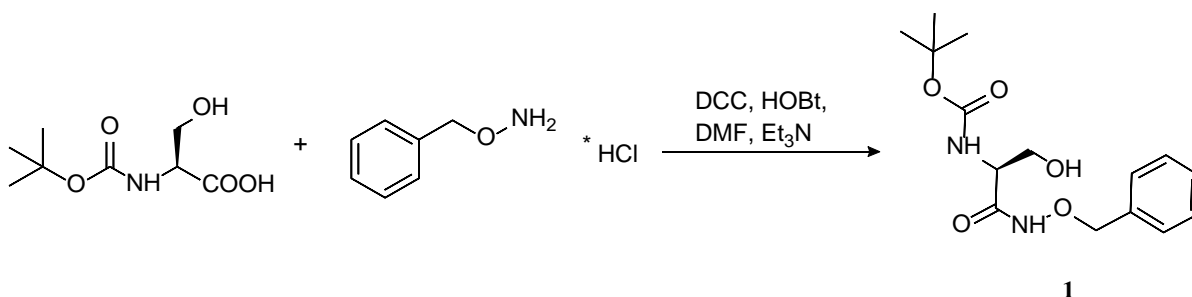
Končne spojine so biokemijsko ovrednotili v Centru za proteinski inženiring v Liegu (Belgija). Določitev rezidualnih aktivnosti (RA) so raziskovalci opravili po naslednjem postopku: očiščen PBP z znano koncentracijo (2,5  $\mu\text{M}$ ) so najprej štiri ure inkubirali pri 30 °C z 1 mM raztopino potencialnega zaviralca (testirane spojine) v 100 mM fosfatnem pufru s pH= 7 in dodanim 0,01 % Triton X-100. Sledil je dodatek 25  $\mu\text{M}$  Bocillina (s fluoresceinom označeni penicilin) za detekcijo rezidualne penicilin vezavne aktivnosti (RA). Tako pripravljene vzorce so inkubirali pri 37 °C za 30 min v končnem volumnu 20  $\mu\text{L}$ . Po dodatku denaturacijskega pufra (0,1 M Tris/HCl, pH = 6,8, s 25 % glicerola, 2 % SDS, 20 %  $\beta$ -merkaptetanola in 0,02 % bromofenol modrega) so vzorec segrevali eno minuto pri 100 °C. Z ohlajenimi vzorci, ki so jih nanесли na 10-odstotni SDS-akriamidni gel (10 x 7 cm), so izvedli elektroforezo (45 minut pri 180 V in 12 mA). Za določitev rezidualnih aktivnosti (RA) so uporabili opremo Molecular Image FX in programsko opremo Quantity One (BioRad, Hercules, CA, USA).

## 4 EKSPERIMENTALNO DELO

### 4.1 SINTEZA OSNOVNE SPOJINE

#### 4.1.1 Sinteza *tert*-butil (1-((benziloksi)amino)-3-hidroksi-1-oksopropan-2-il)karbamata (spojine **1**)

Reakcija:



Slika 8: Reakcijska shema sinteze spojine **1**

Sintezni postopek:

V suho bučko smo natehtali Boc-*L*-serin (28,72 g, 0,14 mol) in ga raztopili v DMF (250 ml). Nato smo dodali *O*-benzilhidrosilamin v obliki klorida (25,95 g, 1,15 ekv. – 0,161 mol) in trietilamin (42,92 ml, 2,2 ekv. – 0,308 mol). Bučko smo nato postavili na ledeno kopel ter dodali HOBt (18,91 g, 1 ekv. – 0,14 mol) in *N,N*-dicikloheksilkarbodiimid (34,65 g, 1,2 ekv. – 0,168 mol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati na magnetnem mešalu čez noč pri sobni temperaturi.

Postopek izolacije:

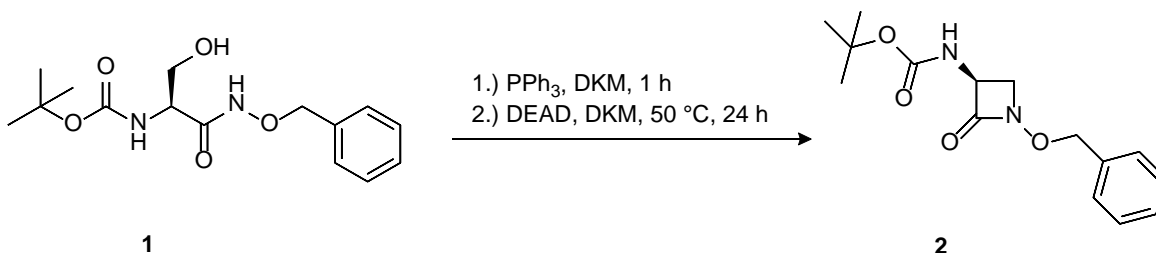
Reakcijski zmesi smo odparili DMF (3 h, 47 °C, 0 bar) in dobljeno gosto zmes resuspendirali v diklorometanu (200 ml). Oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem, dvakrat sprali s 100 ml diklorometana in zavrgli. Sledila je ekstrakcija matičnice – organske faze s citronsko kislino (1x 150 ml, 2x 100 ml), prečiščeno vodo (1x 100 ml), nasičeno raztopino NaHCO<sub>3</sub> (2x 100 ml) in nasičeno raztopino NaCl (1x 100 ml). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, sušilno sredstvo odfiltrirali, organski fazi odparili diklorometan pod znižanim tlakom in preostanek redispergirali v etilacetatu. Izpadlo oborino smo odfiltrirali z odsesavanjem.



IUPAC ime	<i>tert</i> -butil ( <i>S</i> )-(1-((benziloksi)amino)-3-hidroksi-1-oksopropan-2-il)karbamat
Videz	beli kristali
Izkoristek reakcije	64,6 %
MF	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH = 5:1
R <sub>f</sub>	0,59
T <sub>tal</sub>	128–130 °C (lit. (34): 130–131 °C)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ=1,41 (s, 9H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 3,32 (rs, 1 H, OH), 3,59 (dd, <i>J</i> <sub>1</sub> = 10,0 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 4,8 Hz, 1 H, CH <sub>2</sub> OH), 3,98-4,06 (m, 2 H, 1 H od CH <sub>2</sub> OH, 1 H od CH), 4,89 (s, 2 H, OCH <sub>2</sub> Ar), 5,59 (d, <i>J</i> = 7,2 Hz, 1 H, NHCOO), 7,34-7,38 (m, 5 H, Ar-H), 9,49 (s, 1 H, NHO) ppm.

#### 4.1.2 Sinteza *tert*-butil (1-(benziloksi)-2-oksoazetidin-3-il)karbamata (spojine 2)

Reakcija:



Slika 9: Reakcijska shema sinteze spojine 2

Sintezni postopek:

V bučko smo natehtali spojino 1 (5,0 g, 16,1 mmol) in jo suspendirali v 120 ml diklorometana. Po dodatku trifenilfosfina (6,761 g, 1,6 ekv. – 25,8 mmol) smo zmes pustili mešati eno uro na magnetnem mešalu pri sobni temperaturi. Nato smo med preprihovanjem z argonom po kapljicah dodali dietil azodikarboksilat (11,08 ml, 1,5 ekv. – 24,2 mmol, 40-odstotna raztopina v toluenu), raztopljen v diklorometanu (50 ml). Zmes smo mešali 20 h pri 50 °C.

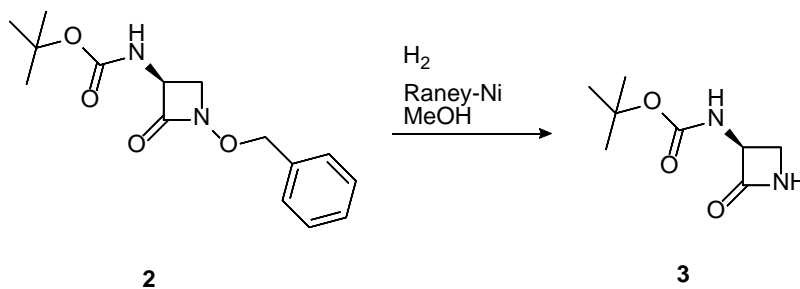
### Postopek izolacije:

Po končani reakciji smo zmesi odparili topilo pod znižanim tlakom in produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF(1) = EtOAc : *n*-heksan = 1 : 1, MF(2) = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 30 : 1).

IUPAC ime	<i>tert</i> -butil ( <i>S</i> )-(1-(benziloksi)-2-oksoazetidin-3-il)karbamat
Videz	bela amorfna snov
Izkoristek reakcije	40,5 %
MF	EtOAc : <i>n</i> -heksan = 1:1
R <sub>f</sub>	0,47
T <sub>tal</sub>	88–91 °C (lit. (34): 91,5–92,0 °C)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ= 1,42 (s, 9 H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 3,21 (dd, <i>J</i> <sub>1</sub> = 4,8 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2,0 Hz, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 3,51 (t, <i>J</i> = 4,0 Hz, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 4,53 (rs, 1 H, CH), 4,96 (s, 2 H, OCH <sub>2</sub> Ar), 7,38-7,40 (m, 5 H, Ar-H) ppm. 1H od NHCOO je izmenjan.

### 4.1.3 Sinteza *tert*-butil (2-oksoazetidin-3-il)karbamata (spojine **3**)

#### Reakcija:



**Slika 10: Reakcijska shema sinteze spojine **3****

#### Sintezni postopek:

V 500-mililitrsko z argonom prepihano bučko smo natehtali spojino **2** (5,284 g, 18,08 mmol) in jo raztopili v 300 ml metanola. K reakcijski zmesi smo dodali katalizator Raney-Ni v metanolu, ki smo ga pripravili tako, da smo vodno raztopino Raney-Ni odfiltrirali z odesavanjem in oborino (Raney-Ni) večkrat sprali z metanolom. V raztopino spojino **2** in

Raney-Ni v metanolu smo nato uvajali vodik in jo pustili mešati 24 h v vodikovi atmosferi. Naslednji dan smo katalizator odfiltrirali z odsesavanjem.

Postopek izolacije:

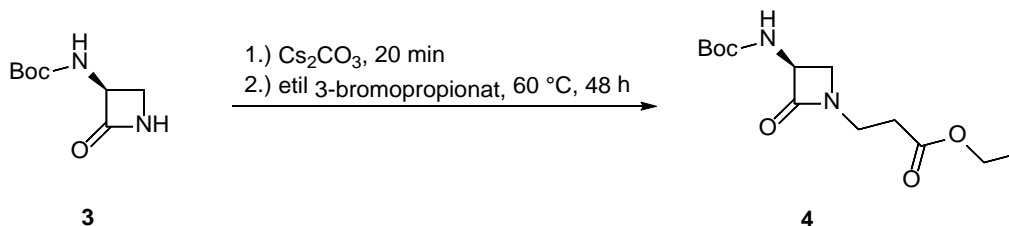
Dobljeni raztopini smo odparili topilo pod znižanim tlakom. Spojino **3** smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 19 : 1).

IUPAC ime	<i>tert</i> -butil ( <i>S</i> )-(2-oksoazetidin-3-il)karbamat
Videz	bela amorfna snov
Izkoristek reakcije	72,6 %
MF	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH = 19 : 1
Rf	0,13
T <sub>tal</sub>	171–174 °C (lit. (34): 173–175 °C)
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 1,44 (s, 9 H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 3,33 (dd, <i>J</i> <sub>1</sub> = 5,4 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2,6 Hz, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 3,61 (t, <i>J</i> = 5,2 Hz, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 4,83 (rs, 1 H, CH), 5,22 (d, <i>J</i> = 6,4 Hz, 1 H, NHCOO), 5,95 (s, 1 H, CH <sub>2</sub> NH) ppm.
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ = 28,23; 44,99; 58,91; 80,49; 154,86; 168,33 ppm.

