

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LARISA VIDMAR

**SINTEZA DERIVATOV 2-(2-KARBAMOIL-5-HIDROKSIFENOKSI)OCETNE
KISLINE Z ZAVIRALNIM DELOVANJEM NA ENCIM LIGAZO D-Ala:D-Ala**

MAGISTRSKA NALOGA
ENOVIT MAGISTRSKI ŠTUDIJ FARMACIJA

Ljubljana, 2016

UNIVERZA V LJUBLJANI
FAKULTETA ZA FARMACIJO

LARISA VIDMAR

**SINTEZA DERIVATOV 2-(2-KARBAMOIL-5-HIDROKSIFENOKSI)OCETNE
KISLINE Z ZAVIRALNIM DELOVANJEM NA ENCIM LIGAZO D-Ala:D-Ala**

SYNTHESIS OF 2-(2-CARBAMOYL-5-HYDROXYPHENOXY)ACETIC ACID
DERIVATIVES WITH INHIBITORY ACTIVITY ON THE ENZYME LIGASE
D-Ala:D-Ala

MAGISTRSKA NALOGA

Ljubljana, 2016

Magistrsko nalogo sem opravljala na Fakulteti za farmacijo na Katedri za farmacevtsko kemijo pod mentorstvom prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Roka Frlana, mag. farm. Spektroskopske meritve so bile opravljene na Fakulteti za farmacijo in Institutu Jožef Stefan v Ljubljani.

Zahvala

Ob tej priložnosti bi se rada zahvalila prof. dr. Alešu Obrezi, mag. farm., in asistentu dr. Roku Frlanu, mag. farm., za vse nasvete in pomoč pri izdelavi magistrske naloge. Zahvala gre tudi vsem ostalim zaposlenim na Fakulteti za farmacijo, ki so mi kakorkoli pomagali tekom študija.

Prav tako bi se rada zahvalila svojim staršem, sestri ter prijateljem, ki so mi skozi vsa leta študija stali ob strani, me spodbujali in podpirali.

Izjava

Izjavljam, da sem magistrsko nalogo izdelala samostojno pod mentorstvom prof. dr. Aleša Obreze, mag. farm., in somentorstvom asist. dr. Roka Frlana, mag. farm.

Ljubljana, 2016

Larisa Vidmar

Predsednik magistrske komisije: prof. dr. Aleš Mrhar, mag. farm.

Član magistrske komisije: prof. dr. Aleš Obreza, mag. farm.

Član magistrske komisije: asist. dr. Rok Frlan, mag. farm.

Članica magistrske komisije: asist. dr. Jasna Omersel, mag. farm.

KAZALO VSEBINE

POVZETEK	V
ABSTRACT	VI
SEZNAM OKRAJŠAV	VII
1. UVOD	1
1.1. PROTIMIKROBNE UČINKOVINE	1
1.1.1. DELOVANJE PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN	1
1.1.2. BAKTERIJSKA REZISTENCA	3
1.2. PEPTIDOGLIKAN BAKTERIJ	4
1.2.1. VLOGA IN STRUKTURA PEPTIDOGLIKANA G+ IN G- BAKTERIJ	4
1.2.2. BIOSINTEZA PEPTIDOGLIKANA	6
1.3. ENCIM LIGAZA D-Ala:D-Ala	8
1.3.1. STRUKTURA LIGAZE D-Ala:D-Ala	9
1.3.2. ZAVIRALCI LIGAZE D-Ala:D-Ala	11
2. NAČRT DELA	15
3. MATERIALI IN METODE	17
3.1. MATERIALI	17
3.2. METODE	17
4. EKSPERIMENTALNO DELO	19
4.1. Sinteza 2-[5-hidroksi-(3-oksopiperazin-1-karbonil)fenoksi]ocetne kisline (10)	19
4.1.1. Sinteza benzil 2-[5-benziloksi-2-(3-oksopiperazin-1-karbonil)fenoksi]acetata (9)	19
4.1.2. Sinteza 2-[5-hidroksi-(3-oksopiperazin-1-karbonil)fenoksi]ocetne kisline (10)	20
4.2. Sinteza N-[2-(dimetilamino)etil]-2-[2-[2-(dimetilamino)etilamino]-2-okso-etoksi]-4-hidroksi-benzamida (12)	22
4.2.1. Sinteza 4-benziloksi-N-[2-(dimetilamino)etil]-2-[2-[2-(dimetilamino)etilamino]-2-okso-etoksi]benzamida (11)	22
4.2.2. Sinteza N-[2-(dimetilamino)etil]-2-[2-[2-(dimetilamino)etilamino]-2-okso-etoksi]-4-hidroksi-benzamida (12)	23
4.3. Sinteza 2-[5-benziloksi-2-[(4-metilpiperazin-1-il)karbamoil]fenoksi]ocetne kisline (14)	24
4.3.1. Sinteza benzil 2-[5-benziloksi-2-[(4-metilpiperazin-1-il)karbamoil]fenoksi]acetata (13)	24

4.3.2.	Sinteza 2-[5-benziloksi-2-[(4-metilpiperazin-1-il)karbamoil]fenoksi]ocetne kisline (14)	26
4.4.	Sinteza 2-[5-benziloksi-2-(4-hidroksipiperidin-1-karbonil)fenoksi]ocetne kisline (16)	27
4.4.1.	Sinteza benzil 2-[5-benziloksi-2-(4-hidroksipiperidin-1-karbonil)fenoksi]acetata (15)	27
4.4.2.	Sinteza 2-[5-benziloksi-2-(4-hidroksipiperidin-1-karbonil)fenoksi]ocetne kisline (16)	28
4.5.	Sinteza 2-[5-hidroksi-2-(3-hidroksipiperidin-1-karbonil)fenoksi]ocetne kisline (18)	29
4.5.1.	Sinteza benzil 2-[5-benziloksi-2-(3-hidroksipiperidin-1-karbonil)fenoksi]acetata (17)	29
4.5.2.	Sinteza 2-[5-hidroksi-2-(3-hidroksipiperidin-1-karbonil)fenoksi]ocetne kisline (18)	30
4.6.	Sinteza 2-[5-hidroksi-2-[(2-oksoazepan-3-il)karbamoil]fenoksi]ocetne kisline (20)	32
4.6.1.	Sinteza benzil 2-[5-benziloksi-2-[(2-oksoazepan-3-il)karbamoil]fenoksi]acetata (19)	32
4.6.2.	Sinteza 2-[5-hidroksi-2-[(2-oksoazepan-3-il)karbamoil]fenoksi]ocetne kisline (20)	33
4.7.	Sinteza 2-[2-[(1-<i>terc</i>-butoksikarbonilpirolidin-3-il)karbamoil]-5-hidroksi-fenoksi]ocetne kisline (24)	35
4.7.1.	Sinteza 1-(<i>terc</i> -butoksikarbonil)pirolidin-3-amonijevega klorida (8)	35
4.7.2.	Sinteza <i>terc</i> -butil-3-[[4-benziloksi-2-(2-benziloksi-2-okso-etoksi)benzoi]amino]pirolidin-1-karboksilata (23)	36
4.7.3.	Sinteza 2-[2-[(1- <i>terc</i> -butoksikarbonilpirolidin-3-il)karbamoil]-5-hidroksi-fenoksi]ocetne kisline (24)	37
5.	RAZPRAVA IN REZULTATI	39
5.1.	RAZPRAVA SINTEZNIH POSTOPKOV	39
5.2.	BIOKEMIJSKO TESTIRANJE	46
6.	SKLEP	48
7.	VIRI IN LITERATURA	50

KAZALO SLIK IN PREGLEDNIC

Slika 1: Tarčna mesta delovanja posameznih skupin protimikrobnih učinkovin _____	2
Slika 2: Primarna struktura peptidoglikana pri G+ in G- bakterijah _____	5
Slika 3: Sestava celične stene G+ bakterij _____	5
Slika 4: Sestava celične stene G- bakterij _____	6
Slika 5: Shema sintezne poti UDP-MurNAc pentapeptida iz fruktoze-6-fosfata in mesta delovanja encimov, ki so v sintezo vključeni _____	7
Slika 6: Reakcija, ki jo katalizira encim ligaza D-Ala:D-Ala _____	9
Slika 7: Tridimenzionalna struktura DdIB (<i>E. coli</i>) z ADP in fosfinatnim zaviralcem v aktivnem mestu ____	10
Slika 8: Uvedba benzilne zaščite na hidroksilno skupino (nukleofilna S _N 2 substitucija na benzilnem ogljiku) _____	39
Slika 9: Uvedba benzilne zaščite na karboksilno skupino z uporabo p-toluensulfonske kisline _____	39
Slika 10: Prikaz aktivacije –OH skupine (–OH* = aktivirana –OH skupina), ki je pogoj za nadaljnjo tvorbo amidne vezi _____	40
Slika 11: Mehanizem delovanja EDC _____	41
Slika 12: Mehanizem delovanja HOBt _____	41
Slika 13: Katalitsko hidrogeniranje z uporabo kovinskega katalizatorja paladija _____	43
Slika 14: Nukleofilni napad obročnega dušika na elektrofilno skupino anhidrida (ogljik karbonilne skupine) pri uvajanju Boc zaščite na 3-aminoprolidinijev diklorid _____	45
Preglednica I: Prikaz rezultatov biokemijskega testiranja _____	45

POVZETEK

Zaradi razširjene uporabe antibiotikov so bakterije začele razvijati različne mehanizme odpornosti. Pojavili so se bakterijski sevi, ki so odporni na večino protimikrobnih učinkovin v trenutni klinični uporabi in predstavljajo resno grožnjo javnemu zdravju. Potreba po razvoju novih protibakterijskih učinkovin, ki bi delovale na slabo izkoriščena tarčna mesta, zato naglo narašča. Zanimiva tarča za antibiotično terapijo je sintezna pot peptidoglikana, pri kateri sodeluje tudi encim ligaza D-Ala:D-Ala, ki zaradi svoje specifičnosti in pomembnosti za rast bakterij predstavlja želeno ciljno mesto delovanja zaviralcev biosinteze peptidoglikana.

V okviru magistrske naloge smo načrtovali derivate 2-(2-karbamoil-5-hidroksifenoksi)ocetne kisline, ki bi zavirali delovanje ligaze D-Ala:D-Ala, encima, ki katalizira nastanek dipeptida D-Ala-D-Ala. Ta predstavlja končni del UDP-MurNAc-pentapeptidnih prekursorskih enot in je pomemben za zunajcelično fazo sinteze peptidoglikana. Vse spojine smo pripravljali po postopku sklopitvenih reakcij, s katerimi smo tvorili amidno vez med izhodno kislino in amini. Reakcije smo izvajali v mikrovalovnem reaktorju na Fakulteti za farmacijo. V drugem delu smo s katalitskim hidrogeniranjem odstranili benzilni zaščitni skupini. Sintetizirali smo 6 potencialnih zaviralcev ligaze D-Ala:D-Ala, za katere pa je biokemijsko testiranje pokazalo, da nimajo zaviralne aktivnosti na encim DdlB bakterije *E. coli*.

Ključne besede: razširjena uporaba antibiotikov, sintezna pot peptidoglikana, ligaza D-Ala:D-Ala, 2-(2-karbamoil-5-hidroksifenoksi)ocetna kislina, dipeptid D-Ala-D-Ala

ABSTRACT

Due to the widespread use of antibiotics, the bacteria began to develop different mechanisms of resistance. The development of bacterial strains resistant to most antimicrobial substances in current clinical use poses a serious threat to public health. The need for new antibacterial agents that act on underexplored targets is growing rapidly. An interesting target for antibiotic therapy is the synthesis of peptidoglycan, in which enzyme ligase $D\text{-Ala:D-Ala}$ is one of the important participants. Due to its specificity and importance for the growth of bacteria, ligase $D\text{-Ala:D-Ala}$ represents the desired target site for inhibitors of peptidoglycan biosynthesis.

In the context of the master thesis we planned to synthesize derivatives of 2-(2-carbamoyl-5-hydroxyphenoxy)acetic acid with potential inhibitory activity on the ligase $D\text{-Ala:D-Ala}$, the enzyme that catalyzes the formation of the dipeptide $D\text{-Ala-D-Ala}$. This dipeptide represents the final part of the UDP-MurNAc-pentapeptide precursor units and is important to the extracellular phase of peptidoglycan synthesis. All our compounds were prepared using coupling reactions, which formed an amide bond between the starting acid and the amines. Reactions were carried out in a microwave reactor at the Faculty of Pharmacy. In the second part we removed benzyl protecting groups by catalytic hydrogenation. We synthesized six potential inhibitors of ligase $D\text{-Ala:D-Ala}$, in which the biochemical testing showed that they do not have any inhibitory activity on the enzyme DdlB from *E. coli*.