## 4.2 SINTEZA 3-(3-(2-(2-AMINOTIAZOL-4-IL)-2-(METOKSIIMINO)ACETAMIDO)-2-OKSOAZETIDIN-1-IL)PROPANOATA (SPOJINE 7)

### 4.2.1 Sinteza etil 3-(3-((*tert*-butoksikarbonil)amino)-2-oksoazetidin-1-il)propanoata (spojine 4)

Reakcija:



Slika 11: Reakcijska shema sinteze spojine 4

Sintezni postopek:

V 100-mililitrsko z argonom preprihano bučko smo natehtali 1,117 g spojine **3** (6,0 mmol) in jo raztopili v acetonitrilu (70 ml), nato smo dodali še cezijev karbonat (2,36 g, 1,2 ekv. – 7,2 mmol). Zmes smo pustili mešati 20 min pri sobni temperaturi. Nato smo dodali etil 3-bromopropionat (812  $\mu$ l, 1,05 ekv. – 6,3 mmol) in zmes pustili mešati dva dni v argonovi atmosferi pri 60 °C.

Postopek izolacije:

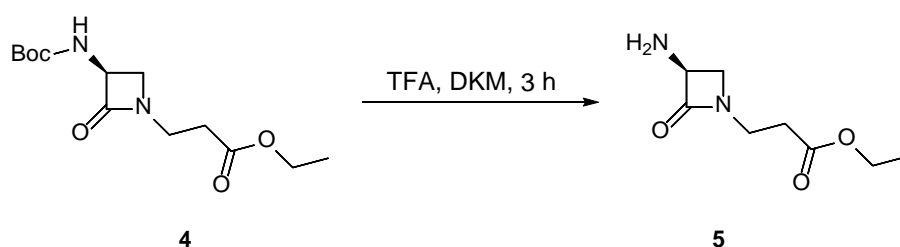
Po končani reakciji smo reakcijski zmesi odparili topilo pod znižanim tlakom. Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF(1) = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 19 : 1, MF(2) = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 9 : 1).

IUPAC ime	(S)-etil 3-(3-(( <i>tert</i> -butoksikarbonil)amino)-2-oksazetidin-1-il)propanoat
Videz	bela kristalinična snov
Izkoristek reakcije	26,4 %
MF	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH = 9 : 1
R <sub>f</sub>	0,56
T <sub>tal</sub>	100–104 °C

$^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta = 1,26$ (t, $J = 7,2$ Hz, 3 H, $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), $1,42$ (s, 9 H, $(\text{CH}_3)_3$ ), $2,57$ (t, $J = 6,6$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{COO}$ ) $3,25$ (dd, $J_1 = 5,6$ Hz, $J_2 = 2,4$ Hz, 1 H, $\text{CHCH}_2\text{N}$ ), $3,49\text{--}3,58$ (m, 3 H, 1 H od $\text{CHCH}_2\text{N}$ , 2 H od $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO}$ ), $4,15$ (q, $J = 7,2$ Hz, 2 H, $\text{CH}_2\text{CH}_3$ ), $4,75$ (rs, 1 H, CH), $5,16$ (d, $J = 6,4$ Hz, 1 H, NH) ppm.
$^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta = 14,12; 28,22; 32,78; 37,57; 49,59; 57,28; 60,93; 80,36; 154,81; 166,94; 171,26$ ppm.
IR	$3324, 2977, 1752, 1725, 1698, 1679, 1543, 1452, 1367, 1344, 1301, 1272, 1198, 1156, 1068, 1023, 977, 893, 847, 825, 796, 778, 727, 663, 641$ $\text{cm}^{-1}$ .
ESI-HRMS	Izračunano za $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_5$ (m/z): $287,1607$ $[\text{M}+\text{H}]^+$ Izmerjena vrednost (m/z): $287,1603$

#### 4.2.2 Sinteza etil 3-(3-amino-2-oksoazetidin-1-il)propanoata (spojine **5**)

Reakcija:



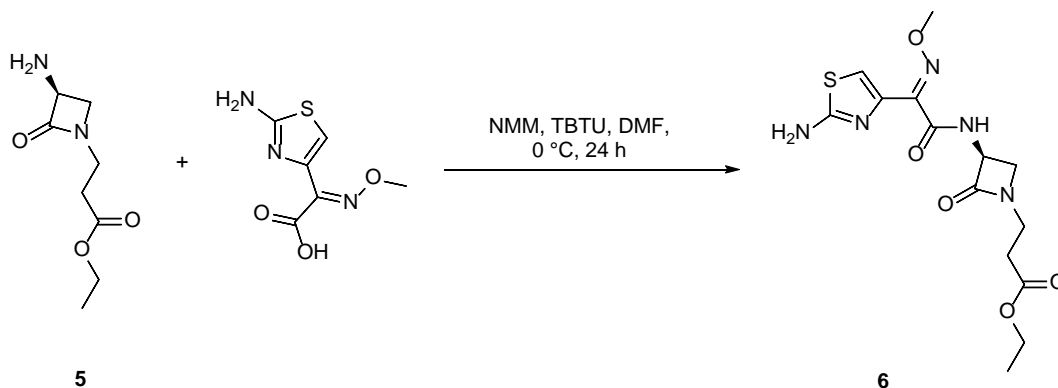
Slika 12: Reakcijska shema sinteze spojine **5**

Sintezni postopek:

Spojino **4** (150 mg, 0,524 mmol) smo raztopili v brezvodnem diklorometanu (10 ml) in dodali TFA (786  $\mu\text{l}$ , 20 ekv. – 10,48 mmol). Reakcijsko zmes smo pustili mešati 3 h pri sobni temperaturi, nato smo pod znižanim tlakom odparili diklorometan in trifluoroocetno kislino. Surovo spojino **5** smo takoj uporabili v naslednji stopnji.

### 4.2.3 Sinteza etil 3-(3-(2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)propanoata (spojine **6**)

Reakcija:



Slika 13: Reakcijska shema sinteze spojine **6**

Sintezni postopek:

Oljnati preostanek iz predhodnje stopnje smo raztopili v 5 ml brezvodnega DMF in dodali NMM (233  $\mu$ l, 4 ekv. – 2,1 mmol). V reakcijsko zmes, ki smo jo postavili na ledeno kopel, smo nato po kapljicah dodajali zmes z aktivirano kislino. Zmes smo pustili mešati na ledeni kopeli čez noč. Celoten postopek smo izvedli v argonovi atmosferi.

Aktivacija kisline: 2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)ocetno kislino (111 mg, 1,05 ekv. – 0,55 mmol) smo raztopili v 5 ml brezvodnega DMF, dodali NMM (128  $\mu$ l, 2,2 ekv. – 1,15 mmol), TBTU (199,42 mg, 1,15 ekv. – 0,60 mmol) in pustili mešati pri sobni temperaturi 1 h.

Postopek izolacije:

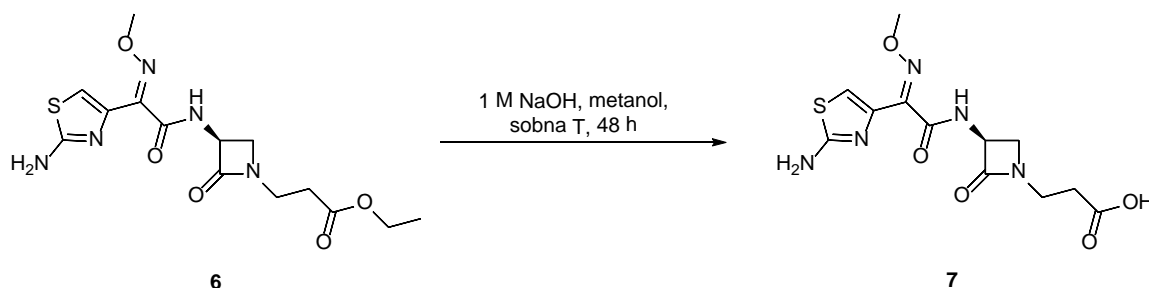
Pod znižanim tlakom smo odparili DMF, preostanek raztopili v diklorometanu (20 ml) in spirali z nasičeno raztopino NaCl (1x 10 ml). Organsko fazo smo sušili nad Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Diklorometan smo odparili pod znižanim tlakom. Spojino **6** smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF(1) = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 19 : 1, MF(2) = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 9 : 1) in jo izoborili s kombinacijo dietiletra in petroletra.

IUPAC ime	Etil ( <i>S,E</i> )-3-(3-(2-(2-animotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)propanoat
Videz	bela amorfna snov

Izkoristek reakcije	43 %
MF	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH = 9 : 1
Rf	0,27
T <sub>tal</sub>	80–83 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ= 1,21 (t, J= 7,2 Hz, 3 H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 2,59 (t, J= 6,6 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> COO) 3,44 (dd, J <sub>1</sub> = 5,6 Hz, J <sub>2</sub> = 2,4 Hz, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 3,50–3,62 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO), 3,72 (t, J= 5,4 Hz, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 3,93 (s, 3 H, OCH <sub>3</sub> ), 4,10 (q+q, J= 7,2 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 5,29–5,33 (m, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 5,99 (rs, 2 H, NH <sub>2</sub> ), 6,67 (s, 1 H, Ar-H), 8,76 (d, J= 8,4 Hz, 1 H, NH) ppm.
<sup>13</sup> C-NMR (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ= 14,12; 32,58; 37,81; 48,80; 55,54; 61,02; 63,15; 111,25; 146,13; 161,76; 167,02; 168,62; 171,23 ppm. Signal za kvarterni C je prešibak ali pa se je prekril z drugim signalom
IR	3297, 3202, 2978, 2938, 2822, 1730, 1662, 1533, 1375, 1294, 1240, 1184, 1026, 934, 901, 808, 716, 615 cm <sup>-1</sup> .
ESI-HRMS	Izračunano za C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S (m/z): 370,1185 [M+H] <sup>+</sup> Izmerjena vrednost (m/z): 370,1178

#### 4.2.4 Sinteza 3-(3-(2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)propanoata (spojine 7)

##### Reakcija:



Slika 14: Reakcijska shema sinteze spojine 7

##### Sintezni postopek:

102 mg spojine **6** (0,28 mmol) smo raztopili v 10 ml metanola, dodali 1 M NaOH (276 μl, 1 ekv. – 0,28 mmol) in pustili mešati pri sobni temperaturi 26 h.

Postopek izolacije:

Produkt smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : MeOH = 3 : 2 + 1 % očetne kisline). Očiščeno spojino **7** smo izoborili z acetonom. Oborino smo še dodatno sprali z acetonom in etrom.

IUPAC ime	(S,E)-3-(3-(2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamido)-2-oksoazetidin-1-il)propanojska kislina
Videz	bela amorfna snov
Izkoristek reakcije	38,2 %
MF	EtOAc : MeOH = 3 : 2 + 1 % očetne kisline
Rf	0,38
T <sub>tal</sub>	147–149 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ= 2,11 (t, J= 7,0 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> COOH) 3,16 (dd, J <sub>1</sub> = 5,2 Hz, J <sub>2</sub> = 2,4 Hz, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 3,27 (t, J= 7,2 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH), 3,53 (t, J= 4,0 Hz, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 3,82 (s, 3 H, CH <sub>3</sub> ), 4,85–4,89 (m, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 6,71 (s, 1 H, Ar-H), 7,24 (s, 2 H, NH <sub>2</sub> ), 9,20 (d, J= 8,0 Hz, 1 H, NH) ppm.
<sup>13</sup> C-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ= 30,64; 35,49; 47,07; 54,78; 61,93; 64,86; 109,11; 142,62; 149,18; 162,25; 165,65; 168,36; 175,41 ppm.
IR	3296, 3193, 2977, 2939, 1740, 1564, 1412, 1288, 1122, 1026, 938, 902, 657, 619 cm <sup>-1</sup> .
ESI-HRMS	Izračunano za C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> S (m/z): 340,0716 [M-H] <sup>-</sup> Izmerjena vrednost (m/z): 340,0707

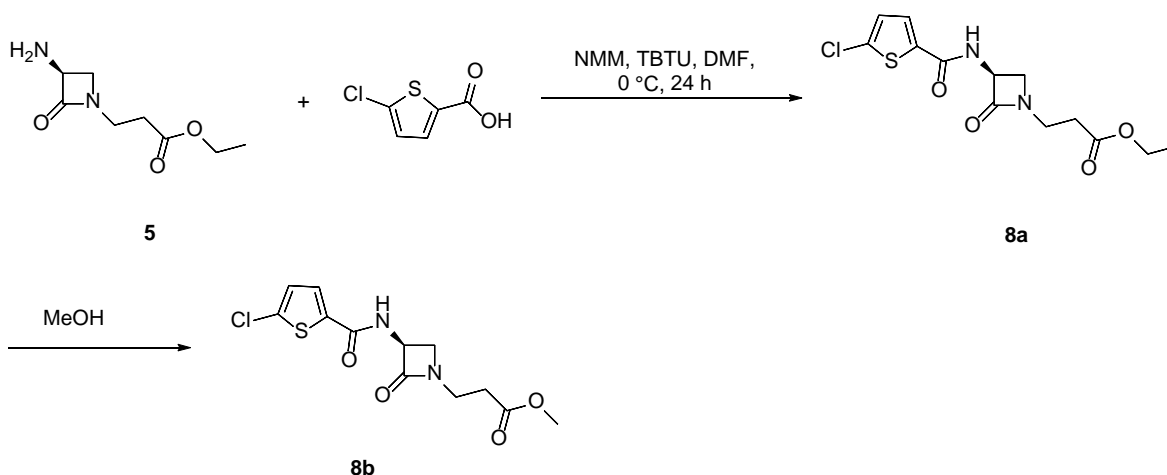


### 4.3 SINTEZA 3-(3-(5-KLOROTIOFEN-2-KARBOKSAMIDO)-2-OKSOAZETIDIN-1-IL)PROPANOJSKE KISLINE (SPOJINE 9)

Spojino **3** smo ponovno alikilirali s propanoatom in odstranili Boc zaščito z amino skupine. Postopke smo izvedli na enak način kot pri sintezi končne spojine **7**.

#### 4.3.1 Sinteza etil 3-(3-(5-klorotiofen-2-karboksamido)-2-oksoazetidin-1-il)propanoata (spojine 8)

Reakcija:



Slika 15: Reakcijska shema sinteze spojine **8**

Sintezni postopek:

Oljnati preostanek iz reakcijske zmesi pri sintezi spojine **5** smo raztopili v 5 ml brezvodnega DMF in dodali NMM (321  $\mu$ l, 4 ekv. – 2,89 mmol). V reakcijsko zmes smo nato na ledeni kopeli po kapljicah dodajali zmes z aktivirano kislino. Zmes smo pustili mešati na ledeni kopeli čez noč. Celoten postopek smo izvedli v argonovi atmosferi.

Aktivacija kisline: 5-klorotiofen-2-karboksilno kislino (125,9 mg, 1,05 ekv. – 0,759 mmol) smo raztopili v 5 ml brezvodnega DMF, dodali NMM (177  $\mu$ l, 2,2 ekv. – 1,59 mmol) in še TBTU (275 mg, 1,15 ekv. – 0,83 mmol) in pustili mešati pri sobni temperaturi 1,5 h.

Postopek izolacije:

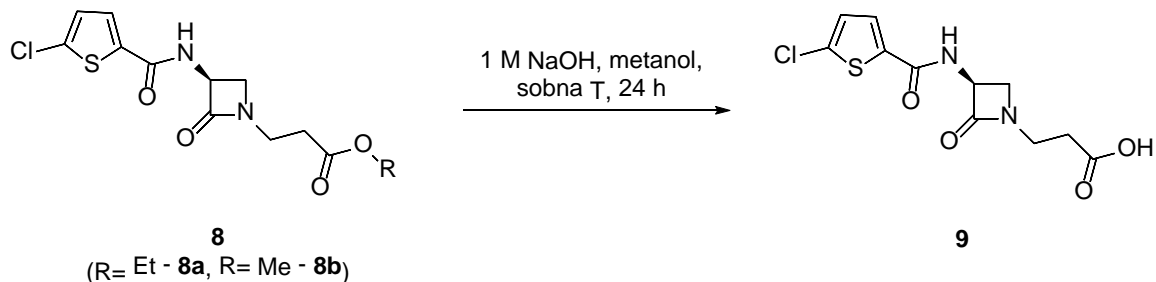
Pod znižanim tlakom smo odparili DMF in oljnat preostanek očistili s kolonsko kromatografijo (MF = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 20 : 1).

Med čiščenjem spojine s kolonsko kromatografijo ali med odparevanjem topila je prišlo do preestrenja, saj glede na NMR spekter produkta vidimo, da smo v večini izolirali metilni ester (91,1 % metilnega estra – spojina **8b**, 8,9 % etilnega estra – spojina **8a**). Z izoliranim produktom smo po NMR analizi takoj nadaljevali v naslednji stopnji sinteze.

IUPAC ime	metil ( <i>S</i> )-3-(3-(5-klorotiofen-2-karboksamido)-2-oksoazetidin-1-il)propanoat (spojina <b>8b</b> )
Videz	brezbarvno olje
Izkoristek reakcije	76,9 %
MF	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> : MeOH = 9 : 1
Rf	0,45
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	δ= 2,64 (t, <i>J</i> = 6,4 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO) 3,42 (dd, <i>J</i> <sub>1</sub> = 5,6 Hz, <i>J</i> <sub>2</sub> = 2,4 Hz, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 3,51-3,64 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COO), 3,68 (t, <i>J</i> = 5,4 Hz, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 3,72 (s, 3 H, OCH <sub>3</sub> ), 4,97-5,0 (m, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 6,88 (d, <i>J</i> = 4,0 Hz, 1 H, Ar-H), 7,14 (d, <i>J</i> = 6,4 Hz, 1 H, NH), 7,31 (d, <i>J</i> = 4,0 Hz, 1 H, Ar-H) ppm.

#### 4.3.2 Sinteza 3-(3-(5-klorotiofen-2-karboksamido)-2-oksoazetidin-1-il)propanojske kisline (spojine **9**)

Reakcija:



Slika 16: Reakcijska shema sinteze spojine **9**

Sintezni postopek:

114 mg spojine **8** (0,345 mmol) smo raztopili v 10 ml metanola, dodali 1M NaOH (345 μl, 1 ekv. – 0,345 mmol) in pustili mešati pri sobni temperaturi čez noč.

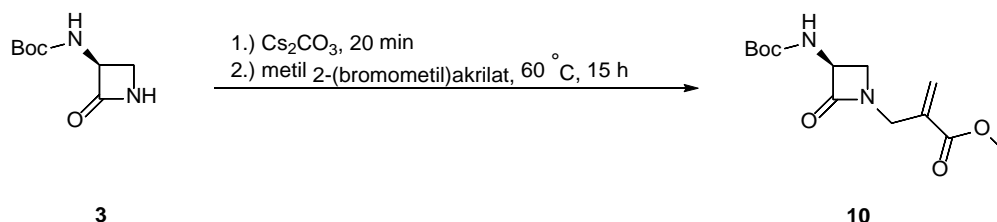
Postopek izolacije:

Reakcijski zmesi smo pod nižanim tlakom odparili metanol in produkt očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : MeOH = 3 : 2 + 1 % očetne kisline). Izolirali smo oljnat produkt, ki smo ga izoborili z acetonom.

IUPAC ime	(S)-3-(3-(5-klorotiofen-2-karboksamido)-2-oksoazetidin-1-il)propanojska kislina
Videz	bela amorfna snov
Izkoristek reakcije	26,4 %
MF	EtOAc : MeOH = 3 : 2 + 1 % očetne kisline
Rf	0,56
T <sub>tal</sub>	152–154 °C
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ= 2,13 (t, J= 7,0 Hz, 2 H, CH <sub>2</sub> COOH) 3,26 (dd, J <sub>1</sub> = 5,4 Hz, J <sub>2</sub> = 2,2 Hz, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 3,28-3,32 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH), 3,53 (t, J= 5,4 Hz, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 4,94-4,98 (m, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 7,19 (d, J= 4,0 Hz, 1 H, Ar-H), 7,72 (d, J= 4,0 Hz, 1 H, Ar-H), 9,43 (d, J= 8,4 Hz, 1 H, NH) ppm.
<sup>13</sup> C-NMR (400MHz, DMSO-d <sub>6</sub> )	δ= 35,47; 47,09; 55,20; 57,75; 128,22; 128,64; 133,37; 138,28; 159,92; 166,11; 176,88 ppm.
IR	3406, 3244, 3085, 2984, 2922, 1738, 1558, 1423, 1320, 1244, 1067, 939, 809, 741, 726, 696,659, 640, 633, 620 cm <sup>-1</sup>
ESI-HRMS	Izračunano za C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> SCl (m/z): 301,0050 [M-H] Izmerjena vrednost (m/z): 301,0056

#### 4.4 SINTEZA METIL 2-((3-((*TERC*-BUTOKSIKARBONIL)AMINO)-2-OKSOAZETIDIN-1-IL)METIL)AKRILATA (SPOJINE 10)

##### Reakcija:



Slika 17: Reakcijska shema sinteze spojine 10

##### Sintezni postopek:

V 25-mililitrsko z argonom preprihano bučko smo natehtali 50 mg spojine 3 (0,27 mmol) in jo raztopili v 7 ml acetonitrila, nato smo dodali še cezijev karbonat (123 mg, 1,4 ekv. – 0,75 mmol). Zmes smo pustili mešati 20 min pri sobni temperaturi. Nato smo dodali metil 2-(bromometil)akrilat (35  $\mu$ l, 1,05 ekv. – 0,28 mmol) in zmes pustili mešati čez noč (15 h) v argonovi atmosferi pri 60 °C.

##### Postopek izolacije:

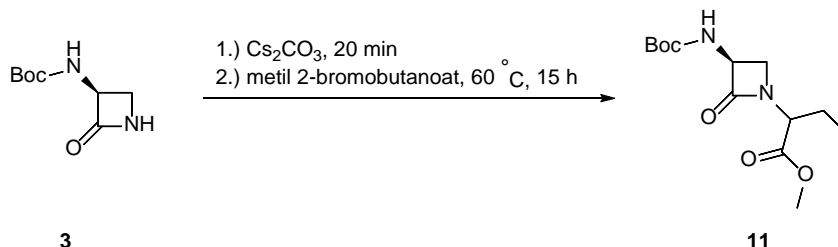
Iz reakcijske zmesi smo z odsesavanjem odfiltrirali oborino (CsBr) in jo zavrgli. Matičnici smo odparili topilo pod znižanim tlakom. Dobljeno oborino smo očistili s kolonsko kromatografijo MF = EtOAc : *n*-heksan = 2 : 1.

IUPAC ime	metil ( <i>S</i> )-2-((3-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-2-oksoazetidin-1-il)metil)akrilat
Videz	Bela amorfná snov
Izkoristek reakcije	1,3 %
MF	EtOAc : <i>n</i> -heksan = 2 : 1
Rf	0,34
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ = 1,43 (s, 9 H, C(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 3,27 (dd, $J_1$ = 5,2 Hz, $J_2$ = 2,0 Hz, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 3,56 (t, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 3,71 (s, 3 H, OCH <sub>3</sub> ), 3,78 (s, 2 H, CH <sub>2</sub> CCOO), 4,76 (rs, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 5,10 (d, $J$ = 5,2 Hz, 1 H, NH), 6,30 (s, 1 H, C=CH <sub>2</sub> ), 6,35 (s, 1 H, C=CH <sub>2</sub> ) ppm.