Key words: widespread use of antibiotics, synthesis of peptidoglycan, ligase $D\text{-Ala:D-Ala}$, 2-(2-carbamoyl-5-hydroxyphenoxy)acetic acid, dipeptide $D\text{-Ala:D-Ala}$

SEZNAM OKRAJŠAV

ADP	adenozin-5'-difosfat
angl.	angleško
Ar	aromat
ATP	adenozin-5'-trifosfat
Boc	<i>t</i> -butiloksikarbonilna skupina
br	širok signal
bs	širok singlet
d	dublet
D-Ala	D-alanin
D-Ala-D-Ala	D-alanil-D-alanin
dd	dublet dubleta
ddd	dublet dublet dubleta
Ddl	D-Ala:D-Ala ligaza
D-Glu	D-glukoza
DMAP	4-dimetilaminopiridin
DMSO-d ₆	devteriran dimetilsulfoksid
DNA	deoksiribonukleinska kislina
EDC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilkarbodiimid
EtOAc	etilacetat
G-	po Gramu negativen
G+	po Gramu pozitiven
GlcNAc	<i>N</i> -acetilglukozamin
(Gly) ₅	pentaglicinski mostiček
HOBt	hidroksibenzotriazol
HPLC	tekočinska kromatografija visoke ločljivosti
IC ₅₀	srednja inhibitorna koncentracija
IR	infrardeča spektroskopija
L-Ala	L-alanin
L-Lys	L-lizin
m	multiplet
MeOH	metanol

<i>m</i> -DAP	<i>mezo</i> -diaminopimelinska kislina
mRNA	informacijska RNK
MRSA	na meticilin odporen <i>Staphylococcus aureus</i>
MS	masna spektrometrija
MurNAc	<i>N</i> -acetilmuraminska kislina
NADPH	nikotinamid adenin dinukleotid fosfat
NMR	jedrska magnetna resonanca
PEP	fosfoenolpiruvat
Ph	fenil
Pi	anorganski fosfat
RNA	ribonukleinska kislina
s	singlet
Ser	serin
T	temperatura
t	triplet
td	triplet dubleta
TLC	tankoplastna kromatografija
Tyr	tirozin
UDP	uridin difosfat
UTP	uridin trifosfat

1. UVOD

Razširjena uporaba antibiotikov je povzročila, da so bakterije razvile različne mehanizme odpornosti. Povečana pojavnost patogenih bakterijskih sevov z visoko odpornostjo na zdravljenje z antibiotiki, predstavlja resno grožnjo javnemu zdravju (1). Pojav sevov, odpornih na večino protimikrobnih učinkovin v trenutni klinični uporabi, je ustvaril nujno potrebo po razvoju novih zaviralcev biosinteze peptidoglikana, ki bodo delovali na tarčna mesta oz. encime, ki predhodno še niso bili izkoriščeni v terapiji (2).

1.1. PROTIMIKROBNE UČINKOVINE

Protimikrobne učinkovine so učinkovine, ki preprečujejo razvoj patogenih bakterij in drugih mikroorganizmov v človeškem organizmu. Antibiotiki so učinkovine naravnega ali polysinteznega izvora, medtem ko so kemoterapevtiki popolnoma sinteznega izvora. Glede na mehanizem delovanja protimikrobnih učinkovin ločimo bakteriostatike in baktericide. Prvi zavirajo rast in razmnoževanje bakterij, drugi pa jih ubijejo. Uporaba protimikrobnih učinkovin je pogojena s selektivno toksičnostjo, ki temelji na specifičnih biokemičnih razlikah med celico mikroorganizma in gostitelja. Učinkovine lahko povzročajo biokemično poškodbo v bakterijski steni, citoplazemski membrani ali v procesu celičnega metabolizma (3).

1.1.1. DELOVANJE PROTIMIKROBNIH UČINKOVIN

Protimikrobne učinkovine delujejo preko štirih glavnih mehanizmov (Slika 1) (3, 4):

1) zaviranje biosinteze celične stene

Peptidoglikan, ki ga najdemo le pri bakterijah, daje celični steni edinstveno sestavo in je zato odlična tarča protibakterijskih učinkovin. Med zaviralce izgradnje celične stene spadajo β -laktamski antibiotiki, glikopeptidi, karbapenemi in cikloserin.

2) sprememba prepustnosti celične membrane

Celična membrana bakterij je sestavljena predvsem iz fosfolipidov in proteinov, podobno kot membrana človeške celice. Polimiksini selektivno toksično delujejo na prepustnost bakterijske membrane, tako da jo povečajo in temu sledi propad bakterijske celice.

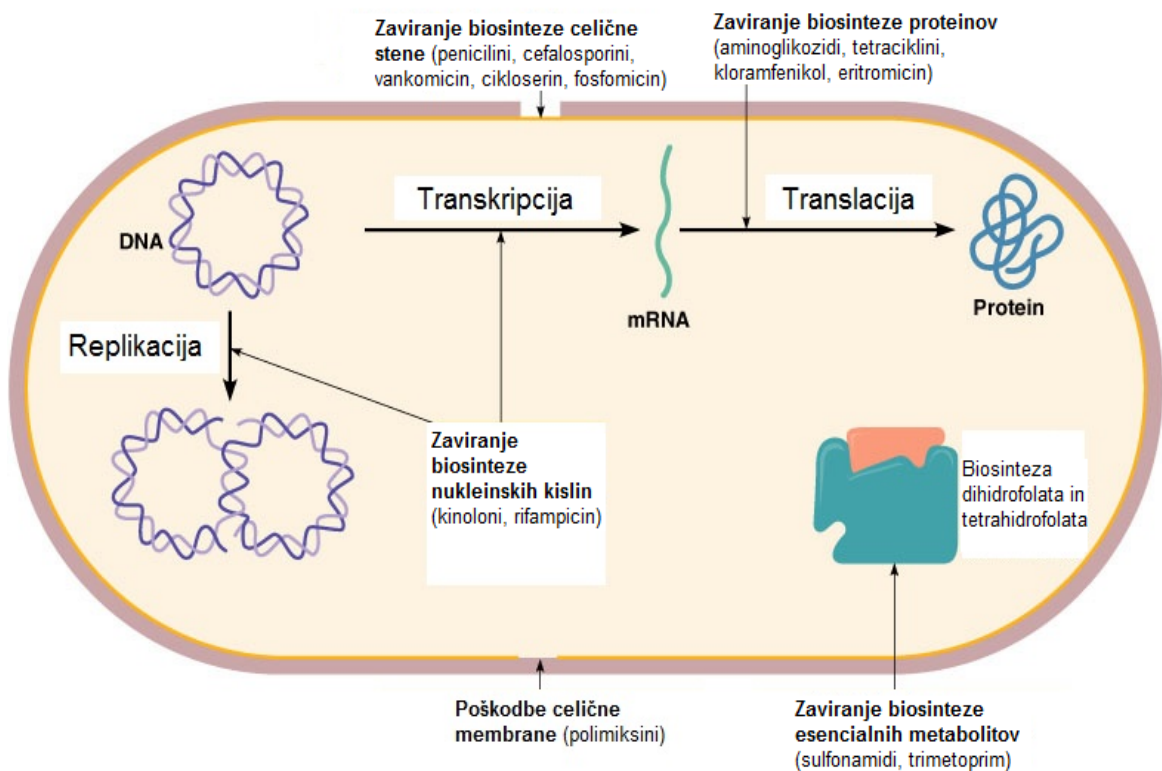
3) zaviranje biosinteze proteinov

Aminoglikozidi, tetraciklini, kloramfenikol in eritromicin zavirajo biosintezo proteinov na ribosomih, ki imajo pri bakterijah drugačno sestavo podenot kot pri eukariontih.

4) zaviranje biosinteze nukleinskih kislin (DNA, RNA)

Procesa podvajanja (replikacija) in prepisovanja (transkripcija) pri bakterijah potekata podobno kot pri človeku, vendar sta zaradi nekaterih manjših razlik dobri tarči za protimikrobna zdravila.

- Kinoloni zavirajo delovanje bakterijske topoizomeraze II oz. DNA-giraze, ki se nekoliko razlikuje od človeške, ter s tem preprečijo zvijanje DNA. So širokospektralni antibiotiki, učinkoviti predvsem proti G- bakterijam.
- Rifampicin je selektivni zaviralec bakterijske RNA-polimeraze G+ in G- bakterij.
- Ljudje vnašamo folno kislino s hrano, medtem ko jo morajo bakterije sintetizirati same iz 4-aminobenzojske kisline in jo pretvoriti v tetrahidrofolat. Sintezo pot folatov, ki so bistveni za nastanek nukleotidov, zavirajo sulfonamidi in trimetoprim.



Slika 1 (5): Tarčna mesta delovanja posameznih skupin protimikrobnih učinkovin.

1.1.2. BAKTERIJSKA REZISTENCA

Odpornost bakterij na antibiotike se v zadnjem času povečuje in postaja velik javni problem. Rezistenca je prirojena in se pojavi že pred izpostavljenostjo protibakterijski učinkovini, ali pa je odpornost pridobljena in se razvije po izpostavljenosti določenemu antibiotiku (6). Odpornost bakterij je lahko posledica štirih mehanizmov (7, 8):

- 1) encimska razgradnja antibiotika
- 2) sprememba v ciljnem mestu delovanja antibiotika in posledična zmanjšana vezavna kapaciteta
- 3) zmanjšana prepustnost celične membrane za vstop antibiotika v bakterijsko celico in/ali povečano aktivno izločanje iz celice
- 4) modifikacija presnovnih poti z namenom zmanjšanja antibiotičnega učinka oz. povečanje sinteze encimov, ki zdravilo spremenijo v neaktivno obliko (3)

Bakterijska odpornost je lahko posledica mutacije obstoječih genov ali pridobitev novih genov iz drugih vrst oz. sevov. Izmenjava rezistentnih genov poteka preko številnih mehanizmov. Pri prenosu lahko sodelujejo fagi, plazmidi ali transposoni (sekvence DNA, ki spreminjajo pozicijo znotraj genoma, spreminjajo njegovo velikost in ustvarjajo mutacije). V nekaterih okoliščinah je nizka raven antibiotika v okolju bakterije ključni signal za pospešen prenos genov, ki povzroči, da postane celotna mikrobna skupnost odporna na določeno protibakterijsko učinkovino (8, 9). Večina patogenih bakterij je razvila rezistenco proti najpogosteje uporabljanim antibiotikom. Nekateri sevi stafilokokov (npr. MRSA) in enterokokov so odporni na praktično vse trenutno dostopne antibiotike, zato so okužbe z njimi zelo nevarne ter lahko vodijo v smrt (4).

Nekritična uporaba protibakterijskih zdravil lahko povzroči razvoj odpornih sevov bakterij, spremembo normalne bakterijske flore, pojav preobčutljivosti proti zdravilu in pojav resnih toksičnih reakcij. Zato je pomembno, da se terapije lotimo racionalno z določitvijo pravega antibiotika in ustreznega načina odmerjanja. Zdravljenje je potrebno izvesti v celoti, brez prekinjanja, saj le tako preprečimo ponovitev bolezni (3).

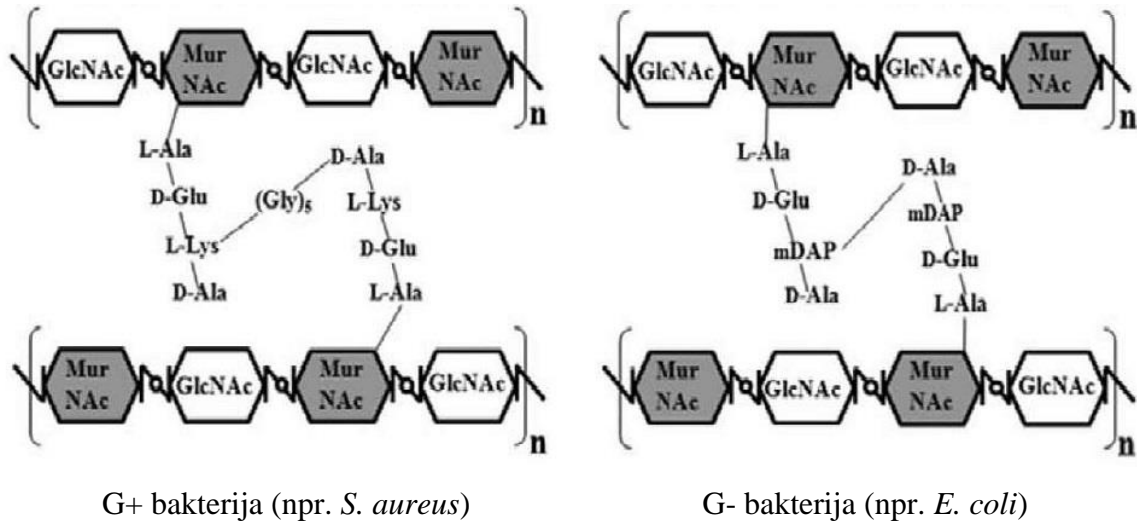
1.2. PEPTIDOGLIKAN BAKTERIJ

Ena od bolj zanimivih tarč za antibiotično terapijo je sintezna pot peptidoglikana. Pri izgradnji peptidoglikana prokariontov sodelujejo encimi, ki jih ne srečamo pri evkariontih. Učinkovine, ki zavirajo njegovo sintezo, imajo torej dobro selektivno toksičnost (1, 10).

1.2.1. VLOGA IN STRUKTURA PEPTIDOGLIKANA G+ IN G- BAKTERIJ

Peptidoglikan (murein) je najpomembnejši element bakterijske celične stene. Njegova glavna lastnost je ohranjanje celovitosti in mehanske odpornosti celice. Peptidoglikan pripomore k vzdrževanju določene celične oblike in s svojo trdnostjo zagotavlja preživetje celice v močno hipo- ali hipertoničnem okolju. Vpleten je v celično rast in njihovo delitev (10).