<sup>13</sup>C-NMR in MS (ESI-HRMS) nismo mogli posneti zaradi premajhne količine vzorca.

## 4.5 SINTEZA METIL 2-((-3-((*TERC*-BUTOKSIKARBONIL)AMINO)-2-OKSOAZETIDIN-1-IL)BUTANOATA (SPOJINE 11)

### Reakcija:



Slika 18: Reakcijska shema sinteze spojine 11

### Sintezni postopek:

V 50-mililitrsko z argonom preprihano bučko smo natehtali 300 mg spojine 3 (1,61 mmol) in jo raztopili v acetonitrilu (30 ml). Nato smo dodali še cezijev karbonat (739 mg, 1,4 ekv. – 2,26 mmol). Zmes smo pustili mešati 20 min pri sobni temperaturi. Nato smo dodali metil 2-bromobutanoat (201  $\mu$ l, 1,05 ekv. – 1,69 mmol) in zmes pustili mešati čez noč (20 h) v argonovi atmosferi pri 60 °C.

### Postopek izolacije:

Po končani reakciji smo oborino odfiltrirali z odsesavanjem in jo zavrgli. Matičnici smo pod znižanim tlakom odparili topilo. Dobljeno oborino smo očistili s kolonsko kromatografijo (MF = EtOAc : *n*-heksan = 2 : 1).

IUPAC ime	metil 2-((-3-(( <i>terc</i> -butoksikarbonil)amino)-2-oksoazetidin-1-il)butanoat
Videz	rumena amorfna snov
Izkoristek reakcije	1,1 %
MF	EtOAc : <i>n</i> -heksan = 2 : 1
R <sub>f</sub>	0,48
<sup>1</sup> H-NMR (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> )	$\delta$ = 0,97 (1,02*) (t+t, $J$ = 7,4 Hz, 3 H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 1,44 (s, 9 H, (CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> ), 1,65-1,81 (m, 2 H, CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 3,30-3,40 (m, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 3,64 (3,79*) (t+t, $J$ = 5,2 Hz, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 3,74 (s+s, 3 H, OCH <sub>3</sub> ), 4,33 (ddd, $J_1$ = 10,0 Hz, $J_2$ = 5,2 Hz, $J_3$ = 2,8 Hz, 1 H, CHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub> ), 4,82 (4,94*) (rs+rs, 1 H, CHCH <sub>2</sub> N), 5,08 (5,13*) (d+d, $J$ = 6,8 Hz, 1 H, NH) ppm. *dva diastereoizomera

<sup>13</sup>C-NMR in MS (ESI-HRMS) nismo mogli posneti zaradi premajhne količine vzorca.

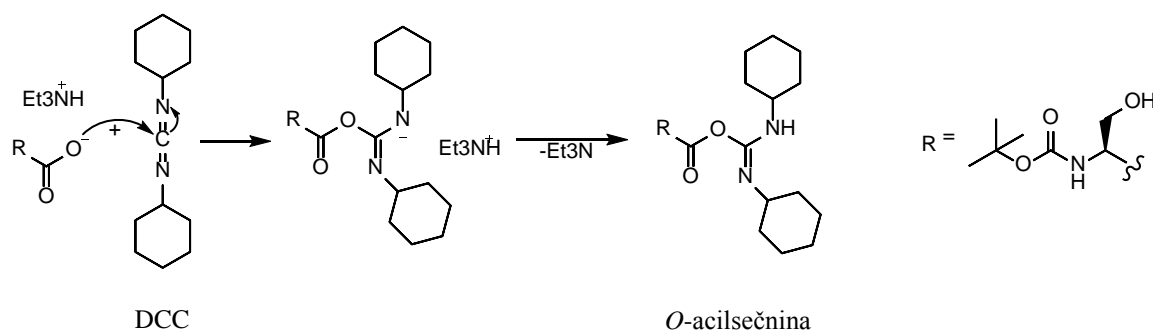
## 5 REZULTATI IN RAZPRAVA

### 5.1 RAZLAGA SINTEZNIH POSTOPKOV

#### 5.1.1 Sinteza osnovne spojine

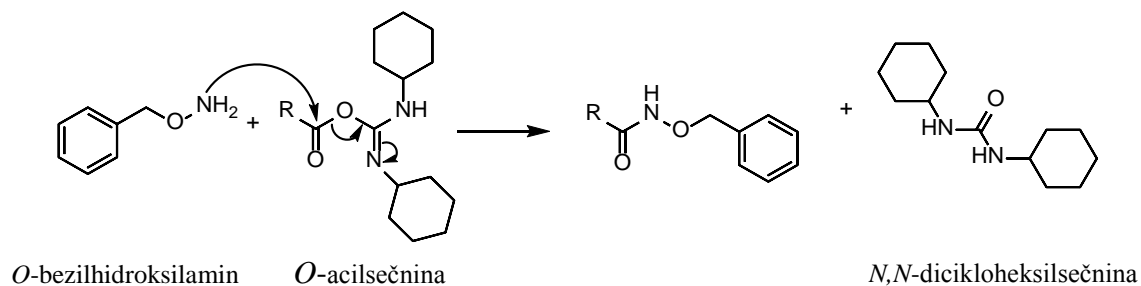
Za pripravo osnovne spojine smo v magistrski nalogi uporabili tristopenjsko sintezo. V prvi stopnji smo iz izhodne spojine (serina z Boc zaščito na amski skupini) sintetizirali amid. Mehanizem je prikazan na slikah 19 do 22.

Trietilamin kot baza odcepi proton s kisika. Negativno nabiti kisikov atom ima vlogo nukleofila in napade centralni ogljikov atom *N,N*-dicikloheksilkarbodiimida (DCC). DCC je pri reakciji uporabljen kot sklopitveni reagent, katerega naloga je povečati reaktivnost skupine, ki vstopa v reakcijo (v našem primeru smo povečali elektrofilitnost karbonilnega ogljika). Pri tem nastane reaktiven intermediat *O*-acilsečnina.



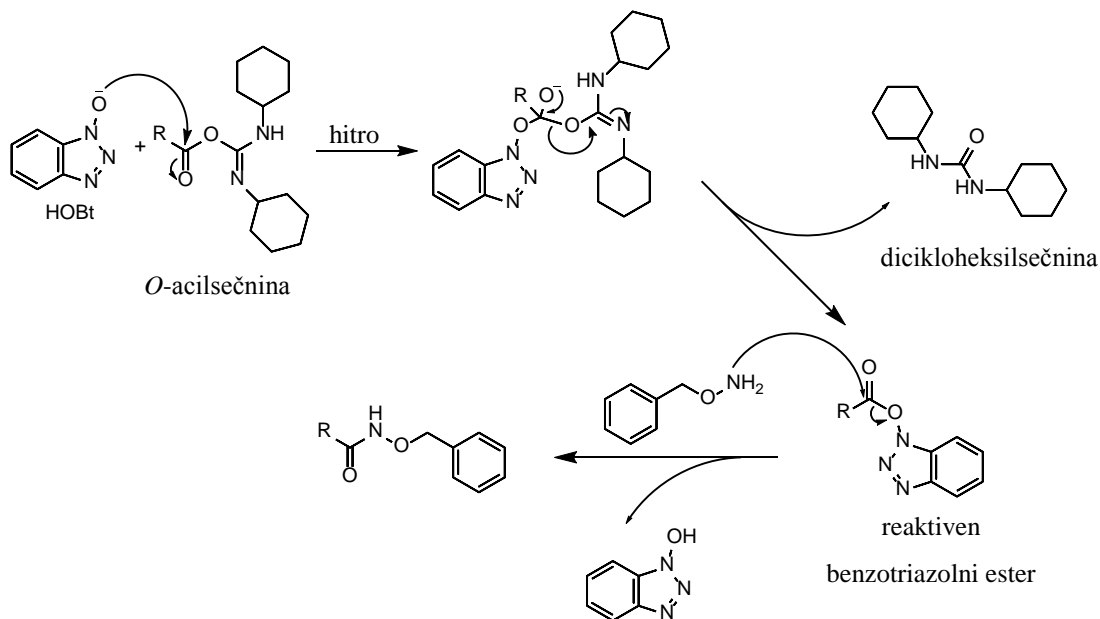
Slika 19: Mehanizem aktivacije kisline, povzeto po (35-37).

*O*-acilsečnina reagira z amino skupino reagenta (*O*-benzilhidroksilamina). Nukleofilni napad je zaradi reaktivne narave *O*-acilsečnine učinkovitejši, reakcija poteče z boljšim izkoristkom (v primerjavi z reakcijo, pri kateri ne uporabimo sklopitvenega reagenta). Kot produkt reakcije nastane pričakovani amid, stranski produkt pa je *N,N*-dicikloheksilsečnina.

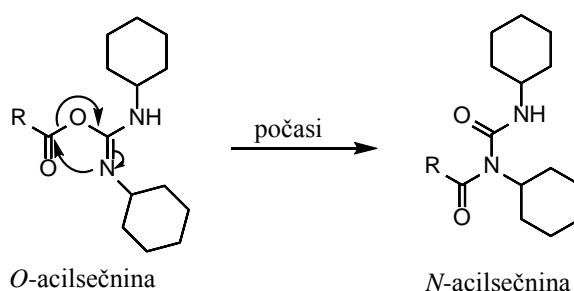


Slika 20: Mehanizem nastanka amida, povzeto po (35, 36).

Pri reakcijah, pri katerih tvorimo amidno vez na opisani način, sta pogosti dve stranski reakciji – racemizacija izhodne spojine in prenos acilne skupine, kar vodi v nastanek *N*-acilsečnine. Da bi zmanjšali možnost slednje stranske reakcije, smo aktivacijo izhodne spojine z DCC-jem izvajali pri 0 °C. Uporabili smo tudi HOBt, s čimer se izognemo obema omenjenima stranskima reakcijama. HOBt z *O*-acilsečnino reagira hitreje, kot pride do prenosa acilne skupine, hkrati pa je nastali intermediat še vedno dovolj reaktiven, da lahko pride do nadaljnje sklopitve z aminom (36).



Slika 21: Mehanizem nastanka amida v prisotnosti HOBt, povzeto po (35, 36).

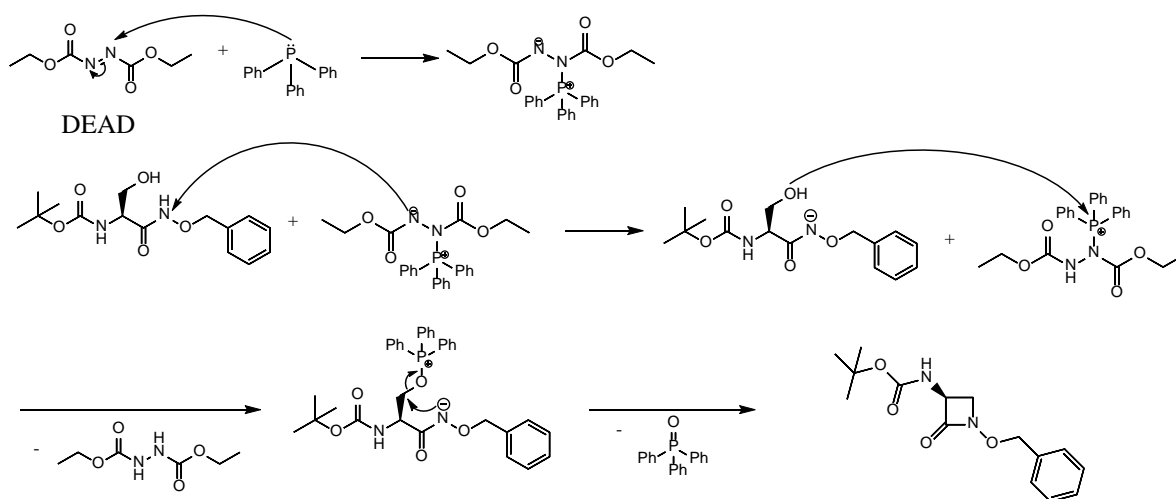


Slika 22: Stranska reakcija, povzeto po (37).

Za razliko od sinteze osnovne spojine, ki so jo predhodno optimizirali (v diplomskem delu Anžeta Rupnika (38)), smo v tem magistrskem delu kot sklopitveni reagent uporabili DCC namesto EDC. S tem smo želeli znižati stroške sinteze, saj je DCC cenejši od EDC. Slaba

stran zamenjave EDC z DCC pa je otežena izolacija produkta zaradi nastanka velikega števila stranskih produktov. Izkoristek reakcije je bil 64,6-odstoten, kar je primerljivo z vrednostmi iz literature – Kokare in sodelavci so za reakcijo s podobno aminokislino in sklopitvenim reagentom dobili 68-odstoten izkoristek (39).

V drugi stopnji smo iz spojine **1** pripravili azetidin-2-onski obroč s pomočjo Mitsunobujeve reakcije. Mehanizem reakcije je prikazan na sliki 23. Trifenilfosfin, ki ima v tej reakciji vlogo nukleofila, napade enega od dušikov v molekuli dietil azodikarbonsilata (DEAD). Pri tej ireverzibilni reakciji nastane Morrison-Brunn-Huisgenov ion dvojček, ki v naslednjem koraku deprotonira izhodno spojino, kot je prikazano na sliki 23. Nabiti molekuli se hitro združita v ionski par. Sledi prenos  $\text{Ph}_3\text{P}^+$  skupine na alkoholno skupino izhodne spojine, pri tem nastaneta oksifosfonijeva sol in stranski produkt dietil hidrazin-1,2-dikarbonsilat. Nazadnje deprotonirani dušik preko  $\text{S}_\text{N}2$  mehanizma napade ogljik, na katerega je vezana oksifosfonijeva sol, odcepi se trifenilfosfin oksid, dva dela izhodne spojine se povežeta in nastane azetidin-2-onski obroč.



Slika 23: Mehanizem Mitsunobujeve reakcije, povzeto po (40, 41).

Reakcijo smo izvajali v inertni atmosferi zaradi vlage, ki bi motila reakcijo in zaradi nevarnosti oksidacije trifenilfosfina s kisikom iz zraka, kar bi količino trifenilfosfina, ki bi bil na voljo za reakcijo, zmanjšalo. Kljub temu je bil izkoristek reakcije le 40,5-odstoten.



S čiščenjem produkta smo imeli velike težave, saj so bili v reakcijski zmesi prisotni stranski produkti in še neporabljeni reagenti. Na NMR spektru očiščenega produkta po prvi kolonski kromatografiji (MF = EtOAc : *n*-heksan = 1 : 1) so bile vidne nečistote, zato smo se odločili, da bomo produkt ponovno očistili s kolonsko kromatografijo, vendar z drugačno mobilno fazo. Z izbiro nove mobilne faze smo imeli velike težave, saj pri nobeni nismo dosegli ustrezne ločbe med našo spojino in prisotnimi nečistotami (slika 24). Poleg tega smo na kromatografskih ploščicah, razvitih v nekaterih mobilnih fazah, videli večje število lis kot pri drugih.



Slika 24: Primerjava številnih mobilnih faz za optimizacijo izolacije spojine 2.

Iz velikega števila poskušanih mobilnih faz smo izbrali MF = CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> : MeOH = 30 : 1.

Pri zadnji stopnji sinteze osnovnega skeleta smo s katalitskim hidrogeniranjem odstranili zaščitno skupino na laktamskem dušiku. Z Raney-nikljem smo hidrogenirali N-O vez in tako dobili želen laktamski skelet, kot stranski produkt pa benzilni alkohol. Reakcijo smo izvajali v vodikovi atmosferi (nadtlak vodika). Dobljeni produkt smo morali očistiti s kolonsko kromatografijo zaradi prisotne nečistote. Izkoristek te stopnje je znašal 72,6 %.

Izkoristki katalitskega hidrogeniranja ob prisotnosti Raney-Ni, ki jih najdemo v literaturi, so precej različni. Ponekod je navedeno, da naj bi reakcija potekla že v milih reakcijskih razmerah s 100-odstotnim izkoristkom. Spet drugi viri navajajo, da je potreben povišan tlak (60 in več atmosfer) ali povišana temperatura (38, 42). Pri optimizaciji te reakcije so v diplomskem delu Anžeta Rupnika dosegli največ 68-odstotni izkoristek (38). Nadtlak vodika, ki smo ga uporabili pri reakciji v tem magistrskem delu je rahlo povišal izkoristek reakcije, vendar pa še vedno nismo uspeli doseči izkoristka, ki je naveden v literaturi.



## 5.1.2 Sinteza disubstituiranih derivatov

Do končnih spojin smo iz osnovne spojine prišli s pomočjo štiristopenjske sinteze:

1. alkiliranje osnovne spojine,
2. odstranitev Boc zaščite iz amino skupine,
3. sklopitvena reakcija s kislino,
4. odstranitev zaščite na karboksilni kislini/hidroliza estra.

### 5.1.2.1 Sinteza propionatnega derivata

- Alkiliranje

Sintezo za acetatne derivate so že predhodno uvedli in optimizirali, v sklopu te magistrske naloge smo želeli podaljšati alkilno verigo substituenta na mestu 1, zato smo si izbrali verigo s tremi ogljikovimi atomi – propionat. Želeni derivat smo poskušali sintetizirati na različne načine.

V prvem sinteznem postopku smo kot bazo, ki bi odcepila proton na laktamskem dušiku, uporabili  $K_2CO_3$ . V prebitku smo dodali tudi TBAB (tetrabutilamonijev bromid), ki je katalizator faznega prenosa. Nazadnje smo v reakcijsko zmes dodali še alkilant (tudi v prebitku) in reakcijsko zmes mešali pri povišani temperaturi. Potek reakcije smo spremljali s tankoplastno kromatografijo in ker po enem dnevu ni bilo vidnih sprememb, smo v reakcijsko zmes dodali še po 0,2 ekvivalenta vsakega reagenta. Opisan postopek ni dal želenih rezultatov, zato smo se odločili za modifikacijo postopka. Dodali smo NaI z namenom, da bi povečali reaktivnost alkilanta. Jod je zamenjal brom v strukturi alkilanta. S tem smo povečali elektrofilnost reagenta in olajšali nukleofilni napad laktamskega dušika, saj je I<sup>-</sup> boljša izstopajoča skupina kot Br<sup>-</sup>. Žal tudi dodatek NaI ni izboljšal poteka reakcije, zato smo postopek ponovno modificirali. V tretjem postopku smo poleg vseh zgoraj navedenih reagentov uporabili tudi kronski eter (18-krona-6), da bi izboljšali topnost NaI, vendar tudi ta postopek ni dal zadovoljivih rezultatov. Reakcijo smo poskusili pospešiti na mikrovalovnem reaktorju, vendar tudi ta četrta različica postopka ni prinesla želenega izboljšanja.

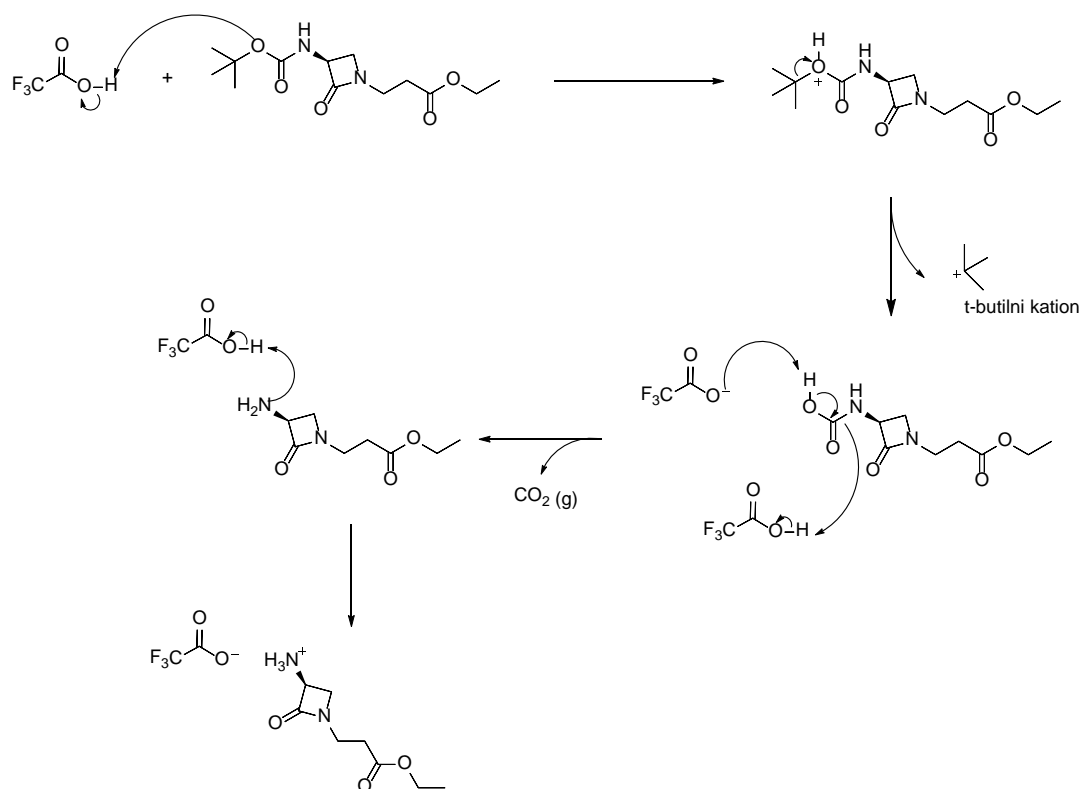
V petem postopku smo izbrali močnejšo bazo –  $Cs_2CO_3$ . Zaradi spremembe baze nismo potrebovali več TBAB. Reakcijo smo izvajali pri povišani temperaturi približno dva dni.

Ta postopek je dal boljše rezultate. Pri poskusni reakciji (s 100 mg izhodne spojine) smo produkt uspeli očistiti le z enkratno kolonsko kromatografijo. Izkoristek reakcije je bil 38,1-odstotni, kar je zelo blizu izkoristku, navedenemu v literaturi – Palomo in sodelavci so za podobno reakcijo uspeli doseči 40-odstotni izkoristek (43). Pri ponovitvi reakcije s približno desetkrat večjo množino izhodne spojine, smo imeli z izolacijo produkta nekaj težav, potrebno je bilo večkratno čiščenje s kolonsko kromatografijo z različnimi mobilnimi fazami. Uspeli smo doseči le 26,4-odstotni izkoristek reakcije. Vzrok za slabši izkoristek je najverjetneje ravno izolacija produkta. Nastale soli (CsBr) nismo odfiltrirali, ampak smo celotno suspenzijo nanесли direktno na kromatografsko kolono. Ker je sol zelo slabo topna v izbrani mobilni fazi, smo na ta način delno zamašili kolono in zato tudi uspeli izolirati manjšo količino produkta. Ob ponovitvi reakcije smo pred izvedbo čiščenja s kolonsko kromatografijo sol odfiltrirali, vendar smo dosegli še slabši izkoristek (morda smo del produkta zavrgli skupaj s soljo). Možno pa je tudi, da reakcija slabše poteče, ko uporabimo večje količine izhodnih spojin, zato bi morali postopke še dodatno modificirati (npr. z izbiro primernejšega topila ali baze). Predvsem je nujna optimizacija izolacije.