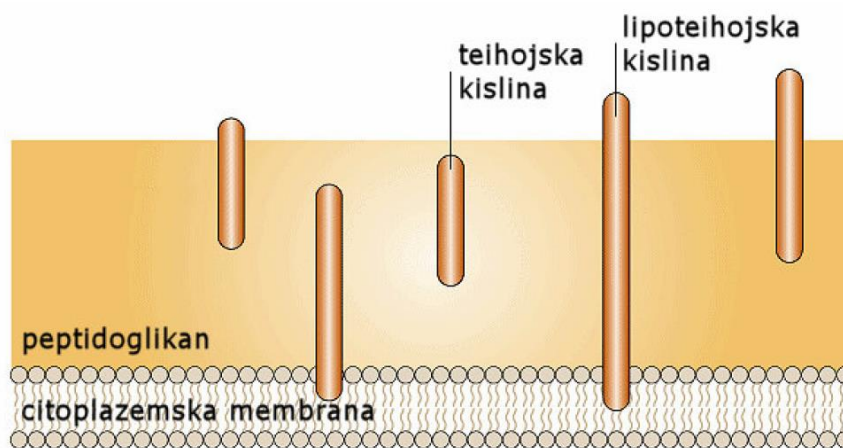
Glavni del peptidoglikana so linearne niti glikana, ki jih peptidne enote prečno povezujejo v močno mrežasto strukturo. Glikan je polimer, sestavljen iz ponavljajočega se zaporedja dveh aminosladkorjev, *N*-acetilglukozamina in *N*-acetilmuraminske kisline, ki sta povezana z 1,4- β glikozidno vezjo. *N*-acetilmuraminska kislina je derivat *N*-acetilglukozamina in ima na C-3 atomu preko etrske vezi pripeto *D*-laktilno skupino. Na karboksilno skupino vsakega ostanka muraminske kisline je pripeta veriga štirih aminokislin, ki so povezane s peptidno vezjo. Peptidno enoto najpogosteje tvorijo aminokislina *L*-alanil- γ -*D*-glutamil-*L*-lizil (ali *mezo*-diaminopimelinska kislina)-*D*-alanil-*D*-alanin, pri čemer je zadnji *D*-alanin pri končni makromolekuli odstranjen. Prečna povezava glikanov je ponavadi neposredna (*G*- bakterije) ali preko kratkih peptidnih mostov (*G*+ bakterije) med karboksilno skupino *D*-alanina na mestu 4 prve glikanske verige in prosto amino skupino *L*-lizina na mestu 3 sosednje verige (10, 11).



Slika 2 (12): Primarna struktura peptidoglikana pri G+ in G- bakterijah.

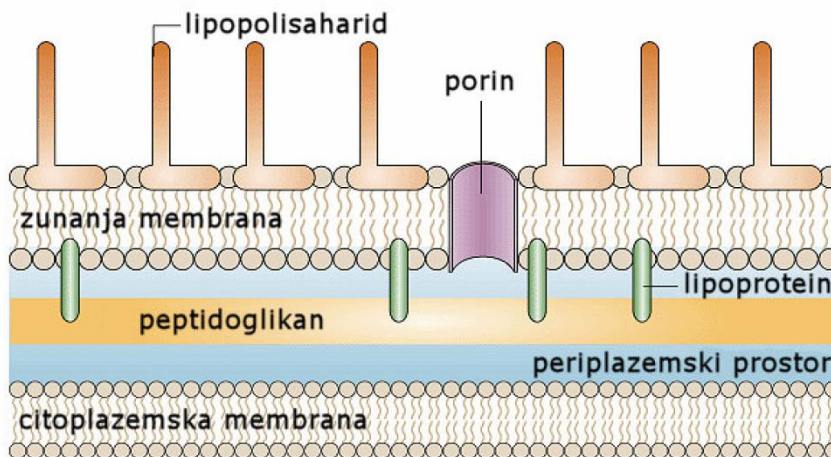
Pri G- bakterijah v prečnih povezavah glikanskih vlaken sodeluje okoli 20 % tetrapeptidnih verig, medtem ko je delež prečno povezanih tetrapeptidov pri G+ bakterijah lahko več kot 90 %. Do razlik v kemijski zgradbi peptidoglikana različnih bakterij prihaja na mestu 3 glikanske verige. Najbolj zastopana aminokislina tu je *mezo*-diaminopimelinska kislina, vendar so v veliko kokih, npr. v *Staphylococcus aureus*, našli tudi L-lizin (10).

Celično steno G+ bakterij lahko sestavlja do 40 plasti peptidoglikana in vsebuje tudi teihojske in lipoteihojske kisline, ki zaradi svojih fosfatnih, hidroksilnih in aaminskih skupin služijo kot ionsko-izmenjevalni sistem (10).



Slika 3 (13): Sestava celične stene G+ bakterij.

Zaradi razvoja čvrste, slabo prepustne, sekundarne zunanje membrane, najdemo pri G- bakterijah enoplasten peptidoglikan. Kemijsko je zunanja membrana lipopolisaharidno-fosfolipidno-proteinska struktura (10).



Slika 4 (13): Sestava celične stene G- bakterij.

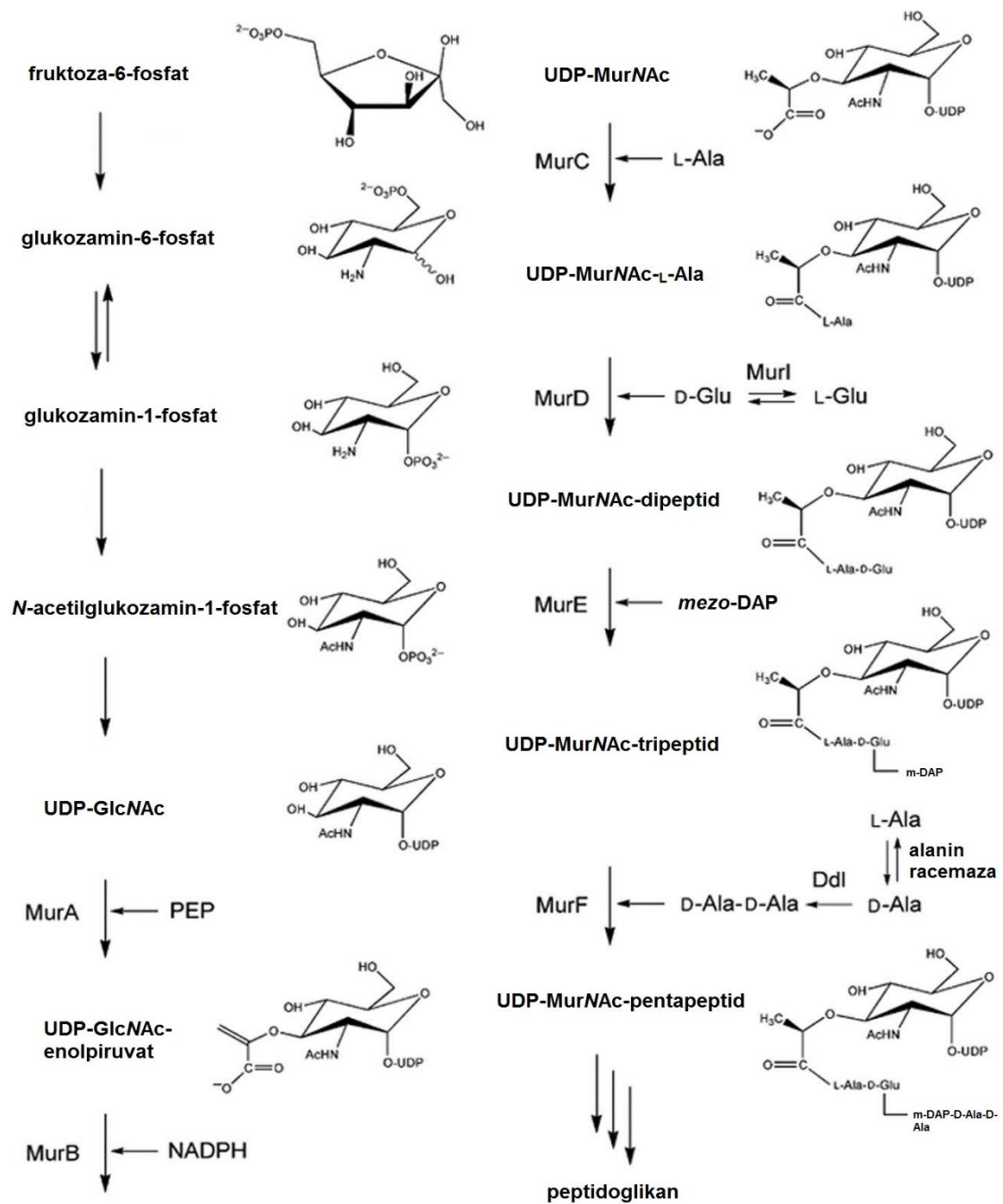
Osnovna zgradba peptidoglikana je, kljub nekaterim razlikam v sestavi celične stene G⁺ in G⁻ bakterij, pri obeh vrstah podobna. Motnja njegove biosinteze vodi v porušenje celične oblike in pomeni zagotovo smrt mikroorganizma (14).

1.2.2. BIOSINTEZA PEPTIDOGLIKANA

Biosinteza peptidoglikana je kompleksen tristopenjski proces, ki vključuje reakcije v citoplazmi (sinteza nukleotidnih prekurzorjev) ter na notranji (sinteza lipidnih nosilcev oz. intermediatov) in zunanji (reakcije polimerizacije – prehod prekurzorjev v celično steno) strani membrane bakterijske celice (15).

Reakcije v citoplazmi (Slika 5), ki jih katalizira kaskada encimov Mur, lahko razdelimo na naslednje 4 sklope (15):

- 1) sinteza UDP-GlcNAc iz fruktoza-6-fosfata
- 2) sinteza UDP-MurNAc iz UDP-GlcNAc (MurA, MurB)
- 3) sinteza UDP-MurNAc peptidov (MurC – MurF)
- 4) stranske sintezne poti nastanka D-glutaminske kisline in dipeptida D-Ala-D-Ala, ki je substrat encima MurF



Slika 5 (15): Shema sintezne poti UDP-MurNAc pentapeptida iz fruktoze-6-fosfata in mesta delovanja encimov, ki so v sintezo vključeni.

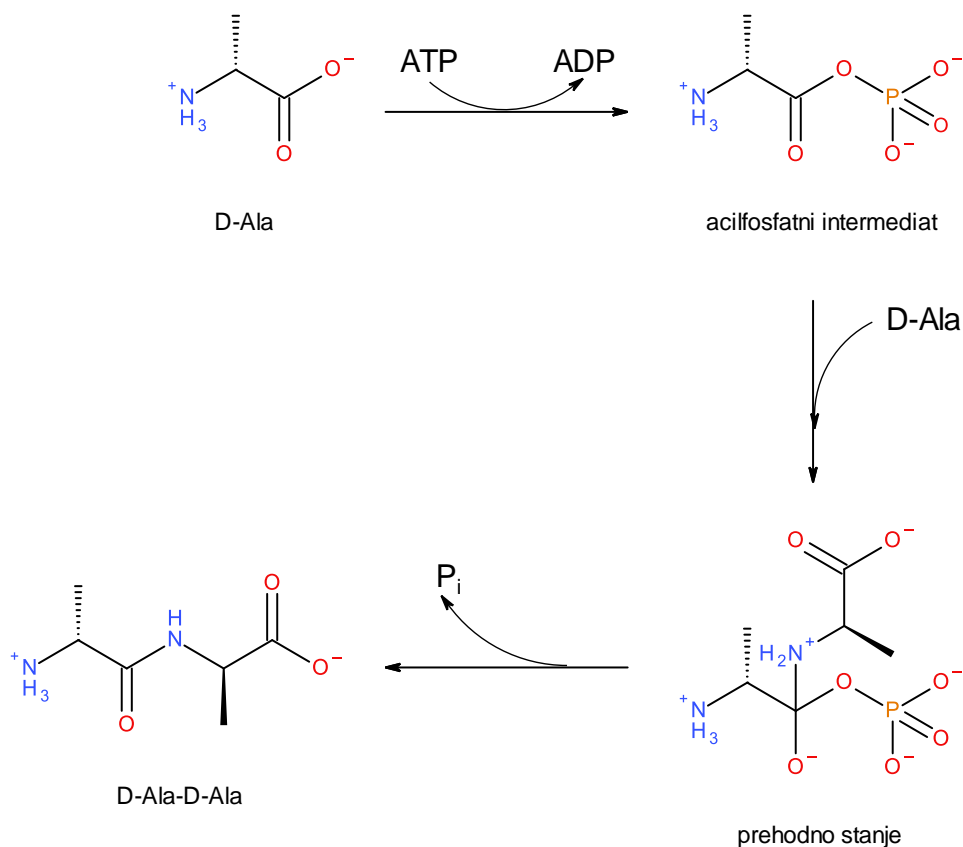
V drugi stopnji, ki poteka na citoplazemski membrani, se nastali prekurzor UDP-MurNAc-pentapeptid po odcepitvi uridin-monofosfata poveže z membranskim akceptorjem undekaprenil-fosfatom oz. baktoprenolom. Reakcijo, pri kateri nastane lipid I (MurNAc-pentapeptid-pirofosforil-undekaprenol), katalizira encim MraY. MurG nato na *N*-acetilmuraminski del lipida I pripne *N*-acetilglukozamin. Nastane lipid II, ki prenaša disaharidno enoto GlcNAc-1,4- β -MurNAc-L-Ala- γ -D-Glu-*m*-DAP (ali L-Lys)-D-Ala-D-Ala. Lipofilna molekula, kot je baktoprenol, omogoča prenos hidrofilnih prekurzorjev skozi hidrofobno membrano na zunanjo stran (16, 17).

Zadnja faza biosinteze peptidoglikana poteka na zunanji strani citoplazemske membrane in vključuje polimerizacijo na novo sintetiziranih disaharidnih enot ter njihovo vgrajevanje v že obstoječi peptidoglikan. Za to so potrebni penicilin vezoči proteini, ki katalizirajo nastanek glikanskih vlaken (transglikozilacija) in peptidnih vezi (transpeptidacija) znotraj peptidoglikana (16, 17).

1.3. ENCIM LIGAZA D-Ala:D-Ala

Za biosintezo peptidoglikana je poleg encimov (Mur, Glm) ključnih tudi veliko substratov. Večina jih je vključenih v razne metabolične poti (acetil koencim A, UTP, PEP, NADPH, ATP, L-amino kisline), medtem ko so drugi bolj specifični (15). L-alanin, D-glutaminska in *mezo*-diaminopimelinska kislina se povežejo z UDP-MurNAc s pomočjo encimov Mur. Kasneje se pripne še dipeptid D-Ala-D-Ala, ki nastane s pretvorbo L-alanina v D-alanin s pomočjo alanin-racemaze in encima ligaze D-Ala:D-Ala, ki katalizira od ATP odvisno reakcijo nastanka omenjenega dipeptida preko acilfosfatnega intermediata (Slika 6). D-Ala-D-Ala predstavlja končni del UDP-MurNAc-pentapeptidnih prekurzorskih enot in zato igra zelo pomembno vlogo v zunajcelični fazi sinteze peptidoglikana, kjer poteka navzkrižno povezovanje sosednjih peptidoglikanskih verig (18, 19).

Izmed vseh encimov, ki sodelujejo v prvi stopnji sinteze peptidoglikana, je Ddl zaradi svoje specifičnosti in pomembnosti za nemoteno rast bakterij, najbolj zanimiva (20).



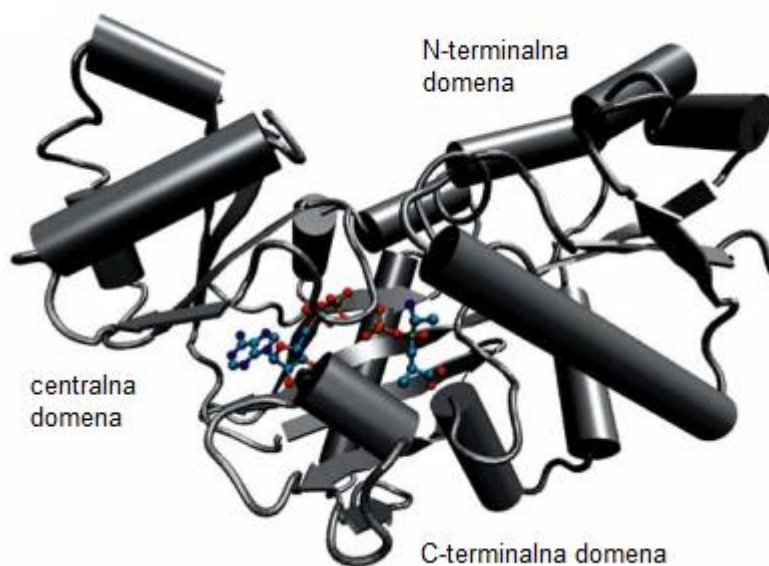
Slika 6: Reakcija, ki jo katalizira encim ligaza $D\text{-Ala:D-Ala}$.

1.3.1. STRUKTURA LIGAZE $D\text{-Ala:D-Ala}$

Ddl je bila prvič odkrita in izolirana iz *Enterococcus faecalis* v zgodnjih 60ih letih prejšnjega stoletja. Nadaljnje raziskovanje karakteristik encima ligaze $D\text{-Ala:D-Ala}$ pri G- in G+ bakterijah je prineslo različna spoznanja, med drugim tudi to, da se Ddl pri *E. coli* pojavlja v dveh izoformah, DdlA in DdlB, ki imata le 35 % podobnost v aminokislinskem zaporedju, a imata primerljive kinetične lastnosti, substratno specifičnost ter občutljivost za iste zaviralce (21).

Katalitični mehanizem DD -ligaz je bil prvič raziskan pri DdlB *E. coli*, na podlagi kristalne strukture pridobljene v prisotnosti ADP in analoga prehodnega stanja z zaviralnim delovanjem (Slika 7) (19). Struktura DdlB *E. coli* je veliko bolj raziskana, medtem ko kristalna struktura DdlA še ni v celoti poznana. DdlB razdelimo na tri α/β področja: *N*-terminalno, centralno in *C*-terminalno domeno. Sestavlja jo 306 aminokislin, *N*-domeno 96 aminokislinskih ostankov in *C*-domeno 210. DdlB spada v družino encimov, ki imajo

prisotno neobičajno nukleotidno vezavno mesto in hidrolizirajo ATP v ADP ter anorganski fosfat. V to družino med drugim spadata tudi biotin-karboksilaza in glutation-sintetaza. Celokupna kemijska reakcija, ki jo katalizirajo omenjeni encimi, je tvorba amidne vezi (Slika 6). *N*- in *C*-terminalna domena DdlB skupaj tvorita veliko osrednje jedro z mestom za vezavo substratov. Vezavno mesto v *N*-terminalnem delu ima visoko specifičnost za *D*-alanin, medtem ko vezavno mesto v *C*-terminalni domeni sprejme tudi ostale manjše desnosučne aminokisline. Med jedrom in centralno domeno se nahaja majhna razpoka, ki predstavlja vezavno mesto za ATP, dostopno s površine encima (21, 22, 23, 24). Vezavno mesto za ligand prekrivajo tri zanke. Pri DdlB *E. coli* so te zanke povezane preko vodikovih vezi med Glu15, Ser150 in Tyr216, ki se lahko prekinejo in nato znova povežejo. S tem se omogoči vstop ali izstop ligandov (19).



Slika 7 (19): Tridimensionalna struktura DdlB (*E. coli*) z ADP in fosfinatnim zaviralcem v aktivnem mestu. Na sliki je molekula ADP bolj desno, zaviralec pa levo.

Pretvorbo dipeptida *D*-Ala-*D*-Ala nazaj v *D*-alanin katalizira *DD*-dipeptidaza, ki so jo prvič odkrili pri enterokokih, odpornih na vankomicin. Encim prispeva k zmanjševanju nastajanja dipeptida *D*-Ala-*D*-Ala in vključevanju *D*-alanin-*D*-laktata v peptidoglikanske prekurzorje. Nekatere bakterije imajo namesto Ddl prisoten encim, ki katalizira nastanek dipeptida *D*-alanin-*D*-serina. Tako kot *D*-alanin-*D*-laktat, le-ta zmanjšuje afiniteto za vezavo protimikrobnih učinkovin, če je vključen v terminalni del UDP-MurNAc-pentapeptida.

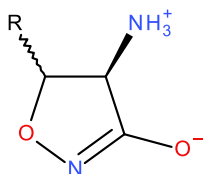
Takšne spremembe v strukturi pentapeptida so vzrok za odpornost mutiranih sevov bakterij, ki primarno vežejo D-serin in D-laktat (19, 25).

1.3.2. ZAVIRALCI LIGAZE D-Ala:D-Ala

Zadnjih 50 let so se oblikovale štiri kategorije zaviralcev Ddl: analogi substrata D-Ala, analogi dipeptida D-Ala-D-Ala, analogi prehodnega stanja in ostali (19).

Analogi substrata

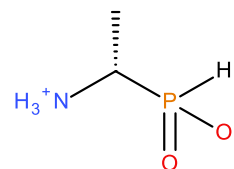
Najpomembnejši zaviralec Ddl je strukturni analog D-alanina, antituberkulotik D-cikloserin. Deluje kot kompetitivni reverzibilni zaviralec Ddl pri *S. aureus* (19). Študije so pokazale, da sta tako donorsko kot akceptorsko vezavno mesto encima občutljivi na D-cikloserin (26). Znana sta tudi dva analoga D-cikloserina: *cis*-D-ciklotreonin in *trans*-D-ciklotreonin. Mnoga leta se je D-cikloserin uporabljal za zdravljenje tuberkuloze, predvsem v kombinaciji z drugimi protimikrobnimi učinkovinami. Zaradi nevrotoksičnosti in pojava odpornosti bakterij sta se uporaba ter zanimanje zanj skoraj v celoti opustila. Nadomestile so ga učinkovitejše in bolj selektivno toksične učinkovine iz drugih farmakoloških razredov: D-(1-aminoetil)fosfonska kislina (D-Ala(P)) in njeni derivati, (1-aminoetil)boronska kislina (Ala-B), 1-(aminoetil)fosfinska kislina (19).



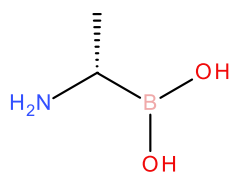
R = H (D-cikloserin)

R = *cis*-CH₃ (*cis*-D-ciklotreonin)

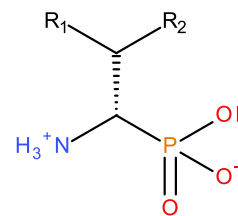
R = *trans*-CH₃ (*trans*-D-ciklotreonin)



1-(aminoetil)fosfinska kislina



Ala-B



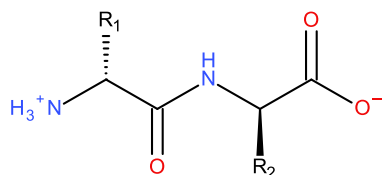
R₁ = H, R₂ = H (D-Ala(P))

R₁ = H, R₂ = Cl (Cl-Ala(P))

R₁ = Cl, R₂ = Cl (Cl₂-Ala(P))

Analogi dipeptida

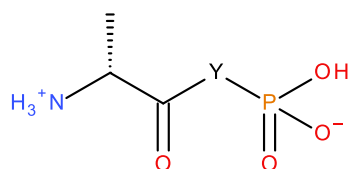
N-terminalni del Ddl ima visoko specifičnost za vezavo *D*-aminokislin, *C*-terminalni del pa nizko. To pripomore k sposobnosti encima za sintezo različnih dipeptidov, ki so boljši zaviralci kot sam *D*-Ala-*D*-Ala. Zaviralna lastnost je opažena le pri dipeptidih z *DD* konfiguracijo (19).



- $R_1 = \text{CH}_3$, $R_2 = \text{CH}_3$ (*D*-alanin-*D*-alanin)
- $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_3$ (*D*-alanin-*D*- α -amino-*n*-butanojska kislina)
- $R_2 = (\text{CH}_2)_2\text{CH}_3$ (*D*-alanin-*D*-norvalin)
- $R_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)_2$ (*D*-alanin-*D*-valin)
- $R_2 = \text{CH}_2\text{OH}$ (*D*-alanin-*D*-serin)
- $R_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{OH}$ (*D*-alanin-*D*-treonin)

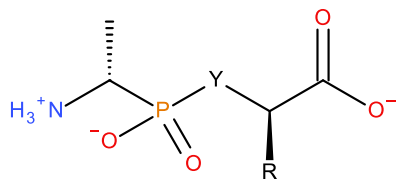
Analogi prehodnega stanja

Naslednji razred zaviralcev Ddl predstavljajo sintetični mimetiki *D*-Ala-*D*-Ala, (3-amino-2-oksoalkil)fosfonske kisline, ki posnemajo prehodno stanje encimsko katalizirane reakcije nastanka omenjenega dipeptida in služijo kot lažni substrati. Te zelo polarne spojine pa nimajo pomembnejše protibakterijske aktivnosti (19).



- $Y = \text{CH}_2$
- $Y = \text{NH}$
- $Y = E\text{-CH=CH}$

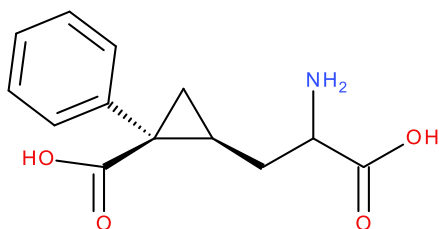
Najmočnejši zaviralec Ddl iz te skupine je 1(*S*)-aminoetil-(2(*R*)-karboksi-1-propil)fosfinska kislina ($Y = \text{CH}_2$, $R = \text{CH}_3$), ki se tesno veže v aktivno mesto. Splošna formula analogov tetraedričnega prehodnega stanja z zaviralnim delovanjem je:



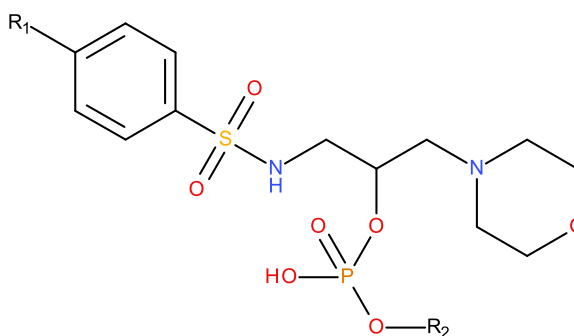
Zaradi oteženega prehoda v notranjost bakterijske celice je njihovo protibakterijsko delovanje le nekoliko boljše od D-cikloserina (19).