- Odščita amino skupine

Pri drugi stopnji sinteze končnega derivata smo odstranili Boc zaščito z amino skupine na mestu 3 laktamskega obroča. Odščito smo poskušali opraviti po dveh različnih postopkih. Pri prvem postopku smo uporabili 6 ekvivalentov 4 M HCl. Produkta na tej stopnji nismo izolirali, ampak smo po uparitvi topila nadaljevali z naslednjo stopnjo. Po naslednji stopnji (tvorbi amida) smo ocenili, da ta postopek ni dal zadovoljivih rezultatov, zato smo se odločili, da bomo odščito poskušali izboljšati z drugim postopkom. Uporabili smo 20 ekvivalentov trifluoroocetne kisline. Po treh urah smo odparili topilo in takoj nadaljevali z naslednjo stopnjo (tvorbo amida). Mehanizem reakcije je prikazan na sliki 25.

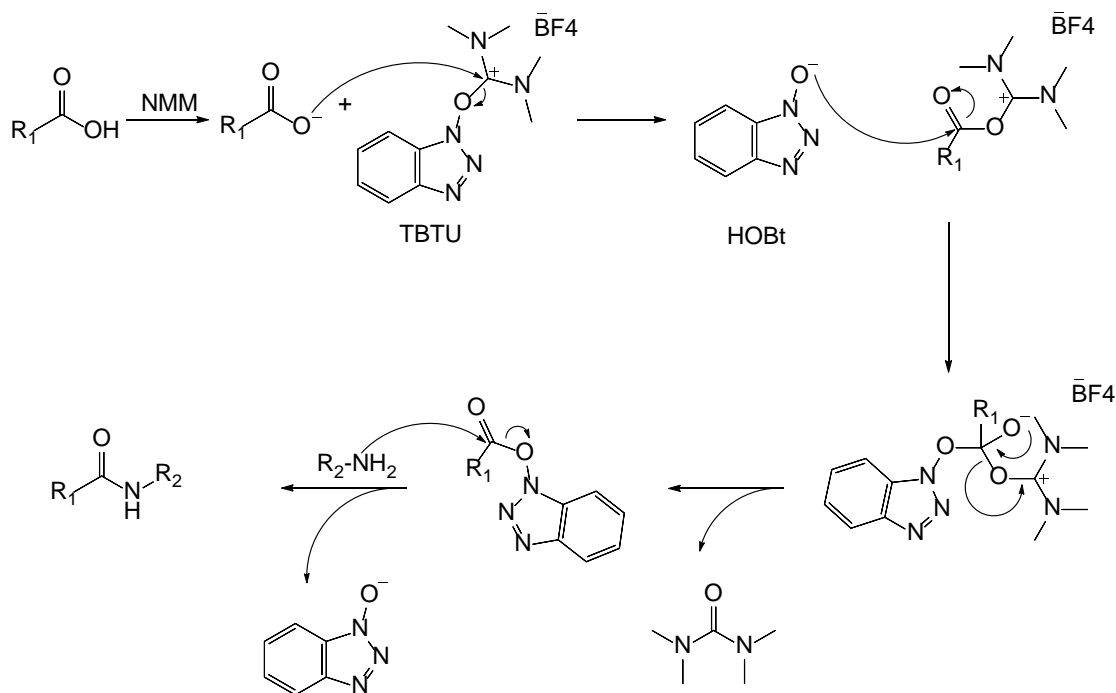
CF<sub>3</sub>COOH protonira *tert*-butil karbamatno skupino na uporabljeni izhodni spojini. Pri tem nastane karbaminska kislina in izstopi *tert*-butilni kation, ki se pretvori do izobutilena. Zaradi prisotnosti CF<sub>3</sub>COOH pride do dekarboksilacije karbaminske kisline. Nastane prosti amin, ki se v kislem protonira in tvori sol s CF<sub>3</sub>COOH (45).



Slika 25: Mehanizem odščite Boc, povzeto po (44).

- Tvorba amida (sklapanje z/s 2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)ocetno kislino/5-klorotiofen-2-karboksilno kislino)

Ker smo želeli sintetizirati različne disubstituirane monobaktame, smo za sklopitveno reakcijo uporabili dve različni kislini. Mehanizem reakcije je podoben mehanizmu v prvi stopnji sinteze osnovne spojine. Princip reakcije je identičen (tvorba amidne vezi z uporabo sklopitvenega reagenta, ki poveča elektrofilnost ogljika v karboksilni skupini), le da smo tokrat uporabili druge reagente.  $\beta$ -laktamu s prosto aaminsko skupino smo dodali NMM. S tem smo nevtralizirali morebitno preostalo trifluoroocetno kislino in deprotonirali prosto aaminsko skupino. Nato smo reakcijsko zmes postavili na led in po kapljicah dodali zmes z aktivirano kislino, ki smo jo pripravili v predhodni reakciji. Kislino smo aktivirali tako, da smo ji dodali NMM in TBTU ter zmes pustili mešati eno uro pri sobni temperaturi. Mehanizem reakcije je prikazan na sliki 26.



Slika 26: Mehanizem tvorbe amidne vezi ob prisotnosti TBTU, povzeto po (36, 46).

NMM odcepi proton kislini, ta postane bolj nukleofilna in lahko napade pozitivno nabit ogljikov atom HOBt-uronijevega sistema. Pri tem nastaneta HOBt z negativno nabitim kisikovim atomom ter aktivirana acil-uronijeva spojina. Negativno nabit kisikov atom napade karbonilni ogljik, pri čemer nastane reaktiven intermediat. Po odcepitvi 1,1,3,3-tetrametilsečnine dobimo reaktiven benzotriazolni ester. Karbonilna skupina uporabljene kisline ima v tej strukturi povečano elektrofilnost, zato je tvorba amidne vezi olajšana. Reakcijo smo izvajali na ledeni kopeli in v argonovi atmosferi, zato da smo minimizirali možnosti za nastajanje stranskih produktov. Za izolacijo spojine smo morali izvesti ekstrakcijo, kolonsko kromatografijo (2x) in izobarjanje s kombinacijo etra in petroletra.

Izkoristek reakcije je bil 43-odstoten za reakcijo z 2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)ocetno kislino in 77-odstoten za reakcijo s 5-klorotiofen-2-karboksilno kislino. Kljub temu, da smo pri sintezi obeh spojin uporabili enake reagente, enake ekvivalente reagentov glede na množino izhodne spojine ter sintezi izvedli v enakih razmerah, je očitno, da reakcija s 5-klorotiofen-2-karboksilno kislino poteka bolje. Morda je 2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)ocetna kislina manj reaktivna in smo reakcijo dejansko zavirali zaradi izvajanja pri 0 °C (glavni namen tega je bil, da preprečimo stranske reakcije). Vsekakor bi morali izboljšati tudi postopek izolacije, saj pri uporabljenem postopku (pri sintezi spojine **6**) izgube gotovo niso majhne. Del spojine smo

izgubili že pri ekstrakciji, kar je bilo vidno iz analize s tankoplastno kromatografijo. Izbira ustrežnejšega ekstrakcijskega topila bi bila zelo dobrodošla v nadaljnjih eksperimentih. Spojino smo še naprej izgubljali z dvakratnim čiščenjem s kolonsko kromatografijo, prav tako pri obarjanju. Z večanjem deleža petroletra v mešanici za obarjanje smo uspeli oboriti več spojine, hkrati pa smo s tem povečevali možnost, da izoborimo tudi tiste nečistote, ki so morda še prisotne, kar nam ni v interesu, saj je produkt potem nečist. Spojine **8** nismo izolirali po opisanem postopku, ampak smo izvedli samo čiščenje s kolonsko kromatografijo. Pojavil se nam je pa drug problem: med postopkom izolacije je prihajalo do preestrenja.

V literaturi so izkoristki za podobno reakcijo med 2-(2-tritilaminotiazol-4-il)-(Z)-2-(metoksiimino)ocetno kislino in izhodno spojino, ki je podobna naši, le da ima še substituent na mestu 4, v območju med 52 in 74 % (47). Uporabljeni reagenti imajo sicer enako vlogo kot reagenti, ki smo jih uporabili v tem magistrskem delu za dotično reakcijo, vendar pa niso enaki, kar je mogoče tudi eden od razlogov, da smo dosegli manjši izkoristek.

Dobljena produkta sta predstopnji načrtovanih spojin in ker sta v obliki estrov, sta uporabna tudi kot predzdravili. Zato smo spojino **6** poslali na testiranja skupaj s končnim produktom (spojino **7**).

- Hidroliza estra oziroma odščita karboksilne kisline

Da bi spojine čim bolj posnemale strukturo ceftobiprola, smo v zadnji stopnji sinteze derivatov hidrolizirali ester v alkilni verigi, ki je na  $\beta$ -laktamski obroč pripeta na mestu 1. Hidroliza je bila preprosta, izvedli smo jo z dvema ekvivalentoma 1 M NaOH. V izbranem topilu (MeOH) je prihajalo do preestrenja, zato bi bilo kakšno drugo topilo s tega vidika morda boljše izbira. Ker je reakcija potrebovala dva dni, da je potekla kvantitativno, in je bila stabilnost spojine v danih razmerah vprašljiva, smo najprej poizkušali z uporabo šibkejše baze, nato pa še s pospešitvijo reakcije (z uporabo več ekvivalentov baze in krajšim potekom reakcije). Te spremembe niso prinesle izboljšave postopka.

Čiščenje končne spojine je bilo težavno. Ker je končna spojina kislina (gre za karboksilno kislino z majhnim pKa), je moral biti tudi pH mobilne faze za kolonsko kromatografijo ustrezno majhen, da je ostala spojina v neprotonirani obliki. S tem namenom smo izbrani mobilni fazi dodali 1 % očetne kisline. V prvem poskusu je verjetno spojina v teh razmerah

na koloni razpadala (morda se je odprl  $\beta$ -laktamski obroč), saj je bil končni izkoristek reakcije in izolacije le 3 %. Tudi glede na posnet NMR spekter ene izmed frakcij izgleda, da smo izolirali del odprtega  $\beta$ -laktamskega obroča. Ko smo reakcijo ponovili, je bila ta težava ponovno prisotna, vendar v manjši meri (izkoristek je bil boljši). Ocetna kislina iz mobilne faze je tudi po večkratnem spiranju z različnimi topili in večurnem odparevanju topil pri tlaku 0 bar ostajala ujeta v kristale naše spojine, kar je razvidno tudi iz NMR spektrov. Zadnja stopnja sinteze, predvsem čiščenje končne spojine, potrebuje nadaljnje izboljšave. Morda bi bila kakšna druga oblika kromatografije ustrežnejši način izolacije. Glede na to, da je spojina kislina, bi na primer lahko uporabili ionsko-izmenjevalno kromatografijo.

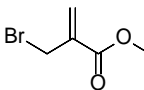
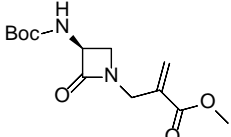
#### 5.1.2.2 Sinteza ostalih derivatov

Z namenom, da bi določili odnos med strukturo in delovanjem spojin, smo želeli sintetizirati več spojin, ki bi se razlikovale v substituentu na mestu 3. Da bi dosegli večjo podobnost s ceftobiprolom, smo na alkilno verigo substituenta na mestu 1 želeli uvesti dvojno vez, zanimalo pa nas je tudi, kako bi daljša alkilna veriga vplivala na afiniteto do PBP, zato smo jo podaljšali še za 1 ogljikov atom (preglednica IV). Vsa alkiliranja smo izvedli po postopku, ki je pri alkiliranju s propionatom obveljal za najboljšega (z bazo  $\text{Cs}_2\text{CO}_3$  pri povišani temperaturi).