Ostali zaviralci Ddl

V zadnjih nekaj letih so raziskovalci s pomočjo novejših metod odkrili kar nekaj močnih zaviralcev Ddl, ki ne izkazujejo strukturne podobnosti s substratom D-Ala, dipeptidom D-Ala-D-Ala ali prehodnim stanjem. S pomočjo programa *de novo*, ki temelji na strukturnem načrtovanju molekul, sta bila identificirana dva nova razreda zaviralcev DdlB. Ciklopropanski zaviralec zavira le delovanje DdlB, medtem ko hidroksietilamini zavirajo tudi D-alanil-D-laktat ligazo. Za aktivnost slednjih je potrebna prisotnost fosfatne skupine (19).

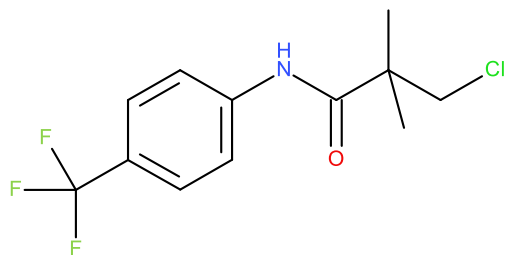


ciklopropanski zaviralec

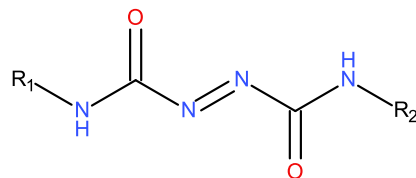


hidroksietilaminski skelet

Visokozmogljivostno reševanje je omogočilo odkritje nekompetitivnega alosteričnega zaviralca 3-kloro-2,2-dimetil-N-[4-(triflorometil)fenil] propanamida (struktura spodaj), ki se po načinu zaviralnega delovanja signifikantno loči od zgoraj omenjenih zaviralcev in tvori kompleks encim-substrat-zaviralec (27).



Pregledovanje knjižnične baze spojin je podalo ugotovitev, da tudi družina diazendikarboksamidov zavira Ddl. Najučinkovitejša spojina iz te serije ima IC₅₀ za DdlB (*E. coli*) 20-krat nižjo kot D-cikloserin (25). Ti zaviralci se strukturno razlikujejo od ADP in D-alanina, kar nakazuje na drugačno vezavo v aktivno mesto (19).

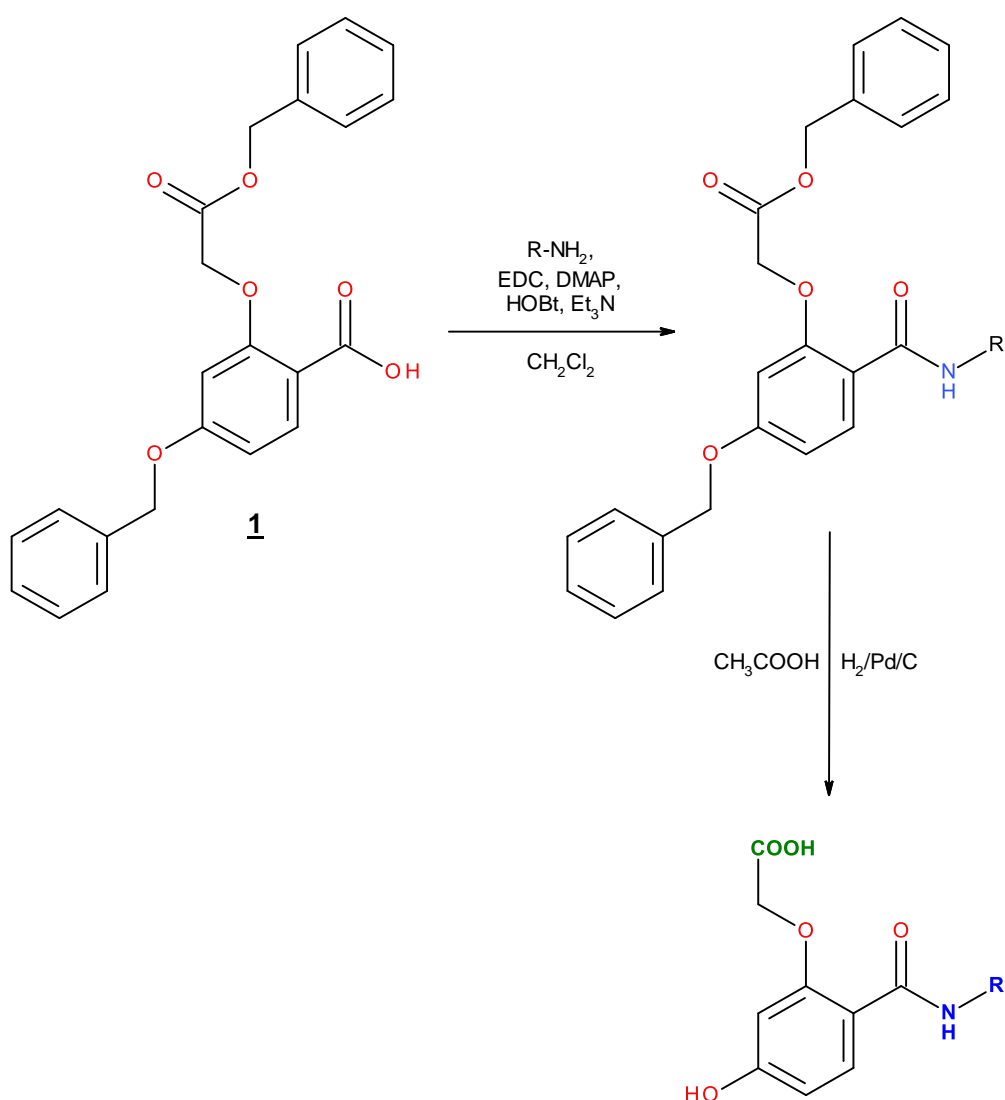


splošna formula diazenedikarboksamidov

Iskanje novih zaviralcev je v zadnjih letih privedlo do odkritja novih potencialnih protimikrobnih učinkovin z zaviralnim delovanjem na Ddl. Izmed klasičnih pristopov z uporabo analogov substrata in produkta, so se tisti zaviralci, ki posnemajo prehodno stanje, izkazali za najbolj učinkovite. Razvoj dejansko uporabnih učinkovin pa zahteva še veliko izboljšav, saj te zelo polarne molekule težko prehajajo skozi stene bakterijskih celic (19).

2. NAČRT DELA

Namen magistrske naloge je sintetizirati derivate 2-(2-karbamoil-5-hidroksifenoksi)ocetne kisline, ki bodo zavirali delovanje encima ligaza D-Ala:D-Ala. Pri tem bomo izhajali iz že sintetizirane 4-benziloksi-2-(benziloksikarbonilmetoksi)benzojske kisline (**1**), ki jo je pripravil in analiziral Matic Mikec v magistrski nalogi »Sinteza dihidroksibenzamidnih zaviralcev biosinteze peptidoglikana« (28). V prvem koraku bomo na prosto karboksilno skupino omenjene kisline (**1**) pripenjali različne amine z metodo sklopitvenih reakcij (angl. coupling). V drugi stopnji bomo izvedli katalitsko hidrogeniranje in se s tem znebili obeh zaščitnih benzilnih skupin.



S sintetiziranimi spojinami želimo optimizirati strukturo ter delovanje že znanih analogov prehodnega stanja encimsko katalizirane reakcije nastanka dipeptida D-Ala-D-Ala, ki

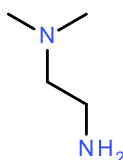
služijo kot lažni substrati. Modro obarvani aaminski del spojine na zgornji shemi bo posnemal *N*-terminalni del substratov in služil za vezavo v *N*-terminalno domeno, ki je zelo specifična za vezavo *D*-alanina. Zeleno obarvana -COOH skupina bo tvorila interakcije s *C*-terminalno domeno encima. Oba dela, tisti s karboksilno in tisti z amino skupino, sta pripeta na benzenov obroč, ki daje spojinam togost, hkrati pa nanj vezana -OH skupina tvori vodikove vezi z vezavnim mestom.

S pripenjanjem različnih aaminskih derivatov bomo poskušali izboljšati lipofilnost spojin in s tem olajšati njihov prehod v notranjost bakterijske celice. Hkrati je naš namen povečati sposobnost vezave in tvorjenja interakcij z aktivnim mestom encima Ddl ter posledično zavirati njegovo katalitsko aktivnost.

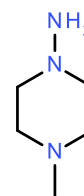
Amini za pripenjanje na izhodno spojino **1**.



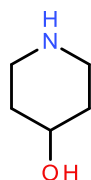
piperazin-2-on (**2**)



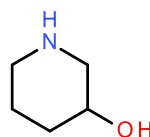
dimetiletilendiamin (**3**)



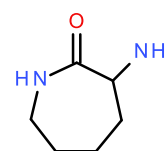
1-amino-4-metilpiperazin (**4**)



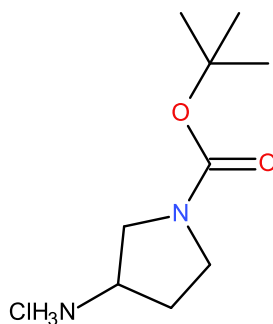
4-hidroksipiperidin (**5**)



3-hidroksipiperidin (**6**)



3-aminoazepan-2-on (**7**)



1-(*tert*-butoksikarbonil)pirolidin-3-amonijev klorid (**8**)

3. MATERIALI IN METODE

3.1. MATERIALI

Reagenti in topila

Sintezno delo v laboratoriju je obsegalo delo z reagenti in topili proizvajalcev Acros Organics, Sigma-Aldrich, Merck in Fluka.

Aparature

Standardna laboratorijska oprema: laboratorijska tehtnica, rotavapor, UV lučka, magnetni mešalnik, sušilnik za lase, hladilnik, pipete, grelna pištola, ultrazvočna kadička. Za hitrejši in selektivnejši potek reakcij smo uporabljali mikrovalovni reaktor CEM Discover.

3.2. METODE

Kromatografske metode

- *Tankoplastna kromatografija (TLC)*: Za spremljanje poteka reakcij smo uporabili TLC Silica gel 60 F₂₅₄ aluminijske plošče proizvajalca Merck. Spojine smo na kromatografskih ploščah detektirali z UV svetilko valovnih dolžin $\lambda = 254$ in $\lambda = 366$ nm ter orositvenimi reagenti (ninhidrin, bromkrezolno zeleno).
- *Kolonska kromatografija*: Uporabili smo jo za ločevanje in čiščenje določenih produktov, pri čemer smo za stacionarno fazo uporabili silikagel proizvajalca Merck z velikostjo delcev 0,040 – 0,063 mm.
- *Tekočinska kromatografija visoke ločljivosti (HPLC)*: Izvedli smo jo na sistemu Agilent Technologies 1100 z G1365B UV-VIS detektorjem (detekcija pri 220 nm, 254 nm, 280 nm; T = 25°C) z uporabo kolone Agilent EclipsePlus C18, 150×4.6 mm. Volumen injiciranja je znašal 5 μ L in pretok mobilne faze 1.0 ml/min.

Spektroskopske metode

- *Jedrska magnetna resonanca (NMR)*: ¹H in ¹³C spektri so bili posneti na spektrometru Bruker Avance III 400 MHz na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani. Vzorce smo raztopili v devteriranih topilih CDCl₃ in DMSO-d₆. Spektre smo obdelali s programom NMRNotebook 2.70 proizvajalca NMRtec S.A.S.

- *Infrardeča spektroskopija (IR)*: IR spektre spojin smo posneli na spektrometru FTIR Nexus proizvajalca NICOLET na Fakulteti za farmacijo Univerze v Ljubljani.
- *Masna spektrometrija (MS)*: Masne spektre so posneli na Watters Micromass Q-TOF Premier masnem spektrometru na Centru za masno spektrometrijo Inštituta Jožef Štefan v Ljubljani.

Določanje temperature tališča

Temperaturo tališč spojin smo določali s talilnim mikroskopom Leica z ogrevalno mizico.

Risanje in poimenovanje spojin

Za risanje spojin in njihovo poimenovanje smo uporabljali Accelrys Draw 4.2.

Biokemijsko vrednotenje spojin

Biokemijsko vrednotenje z določitvijo zaviralne aktivnosti sintetiziranih spojin na izoliranem encimu DdlB iz bakterije *E. coli* je opravila asist. dr. Martina Hrast, mag. farm. na Fakulteti za farmacijo v Ljubljani.

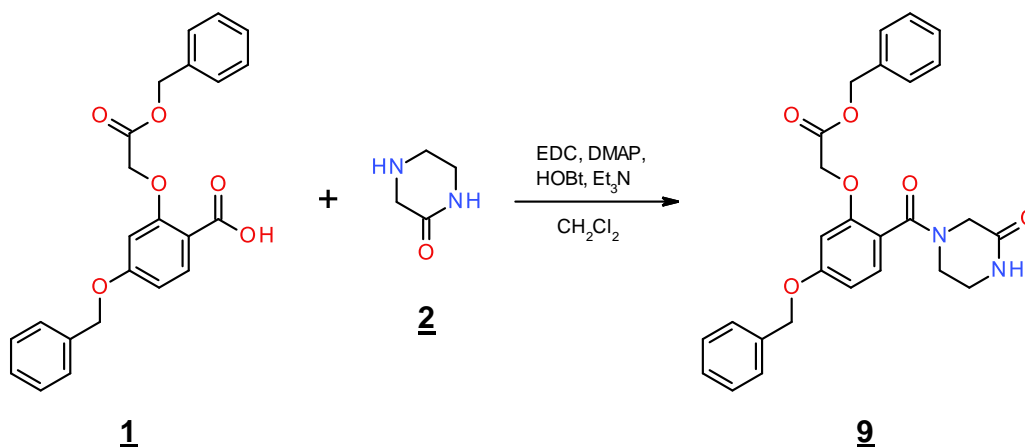
Ob nastanku vezi med karboksilno skupino UDP-prekurzorja in aminske skupine dipeptida D-Ala-D-Ala v prisotnosti ATP pride do nastanka ADP in P_i. Sproščeni anorganski fosfat lahko določimo s testom na osnovi barvila malahit zeleno. Po končani inkubaciji smo zmesi dodali reagent Biomol Green®, ki je modifikacija klasičnega malahitno zelenega reagenta z dodanim amonijevim molibdatom. Katalitično količino ovrednotimo na podlagi množine fosfata, ki se sprosti ob reakciji, pri čemer mora biti količina fosfata v linearnem območju umeritvene krivulje za fosfat. Ob dodatku zaviralcev se katalitična aktivnost encima DdlB zniža, zato je množina nastalega fosfata manjša v primerjavi s kontrolo brez zaviralca. Količino fosfata, ki se sprosti med reakcijo, določimo spektrofotometrično pri 650 nm, posredno na podlagi tvorbe zeleno obarvanega kompleksa z malahitno zelenim. Zaviralno delovanje spojine izrazimo z rezidualno aktivnostjo. Da bi izključili možno nespecifično zaviralno delovanje, so bile učinkovine testirane v prisotnosti detergenta (0,005 % Triton X-114). Vsi eksperimenti so bili izvedeni v duplikatu.

4. EKSPERIMENTALNO DELO

4.1. Sinteza 2-[5-hidroksi-(3-oksopiperazin-1-karbonil)fenoksi]ocetne kisline (**10**)

4.1.1. Sinteza benzil 2-[5-benziloksi-2-(3-oksopiperazin-1-karbonil)fenoksi]acetata (**9**)

Reakcija



Postopek

V epruveto smo zatehtali piperazin-2-on (**2**, 98,5 mg, 0,984 mmol), izhodno kislino **1** (297 mg, 0,757 mmol), EDC (174,1 mg, 0,908 mmol), DMAP (18,5 mg, 0,151 mmol), HOBT (20,5 mg, 0,152 mmol) in Et₃N (0,42 mL, 3,02 mmol). Dodali smo približno 5 mL CH₂Cl₂ in reakcijsko zmes segrevali 1 uro v mikrovalovnem reaktorju (T = 60 °C). Raztopino smo nato prenesli v lij ločnik in dodali 50 mL CH₂Cl₂. Organsko fazo smo spirali z 1M HCl (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 10 mL) in nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Združene organske faze smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, odfiltrirali sušilno sredstvo in odstranili CH₂Cl₂ z rotavaporjem. S tankoplastno kromatografijo smo ugotovili prisotnost nečistot, zato smo se odločili za ločevanje s kolonsko kromatografijo. Frakcije z našim produktom smo združili in odparili topilo pod znižanim tlakom. V zmesi so bile še vedno prisotne nečistote, zato smo izvedli kristalizacijo. Produkt smo raztopili v 5 mL kloroforma in po kapljicah dodajali heksan do zamotnitve ter postavili suspenzijo čez noč v zamrzovalnik. Skupno smo dobili 213 mg (0,449 mmol) bele oborine **9**, ki je bila sprijeta ob steno bučke, zato smo matičnico preprosto odlili in produkt posušili.

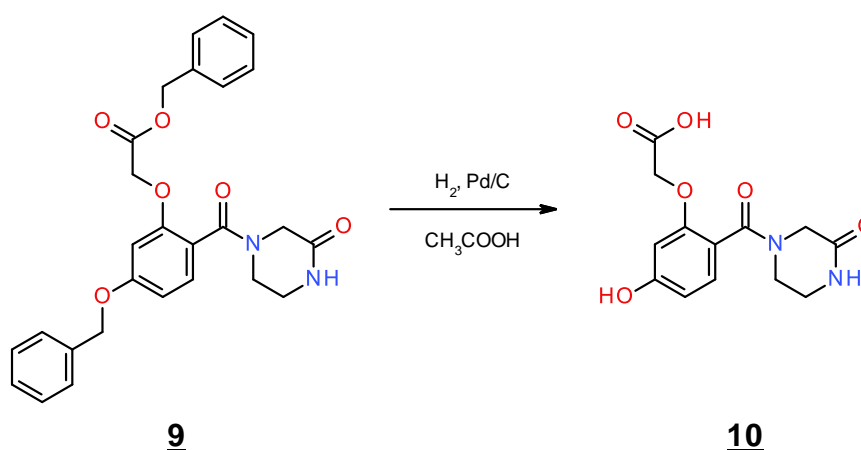
Rezultati

Izgled	bela oborina
--------	--------------

Mr	474.50
H	59 %
Rf	0.44 (MF: CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 40/1)
Tt	145 – 150 °C
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 3.16, 3.40, 3.45, 3.62, 3.75, 3.94, 4.06, 4.20, 4.37, 4.43 (br, 6H, piperazin), 4.63, 4.70 (s, 2H, -O-CH ₂ -CO-O-), 5.03 (s, 2H, Ph-CH ₂ -O-CO-), 5.22 (AB, d, J = 9.6 Hz, 2H, Ph-CH ₂ -O-Ar), 6.12, 6.35 (s, 1H, Ar-H), 6.37 (dd, J = 10.4, 1.8 Hz, 1H, Ar-H), 6.67 (t, J = 6.8 Hz, 1H, -NH-CO-), 7.29-7.43 (m, 11H, Ar-H) ppm
¹³ C NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 38.8, 40.9, 41.5, 43.5, 46.1, 50.1, 65.1, 65.3, 67.3, 67.4, 70.3, 99.7, 99.9, 107.2, 107.4, 117.6, 118.0, 127.5, 127.6, 128.3, 128.6, 128.7, 128.8, 130.1, 130.4, 134.8, 135.0, 136.2, 154.6, 154.6, 161.1, 161.4, 167.4, 167.5, 167.7, 167.9, 168.2 ppm
Večina signalov je podvojenih.	
IR (KBr)	$\bar{\nu}$ = 3483, 3207, 2894, 2862, 1755, 1677, 1629, 1609, 1582, 1443, 1410, 1247, 1197, 1172, 1116, 1054, 1030, 988, 959, 925 cm ⁻¹
MS ESI	m/z = 475.2 ([MH] ⁺ , 100)
HRMS	izmerjena vrednost: 475.1869 (izračunana vrednost za C ₂₇ H ₂₇ N ₂ O ₆ : 475.1879)
HPLC	λ = 220 nm, t _R = 7.7 min, 97.4 % čistost λ = 254 nm, t _R = 7.7 min, 97.1 % čistost 40% ACN/H ₂ O do 90% ACN/H ₂ O v 15 min, nato 3 min pri 90% ACN/H ₂ O, nazaj na 40% v 18. minuti post time 6 min

4.1.2. Sinteza 2-[5-hidroksi-(3-oksopiperazin-1-karbonil)fenoksi]ocetne kisline (**10**)

Reakcija



Postopek

V bučko smo zatehtali spojino **9** (136 mg, 0,287 mmol) in dodali 30 mL očetne kisline. Bučko smo postavili na mešalo, zatesnili s septumom in prepilovali z argonom približno 20 minut. Nato smo k reakcijski zmesi dodali približno 15 mg paladija in suspenzijo prepilovali z vodikom ter jo pustili mešati čez noč pod vodikovo atmosfero. Naslednji dan smo izvedli filtracijo skozi guč. Matičnico smo kvantitativno prenesli v novo bučko ter uparili očetno kislino z rotavaporjem. K rjavi lepljivi zmesi smo dodali 1 mL EtOH in jo postavili na ultrazvočno kadičko. Raztopljeno zmes smo postavili v zamrzovalnik, kjer je čez noč le malo kristalizirala, zato smo dodali malo dietiletra in jo postavili nazaj v zamrzovalnik. Naslednji dan smo odfiltrirali oborino s presesavanjem. Postopek kristalizacije smo ponovili še dvakrat. Skupno smo dobili 45 mg (0,153 mmol) bele oborine **10**.

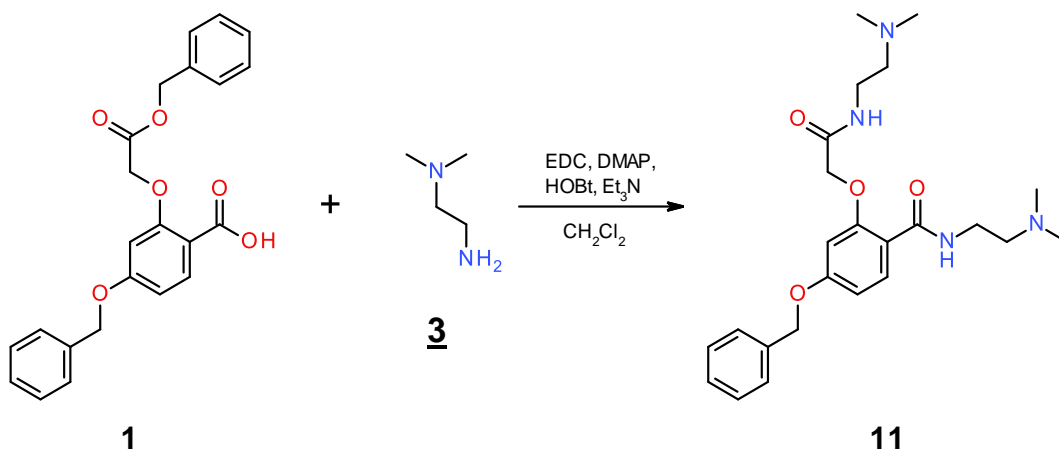
Rezultati

Izgled	bela oborina
Mr	294.26
H	53 %
Rf	0.00 (MF: CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 40/1)
Tt	135 – 142 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO)	δ = 3.16-4.15 (m, 6H, piperazin), 4.60 (s, 2H, -O-CH ₂ -), 6.35 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.45 (dd, J = 6.0, 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.05 (d, J = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.75 (s, 1H, -NH-CO-), 9.55 (s, 1H, Ar-OH), 13.25 (s, 1H, -COOH) ppm
IR (KBr)	$\bar{\nu}$ = 3222, 2975, 1728, 1673, 1593, 1462, 1364, 1253, 1223, 1179, 1125, 1064, 996, 964 cm ⁻¹
MS ESI	m/z = 293.1 ([MH] ⁺ , 100)
HRMS	izmerjena vrednost: 293.0774 (izračunana vrednost za C ₁₃ H ₁₃ N ₂ O ₆ : 293.0768)
HPLC	λ = 220 nm, t _R = 1.4 min, 100.0 % čistost λ = 254 nm, t _R = 1.4 min, 100.0 % čistost 10% ACN/H ₂ O 5 min, nato do 30% v 10 min, do 90% ACN/H ₂ O v 15 min, nato 2.5 min pri 90% ACN/H ₂ O, nazaj na 10% v 18. minuti post time 6 min

4.2. Sinteza *N*-[2-(dimetilamino)etil]-2-[2-[2-(dimetilamino)etilamino]-2-okso-etoksi]-4-hidroksi-benzamida (**12**)

4.2.1. Sinteza 4-benziloksi-*N*-[2-(dimetilamino)etil]-2-[2-[2-(dimetilamino)etilamino]-2-okso-etoksi]benzamida (**11**)

Reakcija



Postopek

V epruveto smo zatehtali dimetiletilendiamin (**3**, 0,11 ml, 1,022 mmol), izhodno kislino **1** (301 mg, 0,767 mmol), EDC (176,4 mg, 0,92 mmol), DMAP (18,7 mg, 0,153 mmol), HOBt (20,7 mg, 0,153 mmol) in Et₃N (0,43 mL, 3,09 mmol). Dodali smo približno 5 mL CH₂Cl₂ in raztopino postavili za 1 uro v mikrovalovni reaktor. Reakcijsko zmes smo nato prenesli v lij ločnik in dodali 50 mL CH₂Cl₂. Organsko fazo smo spirali z nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 10 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Združene organske faze smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, odfiltrirali sušilno sredstvo in odstranili CH₂Cl₂ z rotavaporjem. S tankoplastno kromatografijo smo ugotovili prisotnost nekaterih nečistot, zato smo se odločili za ločevanje s kolonsko kromatografijo. Frakcije z našim produktom smo združili in odparili topilo pod znižanim tlakom. Skupno smo dobili 52 mg (0,118 mmol) produkta **11**.