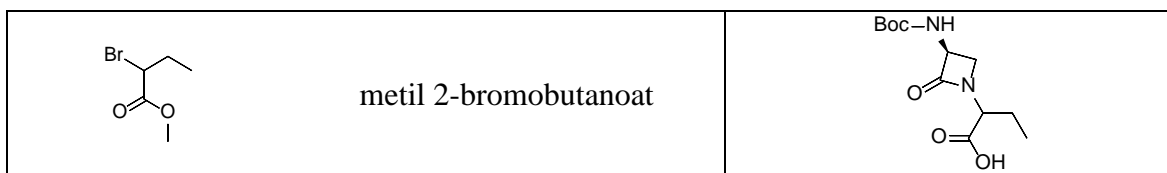
Poskusili smo izvesti alkiliranje z metil 2-(bromometil)akrilatom. Produkt smo uspeli izolirati in potrditi njegovo strukturo z NMR. Izkoristek reakcije je bil izredno majhen (1,3 %), zato s tem derivatom nismo izvedli nadaljnjih sinteznih stopenj do končne spojine.

Podobne rezultate je dalo tudi alkiliranje z metil 2-bromobutanoatom. Cilj je bil sintetizirati enake derivate kot s propionatom, primerjati delovanje spojin z ekvivalentnimi strukturami in iz dobljenih rezultatov izluščiti vpliv daljšanja alkilne verige na aktivnost. Tudi to alkiliranje je poteklo s slabim izkoristkom (1 %), zato nismo uspeli nadaljevati s sintezo do končne spojine.

**Preglednica IV: Poskusne sinteze derivatov z daljšimi alkilnimi verigami**

Uporabljen reagent v stopnji alkiliranja	Predviden vmesni produkt
 metil 2-(bromometil)akrilat	

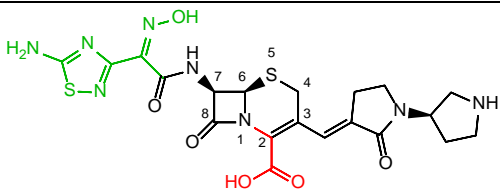
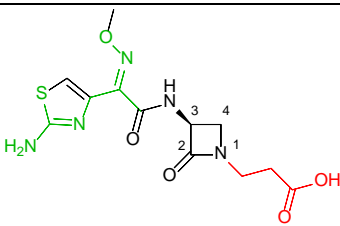
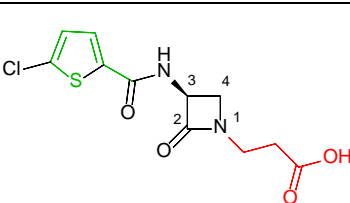




## 5.2 PRIMERJAVA STRUKTUR DERIVATOV S CEFTOBIPROLOM

S spojinami, sintetiziranimi v tej magistrski nalogi, smo želeli v določeni meri posnemati strukturo ceftobiprola, ki dokazano deluje na številne odporne seve. Pri vseh načrtovanih končnih spojinah je prisoten monobaktamski skelet, ki deloma posnema cefemskega (preglednica V). Monobaktami so zelo zanimivi za sintezo, predvsem zaradi lažje in krajše sinteze v primerjavi s penicilini in cefalosporini. Kljub temu, da gre za monociklični sistem, je antibiotična aktivnost ohranjena (8).

**Preglednica V: Primerjava struktur ceftobiprola in sintetiziranih končnih spojin.**

<p style="text-align: center;">ceftobiprol</p>	
<p style="text-align: center;">spojina <u>7</u></p>	
<p style="text-align: center;">spojina <u>9</u></p>	

Pri spojinu 7 smo z 2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)acetamidnim fragmentom na mestu 3 dobro posnemali fragment na mestu 7 ceftobiprola (zeleno obarvani deli spojin v preglednici V). V heterociklu je sicer en dušik manj, vendar to lastnosti aromatskega obroča ne spremeni v veliki meri. Večja sprememba je pri hidroksiiminski skupini. 2-(2-aminotiazol-4-il)-2-(metoksiimino)ocetna kislina, ki smo jo uporabili za tvorbo amida,

nima proste OH skupine (kot jo ima ceftobiprol), ampak ima na njenem mestu metoksi skupino, ki je bolj lipofilna. Posledica so lahko spremenjene interakcije v aktivnem mestu.

Pri spojini **9** smo s 5-klorotiofen-2-karboksamidnim fragmentom ohranili le razdaljo med amidno vezjo in heterocikličnim žveplom. Zaradi slabšega posnemanja je morda spojina **9** slabše aktivna.

V molekuli ceftobiprola je na mestu 2 funkcionalna skupina karboksilna kislina, ki verjetno v veliki meri prispeva k medsebojnim interakcijam s penicilin vezočimi proteini. Pri spojinah, sintetiziranih v sklopu te magistrske naloge, smo karboksilno kislino ohranili, spremenili smo le število ogljikovih atomov, ki jo ločujejo od obročnega dušika (rdeče obarvani deli spojin v preglednici V). Predhodno so bili sintetizirani derivati z očetno kislino na mestu 1 monobaktamov. V magistrski nalogi smo se primarno odločili za sintezo derivatov s propanojsko in butanojsko kislino. Tako bi lahko iz rezultatov, ki bi jih dobili za te tri sete spojin, določili, kako daljšanje alkilne verige vpliva na vezavo spojin na PBP. Želeli smo sintetizirati tudi derivate z akrilno kislino, saj bi zaradi dvojne vezi na substituentu bolje posnemali ceftobiprol. Zaradi težav pri sintezi žal nismo uspeli pripraviti končnih spojin z akrilatom in butiratom.

### 5.3 BIOKEMIJSKO VREDNOTENJE PRIPRAVLJENIH SPOJIN NA REZISTENTNIH PBP

Biokemijsko vrednotenje spojin je potekalo v Centru za proteinski inženiring v Liegu. Spojinama **6** in **7**, ki smo ju sintetizirali v sklopu tega magistrskega dela, smo preverili učinkovitost, tako da smo določili zaviralno aktivnost na dveh PBP. PBP5fm je izoliran iz rezistentnega seva *Enterococcus faecium* D63r. R39 pa je na penicilin občutljiva D,D-karboksipeptidaza, izolirana iz nerezistentnega seva bakterij iz rodu *Actynomadure*.

Postopek določanja rezidualne aktivnosti je opisan v poglavju 3.2 METODE.

Rezidualna aktivnost je izražena v odstotkih in predstavlja delež preostale aktivnosti encima ob zaviranju s testirano spojino (preglednica VI). Nižja kot je rezidualna aktivnost, močnejše je zaviralno delovanje testirane spojine.

**Preglednica VI: Rezidualne aktivnosti (RA) sintetiziranih spojin, izražene v odstotkih.**

Oznaka spojine	% RA	% RA
	PBP5f	R39
<b>6</b>	75	100
<b>7</b>	86	100

Iz podatkov v preglednici lahko ugotovimo, da imata obe testirani spojini slabo izraženo zaviralno delovanje na PBP5fm. Rezidualna aktivnost PBP ob prisotnosti spojine **6**, je znašala 75 %, pri spojini **7** pa 86 %. Odstotek rezidualne aktivnosti je prevelik, da bi lahko rekli, da sta spojini učinkoviti.

Raziskovalci v Centru za proteinski inženiring v Liegu so dokazali, da je ceftobiprol učinkovit tudi proti sevu *E. faecium* D63r, ki so ga uporabljali za svoje raziskave. Gre za sev, pri katerem se nemutirani PBP5fm proizvaja v večjih količinah (24). V večini kliničnih izolatov *E. faecium* pa je prisoten mutirani PBP5, za katerega je značilna odpornost na vse  $\beta$ -laktame, vključno s ceftobiprolom.(28, 48, 49) Glede na to, da naši testirani spojini izkazujeta zelo šibko aktivnost že na sevu D63r, lahko zaključimo, da pri zelo odpornih sevih *E. faecium* z mutiranim PBP5fm z monobaktami, ki posnemajo strukturo ceftobiprola, zelo verjetno ne bi dosegli boljših rezultatov. Spojini bi bilo priporočljivo testirati še na PBP2a, penicilin vezočem proteinu, ki je odgovoren za

odpornost na  $\beta$ -laktame pri MRSA, saj je dokazano občutljiv na delovanje ceftobiprola. Šele na podlagi teh rezultatov bi lahko dejansko sklepali, ali so spojine aktivne ali ne.

Za domnevno neučinkovitost je morda odgovorna premajhna kompleksnost substituenta na mestu 1. Pri sintetiziranih spojinah smo v primerjavi s ceftobiprolom ohranili le karboksilno kislino. Ceftobiprol pa ima na mestu 3 substituent z dvema heterocikloma in sistem dvojnih vezi (vinilogni fragment), ki je del bicikličnega sistema.

Pridobljeni eksperimentalni podatki za nabor testiranih spojin niso obetavni, so nam pa lahko v pomoč za nadaljnje načrtovanje potencialnih monobaktamskih zaviralcev PBP-jev. V prihodnje bi bilo najprej treba izboljšati sintezo derivatov z daljšimi alkilnimi verigami, ki povezujejo obročni dušik in karboksilno kislino, saj bi tako lahko določili, kako daljšanje verige vpliva na afiniteto do PBP. V drugi stopnji pa bi lahko postavili sintezo derivatov s kompleksnejšimi substituenti na mestu 1 z različnimi heterocikli v strukturi.

## 6 SKLEP

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali disubstituirane derivate azetidin-2-ona. Pri načrtovanju spojin smo kot osnovo uporabili strukturo ceftobiprola. Dvema sintetiziranima spojinama smo biokemijsko ovrednotili zaviralno delovanje na PBP5fm.

1. V prvem delu magistrske naloge smo sintetizirali spojino 3 ((*S*)-*tert*-butil (2-oksoazetidin-3-il)karbamat), ki je služila kot osnovna spojina za drugi del – sintezo disubstituiranih monobaktamov. Na laktamski dušik osnovne spojine smo uvedli etil propionatni fragment. Sledila je odščita Boc skupine z amina in tvorba amida z dvema različnima kislinama. V zadnji stopnji smo hidrolizirali ester na alkilnem fragmentu, ki je vezan na obročni dušik, tako da smo dobili prosto COOH skupino.
2. Na laktamski dušik osnovne spojine smo želeli uvesti tudi metil akrilatni in metil butanoatni fragment, vendar s sintezami nismo bili uspešni zaradi premajhnih izkoristkov.
3. Da bi lahko v prihodnje določili, kako daljšanje alkilne verige na laktamskem dušiku vpliva na afiniteto do PBP, bi bilo najprej treba optimizirati sintezo derivatov z različnimi alkilnimi verigami.
4. Izolacija v vseh stopnjah sinteze disubstituiranih spojin iz osnovne spojine potrebuje nadaljnje izboljšave.
5. Spojini **6** in spojini **7** smo preverili učinkovitost, tako da smo določili njuno zaviralno aktivnost na dveh različnih PBP. PBP5fm je bil izoliran iz rezistentnega seva *Enterococcus faecium* D63r, R39 pa iz nerezistentnega seva bakterij iz rodu *Actynomadura*. Biokemijsko ovrednoteni spojini izkazujeta šibko zaviralno delovanje na uporabljenih PBP. Kljub temu pa so dobljeni rezultati in sintezni postopki za pripravo teh derivatov v pomoč za nadaljnje načrtovanje potencialnih zaviralcev PBP.
6. Zaviralno delovanje vseh štirih končnih spojin (spojine **6**, **7**, **8**, **9**) bi bilo potrebno testirati vsaj še na PBP2a iz na meticilin odpornega *Staphylococcus aureus*, saj ceftobiprol dokazano deluje nanj in posledično lahko pričakujemo močnejše zaviralno delovanje sintetiziranih spojin kot pri PBP5fm.
7. V prihodnje bi lahko izvedli sintezo derivatov s kompleksnejšimi substituenti na mestu 1 z različnimi heterocikli v strukturi (pirol, pirolidin), s čimer bi veliko bolje posnemali strukturo ceftobiprola.