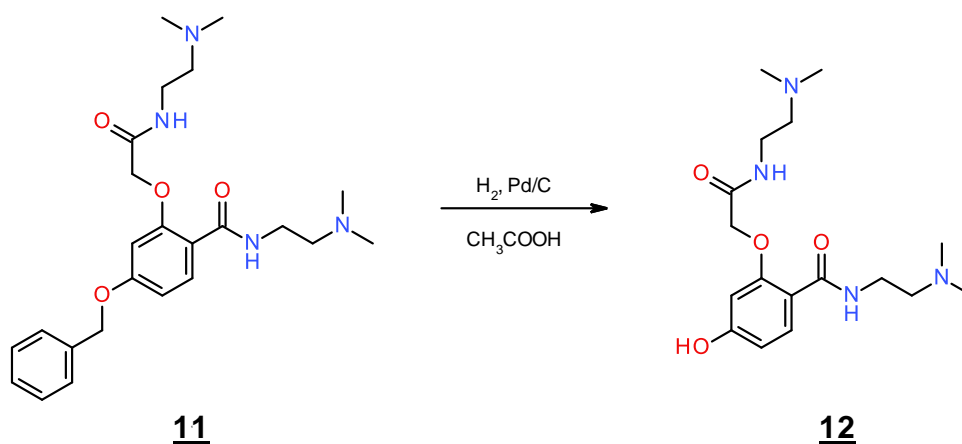
Rezultati

Izgled	bež kremasta snov
Mr	442.55
H	15 %
Rf	0.69 (MF: CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1 + 3% Et ₃ N)
¹ H NMR	δ = 2.31 (s, 6H, -N-(CH ₃) ₂), 2.42 (s, 6H, -N-(CH ₃) ₂), 2.59 (t, J = 6.0 Hz, 2H, -

(400 MHz, CDCl ₃)	CH ₂ -N-), 2.76 (t, <i>J</i> = 6.0 Hz, 2H, -CH ₂ -N-), 3.46 (td, <i>J</i> = 5.7, 5.9 Hz, 2H, -NH-CH ₂ -), 3.65 (td, <i>J</i> = 6.0, 5.4 Hz, 2H, -NH-CH ₂ -), 4.68 (s, 2H, -O-CH ₂ -CO-), 5.09 (s, 2H, Ph-CH ₂ -O-), 6.51 (d, <i>J</i> = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.69 (dd, <i>J</i> = 6.8, 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.32-7.45 (m, 5H, Ar-H), 7.85 (t, <i>J</i> = 5.9 Hz, 1H, -NH-), 7.96 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.02 (t, <i>J</i> = 5.4 Hz, 1H, -NH-) ppm
IR (KBr)	$\bar{\nu}$ = 3415, 3064, 2945, 2818, 2767, 1668, 1630, 1609, 1546, 1501, 1465, 1266, 1190, 1114, 1027 cm ⁻¹
MS ESI	<i>m/z</i> = 222.1 (100), 443.2 ([MH] ⁺ , 32)
HRMS	izmerjena vrednost: 443.2658 (izračunana vrednost za C ₂₄ H ₃₅ N ₄ O ₄ : 443.2647)
HPLC	λ = 254 nm, t _R = 2.7 min, 95.9 % čistost λ = 280 nm, t _R = 2.7 min, 95.2 % čistost 30% ACN/H ₂ O + 0.1% CF ₃ COOH do 90% ACN/H ₂ O + 0.1% CF ₃ COOH v 15 min, nato 2 min pri 90% ACN/H ₂ O + 0.1% CF ₃ COOH, nazaj na 30% v 18. minuti post time 6 min

4.2.2. Sinteza *N*-[2-(dimetilamino)etil]-2-[2-[2-(dimetilamino)etilamino]-2-okso-etoksi]-4-hidroksi-benzamida (**12**)

Reakcija



Postopek

V bučko smo zatehtali spojino **11** (32 mg, 0,072 mmol), dodali 30 mL očetne kisline in preprihovali z argonom približno 20 minut. Nato smo k reakcijski zmesi dodali približno 10 mg paladija in preprihovali še z vodikom ter jo pustili mešati čez noč pod vodikovo atmosfero. Naslednji dan smo odfiltrirali paladij in uparili očetno kislino z rotavaporjem. Zaradi netopnosti zmesi v nepolarnih topilih, smo se odločili za čiščenje z reverznofazno kolonsko kromatografijo (MF = bidestilirana voda, 5% CH₃CN, 1% očetne kisline). Frakcije z našim produktom smo združili in skoncentrirali z rotavapiranjem ter produkt

dodatno sušili na črpalki, da smo se v celoti znebili ostankov vode. Skupno smo dobili 24 mg (0,068 mmol) produkta **12**.

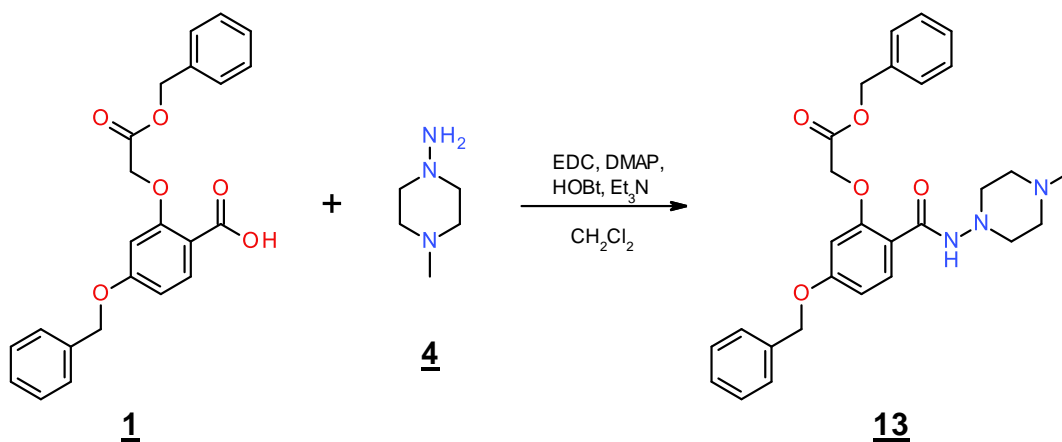
Rezultati

Izgled	rjavo-črna lepljiva snov
Mr	352.43
H	94 %
Rf	0.00 (MF: CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1 + 3% Et ₃ N)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO)	δ = 2.16 (s, 6H, -N-(CH ₃) ₂), 2.20 (s, 6H, -N-(CH ₃) ₂), 2.34 (t, J = 6.4 Hz, 2H, -CH ₂ -N-), 2.56 (t, J = 1.6 Hz, 2H, -CH ₂ -N-), 2.68 (td, J = 5.2, 5.6 Hz, 2H, -NH-CH ₂ -), 3.26 (td, J = 6.0, 5.2 Hz, 2H, -NH-CH ₂ -), 4.60 (s, 2H, -O-CH ₂ -CO-), 6.37 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.47 (dd, J = 6.4, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.67 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.23 (t, J = 5.2 Hz, 1H, -NH-), 8.51 (t, J = 5.6 Hz, 1H, -NH-), 10.13 (bs, 1H, Ar-OH) ppm
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ = 3270, 2967, 1731, 1640, 1611, 1537, 1447, 1396, 1264, 1194, 1114, 1022, 977 cm ⁻¹
MS ESI	m/z = 150.1 (100), 353.2 ([MH] ⁺ , 77)
HRMS	izmerjena vrednost: 353.2189 (izračunana vrednost za C ₁₇ H ₂₉ N ₄ O ₄ : 353.2192)

4.3. Sinteza 2-[5-benziloksi-2-[(4-metilpiperazin-1-il)karbamoil]fenoksi]ocetne kisline (**14**)

4.3.1. Sinteza benzil 2-[5-benziloksi-2-[(4-metilpiperazin-1-il)karbamoil]fenoksi]acetata (**13**)

Reakcija



Postopek

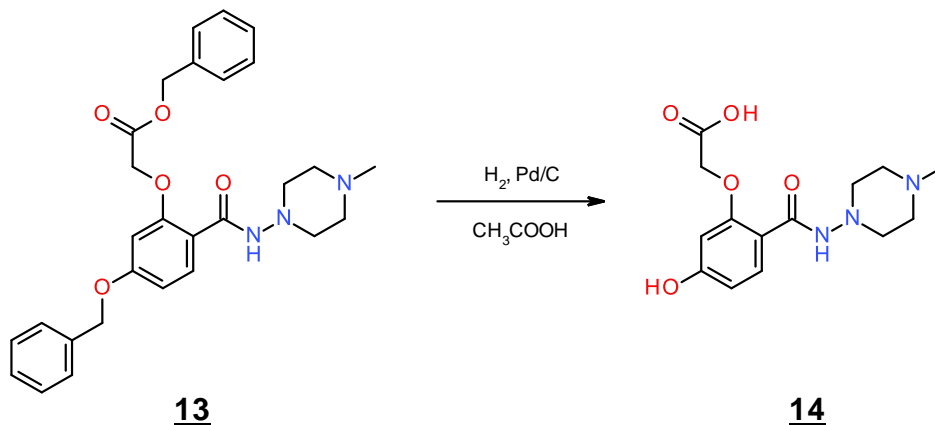
V epruveto smo zatehtali 1-amino-4-metilpiperazin (**4**, 0,12 ml, 0,997 mmol), izhodno kislino **1** (300 mg, 0,765 mmol), EDC (175,9 mg, 0,918 mmol), DMAP (18,7 mg, 0,153 mmol), HOBt (20,7 mg, 0,153 mmol) in Et₃N (0,43 mL, 3,09 mmol). Dodali smo približno 5 mL CH₂Cl₂ in 1 uro segrevali v mikrovalovnem reaktorju. Raztopino smo prenesli v lij ločnik in dodali 50 mL CH₂Cl₂ ter sprali organsko fazo z nasičenima raztopinama NaHCO₃ (2 × 10 mL) in NaCl (1 × 10 mL). Združene organske faze smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, odfiltrirali sušilno sredstvo in CH₂Cl₂ odstranili z rotavaporjem. Po izvedbi ekstrakcije smo ugotovili, da smo ves produkt izgubili v vodno fazo. Ponovno smo izvedli reakcijo in takoj pričeli z ločevanjem s kolonsko kromatografijo. Frakcije z našim produktom smo združili in odparili topilo pod znižanim tlakom. Skupno smo dobili 303 mg (0,619 mmol) produkta **13**.

Rezultati

Izgled	rumenkasta lepljiva snov
Mr	489.65
H	81 %
Rf	0.54 (MF: CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1 + 3% Et ₃ N)
Tt	130 – 138 °C
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 2.82 (bs, 3H, -CH ₃), 3.66 (q, J = 7.2, 8H, piperazin), 4.74 (s, 2H, -O-CH ₂ -CO-O-), 5.10 (s, 2H, Ph-CH ₂ -O-CO-), 5.37 (s, 2H, Ph-CH ₂ -O-), 6.42 (d, J = 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 6.74 (dd, J = 6.4, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.07 (d, J = 1.6 Hz, 1H, Ar-H), 7.31-7.45 (m, 10H, Ar-H), 9.57 (bs, 1H, -NH-CO-) ppm
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ = 3401, 3321, 3037, 2932, 2835, 2788, 2738, 1762, 1662, 1610, 1499, 1456, 1429, 1306, 1260, 1218, 1191, 1122, 1080, 1006 cm ⁻¹
MS ESI	m/z = 490.2 ([MH] ⁺ , 100)
HRMS	izmerjena vrednost: 490.2342 (izračunana vrednost za C ₂₈ H ₃₂ N ₃ O ₅ : 490.2333)

4.3.2. Sinteza 2-[5-benziloksi-2-[(4-metilpiperazin-1-il)karbamoil]fenoksi]ocetne kisline (**14**)

Reakcija



Postopek

V bučko smo zatehtali spojino **13** (246 mg, 0,502 mmol), dodali 30 mL ocetne kisline in jo preprihovali z argonom približno 20 minut. Nato smo k reakcijski zmesi dodali približno 25 mg paladija in preprihovali še z vodikom ter jo pustili mešati čez noč pod vodikovo atmosfero. Naslednji dan smo odfiltrirali katalizator in uparili ocetno kislino z rotavaporjem. Preostanek smo raztopili v EtOH in dodali nekaj kapljic EtOAc do zamotnitve. Bučko smo čez noč postavili v zamrzovalnik in naslednji dan odfiltrirali oborino. Skupno smo dobili 40 mg (0,129 mmol) produkta **14**.