## LITERATURA

1. Mossialos, E.: Policies and incentives for promoting innovation in antibiotic research, WHO, Geneva, cop. 2010: 9-58, 137-158
2. Lecture 6: Antimicrobial drugs, dostopno na URL [http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/6\\_antimicrobials/lecture\\_6L.htm](http://spot.pcc.edu/~jvolpe/b/bi234/lec/6_antimicrobials/lecture_6L.htm) (01. 05. 2016, 16:30).
3. Patrick, Graham L.: An introduction to medicinal chemistry, 3rd ed., Oxford University Press, Oxford, 2005: 379-438
4. Orožen Adamič, A., Serneč, K.: Mikrobiologija. Učbenik za 2. letnik programov Farmaceutski in kozmetični tehnik, 1. izdaja, DZS, Ljubljana, 2005: 12.
5. Eukaryotic Cell vs. Prokaryotic Cell, dostopno na URL [http://www.diffen.com/difference/Eukaryotic\\_Cell\\_vs\\_Prokaryotic\\_Cell](http://www.diffen.com/difference/Eukaryotic_Cell_vs_Prokaryotic_Cell) (01. 05. 2016, 15:30).
6. Differences between Prokaryotic and Eukaryotic Cells, dostopno na URL <http://www.getmededu.com/differences-between-prokaryotic-and-eukaryotic-cells.html> (01. 05. 2016, 15:32).
7. Lewin's cells, 2nd ed., Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, 2011: 891.
8. Williams, David A., Lemke, Thomas L.: Foye's principles of medicinal chemistry, 5th ed., Williams & Wilkins, Baltimore, cop. 2002: 819-864
9. Stušek, P., Podobnik, A.: Celica, 1. izdaja., DZS, Ljubljana, 1995: 119.
10. Sauvage, E., Kerff, F., Terrak, M., Ayala, J. A. Charlier, P.: The penicillin-binding proteins: Structure and role in peptidoglycan biosynthesis. FEMS Microbiology Reviews, 2008; 32: 234–258.
11. Dostopno na URL <https://classconnection.s3.amazonaws.com/795/flashcards/914795/jpg/picture61334515648235.jpg> (01. 05. 2016, 16:50).
12. Macheboeuf, P., Contreras-Martel, C., Job, V., Dideberg, O.: Penicillin Binding Proteins : key players in bacterial cell cycle and drug resistance processes. FEMS Microbiology Reviews, 2006; 30: 673–691.
13. Peptidoglycan Biosynthesis, dostopno na URL <http://www2.warwick.ac.uk/fac/sci/lifesci/research/droper/> (08. 10. 2016, 19:34).

14. Mikrobiološki simpozij z mednarodno udeležbo (2001 ; Ljubljana): Mikrobi in antibiotiki 2001 : [zbornik predavanj], Sekcija za klinično mikrobiologijo in hospitalne infekcije SZD, Ljubljana, 2001: 17-47
15. Contreras-Martel, C., Dahout-Gonzalez, C., Martins, A. D. S., Kotnik, M., Dessen, A.: PBP Active Site Flexibility as the Key Mechanism for  $\beta$ -Lactam Resistance in Pneumococci. *Journal of Molecular Biology*, 2009; 387: 899–909.
16. Singh, G. S.:  $\beta$  -Lactams in the New Millennium . Part-I: Monobactams and Carbapenems. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 2004; 4: 69–92.
17. Strokovno izpopolnjevanje magistrov farmacije (2005 ; Ljubljana): Zdravila za sistemsko zdravljanje infekcij : [zbornik prispevkov], Lekarniška zbornica Slovenije, Ljubljana, 2005: 39-46
18. Georgopapadaku, N. H., Smith, S. A., Cimarusti, C. M., Sykes, R. B.: Binding of Monobactams to Penicillin-Binding Proteins of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*: Relation to Antibacterial Activity. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1983; 23: 98–104.
19. Arya, N., Jagdale, A. Y., Patil, T. A., Yeramwar, S. S., Holikatti, S. S., Dwivedi J., Shishoo C. J., Jain, K. S.: The chemistry and biological potential of azetidin-2-ones. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 2014; 74: 619–656.
20. Alanis, A. J.: Resistance to antibiotics: Are we in the post-antibiotic era?. *Archives of Medical Research*, 2005; 36: 697–705.
21. Bush, K., Pucci, M. J.: New antimicrobial agents on the horizon. *Biochemical Pharmacology*, 2011; 82: 1528–1539.
22. Goffin, C., Ghuysen, J. M.: Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiology And Molecular Biology Reviews*, 1998; 62: 1079–1093.
23. Guignard, B., Entenza, J. M., Moreillon, P.: Beta-lactams against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Current Opinion in Pharmacology*, 2005; 5: 479–489.
24. Henry, X., Amoroso, A., Coyette, J., Joris, B.: Interaction of ceftobiprole with the low-affinity PBP 5 of *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010; 54: 953–955.
25. Rice, L. B., Carias, L. L., Hutton, T. R., Sifaoui, F., Gutmann, L., Rudin, S.D.: Penicillin-Binding Protein 5 and Expression of Ampicillin Resistance in *Enterococcus faecium*. *Antimicrobial Agents and Chemoterapy*, 2001; 45: 1480–1486.

26. Lambert, P. A.: Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2005; 57: 1471–1485.
27. Henry, X., Verlaine, O., Amoroso, A., Coyette, J., Frère, J. M., Joris, B.: Activity of ceftaroline against *Enterococcus faecium* PBP5, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2013; 57: 6358–6360.
28. Fritsche, T. R., Sader, H. S., Jones, R. N.: Antimicrobial activity of ceftobiprole, a novel anti-methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cephalosporin, tested against contemporary pathogens: results from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (2005-2006). *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2008; 61: 86–95.
29. Page, M. G. P.: Anti-MRSA beta-lactams in development. *Current opinion in pharmacology*, 2006; 6: 480–485.
30. Deresinski, S.C.: The efficacy and safety of ceftobiprole in the treatment of complicated skin and skin structure infections: evidence from 2 clinical trials. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2008; 61: 103–109.
31. Jacqueline, C., Caillon, J., Le Mabecque, V., Miègeville, A. F., Hamel, A., Bugnon D., Ge J. Y., Potel, G.: In vivo efficacy of ceftaroline (PPI-0903), a new broad-spectrum cephalosporin, compared with linezolid and vancomycin against methicillin-resistant and vancomycin-intermediate *Staphylococcus aureus* in a rabbit endocarditis model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2007; 51: 3397–3400.
32. Koga, T., Abe, T., Inoue, H., Takenouchi, T., Kitayama, A., Yoshida, T., Masuda, N., Sugihara, C., Kakuta, M., Nakagawa, M., Shibayama, T., Matsushita Y., Hirota, T., Ohya, S., Utsui, Y., Fukoka, T., Kuwahara, S.: In vitro and in vivo antibacterial activities of CS-023 (RO4908463), a novel parenteral carbapenem. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2005; 49: 3239–3250.
33. Discovery, D., Medicine, T.: Biopharmas Drive Antibiotic Development, dostopno na URL <http://www.genengnews.com/gen-articles/biopharmas-drive-antibiotic-development/4966/> (28.04.2016, 20:26)
34. Mattingly, P. G., Miller, M. J.: Titanium trichloride reduction of substituted N-hydroxy-2-azetidinones and other hydroxamic acids. *The Journal of Organic Chemistry*, 1980; 45: 410-415
35. Valeur, E., Bradley, M.: Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society reviews*, 2009; 38: 606–31.



36. Montalbetti, C. A. G. N., Falque, V.: Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 2005; 61: 10827–10852.
37. Anderluh, M., Mravljak, J., Perdih, A., Sova, M., Pečar, S.: *Farmacevtska kemija III : vaje in seminarji*. Fakulteta za farmacijo, Ljubljana, 2010: 7
38. Rupnik, A.: Načrtovanje in sinteza derivatov azetidin-2-ona kot potencialnih zaviralcev penicilin vezočih proteinov iz rezistentnih sevov. Magistrska naloga. Ljubljana: Univerza v Ljubljani, 2014.
39. Kokare, N. D., Nagawade, R. R., Rane, V. P., Shinde, D. B.: Design, synthesis and utilization of a novel coupling reagent for the preparation of O-alkyl hydroxamic acids. *Tetrahedron Letters*, 2007; 48: 4437–4440.
40. Swamy, K. C. K., Kumar, N. N. B., Balaraman, E., Kumar, K. V. P. P.: Mitsunobu and Related Reactions : Advances and Applications Mitsunobu and Related Reactions : Advances and Applications. *Chemical reviews*, 2009; 109: 2551 – 2651.
41. Jantzi K., The Mitsunobu Reaction, dostopno na URL <http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.693.5330&rep=rep1&type=pdf> (01. 05. 2016, 23:00).
42. Allen, C. F. H., VanAllan, J.: m-tolylbenzylamine. *Organic Syntheses*, 1955; vol. 3: 827
43. Palomo, C., Aizpurua, J. M., Benito, A., Miranda, I., Fratila, R. M., Matute, C., Linden, A.: Development of a New Family of Conformationally Restricted Peptides as Potent Nucleators of  $\beta$ -Turns. Design, Synthesis, Structure and Biological Evaluation of a  $\beta$ -Lactam Peptide Analogue of Melanostatin. *Journal of the American Chemical Society*, 2003; 125: 16243–16260
44. Boc Deprotection (TFA), dostopno na URL [http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn\\_Pages/Boc\\_Protection/Boc\\_Protection\\_TFA\\_Mech.htm](http://www.commonorganicchemistry.com/Rxn_Pages/Boc_Protection/Boc_Protection_TFA_Mech.htm) (29. 04. 2016, 20:24).
45. Wuts, P. G. M., Greene, T. W.: *Greene's protective groups in organic synthesis*, 4th ed., Wiley-Interscience, Hoboken, 2007: 758.
46. Prabakaran, K., Khan, F. N., Jin, J. S.: An efficient 2-(1H-benzotriazole-1-yl)-1,1,3,3-tetramethyluronium tetrafluoroborate (TBTU)-mediated synthesis of 5-(trifluoromethyl)-N-alkyl-1-(3-phenylisoquinoline-1-yl)-1H-pyrazole-4-carboxamides. *Research on Chemical Intermediates*, 2012; 38: 615–627.
47. Guanti, G., Riva, R., Cascio, G., Manghisi, E., Morandotti, G., Satta, G., Sperring, R.: A new class of cis-monobactam derivatives bearing a sulfamoyloxymethyl or an N-

- alkylsulfamoyloxymethyl group at position 4: Synthesis and antibacterial activity. *Il Farmaco*, 1998; 53: 173–180.
48. Hebeisen, P., Heinze K, I., Angehrn, P., Hohl, P., Page, M. G. P., Then, R. L.: In Vitro and In Vivo Properties of Ro 63-9141, a Novel Broad- Spectrum Cephalosporin with Activity against Methicillin-Resistant Staphylococci, 2001; 45: 825–836.
49. Farrell, D. J., Flamm, R. K., Sader, H. S., Jones, N.: Ceftobiprole Activity against over 60,000 Clinical Bacterial Pathogens Isolated in Europe, Turkey, and Israel from 2005 to 2010, 2014; 58: 3882–3888.