Rezultati

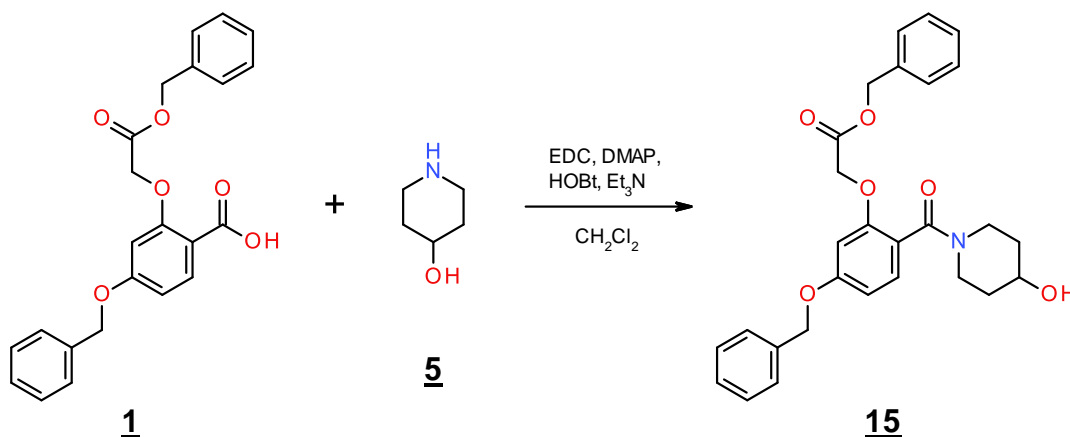
Izgled	bež kristali
Mr	309.32
H	26 %
Rf	0.00 (MF: CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1 + 3% Et ₃ N)
Tt	180 – 190 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO)	δ = 2.39 (s, 3H, -CH ₃), 2.77 (bs, 4H, piperazin), 2.96 (bs, 4H, piperazin), 4.58 (s, 2H, -O-CH ₂ -CO-), 6.40 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.45 (dd, J = 6.4, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.69 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 10.05 (s, 1H, -NH-CO-), 10.12 (bs, 1H, Ar-OH) ppm
¹³ C NMR (400 MHz, DMSO)	δ = 43.11, 52.24, 52.65, 67.09, 100.51, 108.33, 112.77, 132.37, 157.42, 161.48, 161.85, 171.33 ppm
IR (KBr)	$\bar{\nu}$ = 3415, 3261, 2839, 2706, 1735, 1607, 1505, 1466, 1417, 1308, 1267, 1186, 1106, 1049 cm ⁻¹
MS ESI	m/z = 308.1 ([MH] ⁺ , 100)

HRMS	izmerjena vrednost: 308.1246 (izračunana vrednost za C ₁₄ H ₁₈ N ₃ O ₅ : 308.1241)
HPLC	$\lambda = 220$ nm, $t_R = 2.6$ min, 94.8 % čistost $\lambda = 254$ nm, $t_R = 2.6$ min, 100.0 % čistost 10% ACN/H ₂ O 5 min, nato do 30% v 10 min, do 90% ACN/H ₂ O v 15 min, nato 2.5 min pri 90% ACN/H ₂ O, nazaj na 10% v 18. minuti post time 6 min

4.4. Sinteza 2-[5-benziloksi-2-(4-hidroksipiperidin-1-karbonil)fenoksi]ocetne kisline (16)

4.4.1. Sinteza benzil 2-[5-benziloksi-2-(4-hidroksipiperidin-1-karbonil)fenoksi]acetata (15)

Reakcija



Postopek

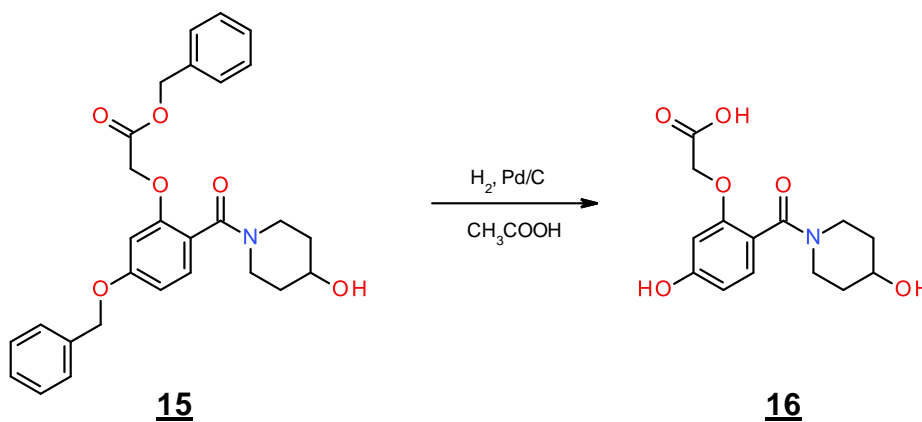
V epruveto smo zatehtali 4-hidroksipiperidin (**5**, 101,5 mg, 1,003 mmol), izhodno kislino **1** (303 mg, 0,772 mmol), EDC (177 mg, 0,923 mmol), DMAP (18,7 mg, 0,153 mmol), HOBT (20,7 mg, 0,153 mmol) in Et₃N (0,43 mL, 3,088 mmol). Dodali smo približno 5 mL CH₂Cl₂ in reakcijsko zmes segrevali 1 uro v mikrovalovnem reaktorju. Raztopino smo nato prenesli v lij ločnik in dodali 50 mL CH₂Cl₂. Organsko fazo smo spirali z 1M HCl (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 10 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Združene organske faze smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, odfiltrirali sušilno sredstvo in odstranili CH₂Cl₂ z rotavaporjem. S tankoplastno kromatografijo smo ugotovili prisotnost nečistot, zato smo se odločili za ločevanje s kolonsko kromatografijo. Frakcije z našim produktom smo združili in odparili topilo pod znižanim tlakom. Skupno smo dobili 233 mg (0,49 mmol) produkta **15**.

Rezultati

Izgled	brezbarvna lepljiva snov
Mr	475.53
H	63 %
Rf	0.42 (MF: CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 1.25-2.03 (m, 5H, piperidin+OH), 2.95-3.36 (m, 2H, piperidin), 3.42-3.70 (m, 1H, piperidin), 3.79-3.96 (m, 1H, piperidin), 4.17-4.44 (m, 1H, -CH-OH), 4.67 (s, 2H, -O-CH ₂ -CO-O-), 5.02 (s, 2H, Ph-CH ₂ -O-CO-), 5.21 (s, 2H, Ph-CH ₂ -O-), 6.38 (d, J = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.65 (d, J = 8.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.23 (d, J = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 7.31-7.44 (m, 10H, Ar-H) ppm
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ = 3737, 3383, 3229, 2935, 2596, 2365, 2322, 2183, 2144, 2083, 1977, 1756, 1609, 1453, 1270, 1173, 1066 cm ⁻¹
MS ESI	m/z = 476.2 ([MH] ⁺ , 100)
HRMS	izmerjena vrednost: 476.2073 (izračunana vrednost za C ₂₈ H ₃₀ NO ₆ : 476.2081)

4.4.2. Sinteza 2-[5-benziloksi-2-(4-hidroksipiperidin-1-karbonil)fenoksi]ocetne kisline (**16**)

Reakcija



Postopek

V bučko smo zatehtali spojino **15** (193 mg, 0,406 mmol) in dodali 30 mL očetne kisline ter preprihovali z argonom približno 20 minut. Nato smo k reakcijski zmesi dodali približno 25 mg paladija, preprihovali z vodikom in jo pustili mešati čez noč pod vodikovo atmosfero. Naslednji dan smo odfiltrirali paladij in uparili očetno kislino z rotavaporjem. Zaradi netopnosti zmesi v nepolarnih topilih, smo se odločili za čiščenje z reverznofazno kolonsko kromatografijo (MF = bidestilirana voda, 5% CH₃CN, 1% očetne kisline). Frakcije z našim produktom smo združili in skoncentrirali z rotavapiranjem. Produkt smo

dodatno sušili na črpalki, da smo se v celoti znebili vode. Skupno smo dobili 41 mg (0,139 mmol) produkta **16**.

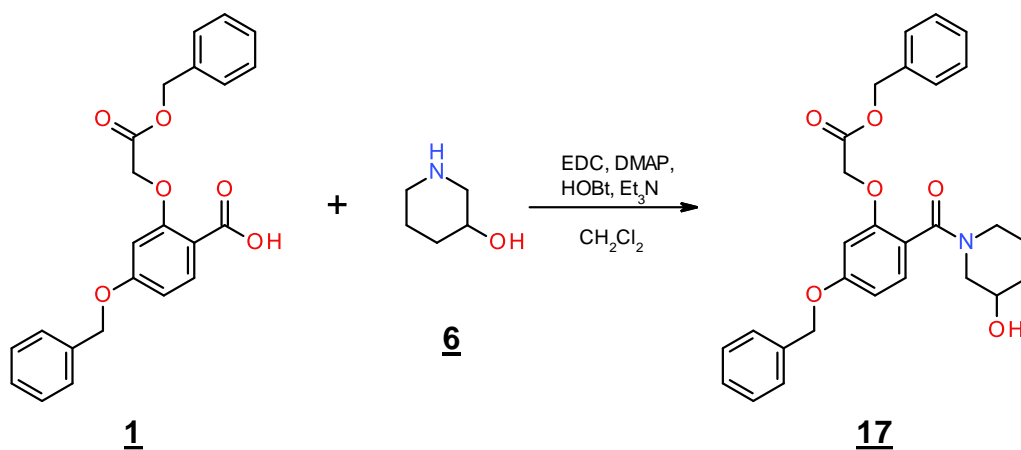
Rezultati

Izgled	brezbarvna viskozna snov
Mr	295.29
H	34 %
Rf	0.00 (MF: CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1)
¹ H NMR (400 MHz, DMSO)	δ = 1.06-1.83 (m, 5H, piperidin+OH), 2.86-3.53 (m, 3H, piperidin), 3.67 (s, 1H, piperidin), 3.99 (m, 1H, -CH-OH), 4.64 (s, 2H, -O-CH ₂ -CO-), 6.26 (d, J = 4.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.40 (d, J = 8.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.97 (d, J = 7.6 Hz, 1H, Ar-H), 9.75 (s, 1H, Ar-OH), 12.53 (bs, 1H, -COOH) ppm
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ = 3226, 2942, 2287, 2192, 1979, 1742, 1598, 1449, 1366, 1272, 1236, 1181, 1123, 1065 cm ⁻¹
MS ESI	m/z = 294.1 ([MH] ⁻ , 100)
HRMS	izmerjena vrednost: 294.0978 (izračunana vrednost za C ₁₄ H ₁₆ NO ₆ : 294.0983)

4.5. Sinteza 2-[5-hidroksi-2-(3-hidroksipiperidin-1-karbonil)fenoksi]ocetne kisline (**18**)

4.5.1. Sinteza benzil 2-[5-benziloksi-2-(3-hidroksipiperidin-1-karbonil)fenoksi]acetata (**17**)

Reakcija



Postopek

V epruveto smo zatehtali 3-hidroksipiperidin (**6**, 100,8 mg, 0,997 mmol), izhodno kislino **1** (301 mg, 0,767 mmol), EDC (176,4 mg, 0,92 mmol), DMAP (18,7 mg, 0,153 mmol), HOBT (20,7 mg, 0,153 mmol) in Et₃N (0,43 mL, 3,07 mmol). Dodali smo 5 mL CH₂Cl₂ in

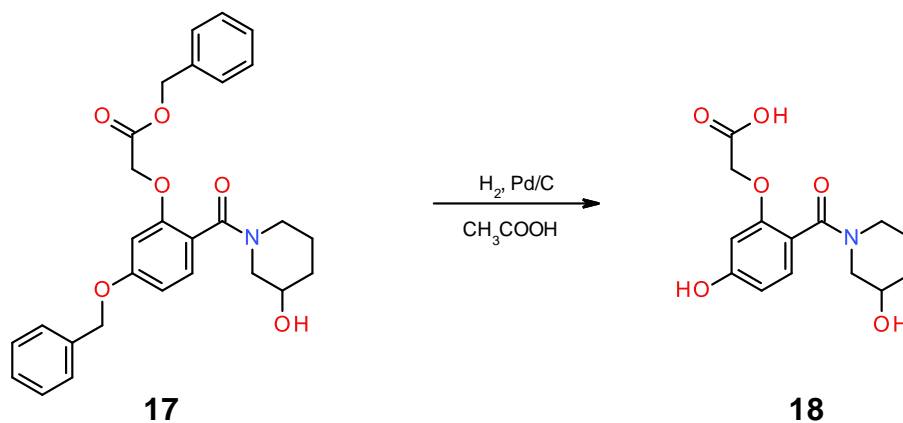
segrevali 1 uro v mikrovalovnem reaktorju. Raztopino smo prenesli v lij ločnik in dodali 50 mL CH₂Cl₂. Organsko fazo smo spirali z 1M HCl (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 10 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Združene organske faze smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, odfiltrirali sušilno sredstvo in odstranili CH₂Cl₂ z rotavaporjem. Za ločevanje prisotnih nečistot in zelenega produkta smo izvedli kolonsko kromatografijo. Frakcije z našo spojino smo združili in odparili topilo pod znižanim tlakom. Skupno smo dobili 208 mg (0,437 mmol) produkta **17**.

Rezultati

Izgled	brezbarvna lepljiva zmes
Mr	475.53
η	57 %
Rf	0.36 (MF: CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1)
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 1.23-2.04 (m, 5H, piperidin+OH), 2.83, 3.02, 3.15, 3.32 (bs, 2H, piperidin), 3.49-4.39 (m, 3H, piperidin), 4.68 (s, 2H, -O-CH ₂ -CO-O-), 5.01 (s, 2H, Ph-CH ₂ -O-CO-), 5.23 (s, 2H, Ph-CH ₂ -O-), 6.34 (d, J = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.66 (dd, J = 6.4, 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.33-7.43 (m, 11H, Ar-H) ppm
IR (ATR)	$\bar{\nu}$ = 3386, 2928, 1757, 1609, 1453, 1369, 1264, 1176, 1133, 1068, 1027, 970, 830, 738 cm ⁻¹
MS ESI	m/z = 476.2 ([MH] ⁺ , 100)
HRMS	izmerjena vrednost: 476.2073 (izračunana vrednost za C ₂₈ H ₃₀ NO ₆ : 476.2070)

4.5.2. Sinteza 2-[5-hidroksi-2-(3-hidroksipiperidin-1-karbonil)fenoksi]ocetne kisline (**18**)

Reakcija



Postopek

V bučko smo zatehtali spojino **17** (150 mg, 0,315 mmol) in dodali 30 m očetne kisline ter prepihovali z argonom 20 minut. Nato smo k reakcijski zmesi dodali približno 15 mg paladija, jo prepihovali še z vodikom in pustili mešati čez noč pod vodikovo atmosfero. Naslednji dan smo odfiltrirali katalizator in uparili očetno kislino z rotavaporjem. Na videz nečisto zmes smo prelili s CH₂Cl₂, v katerem so se raztopile nečistote, ne pa produkt. Topilo smo previdno odlili in do suhega posušili na rotavaporju. Skupno smo dobili 82 mg (0,278 mmol) produkta **18**.

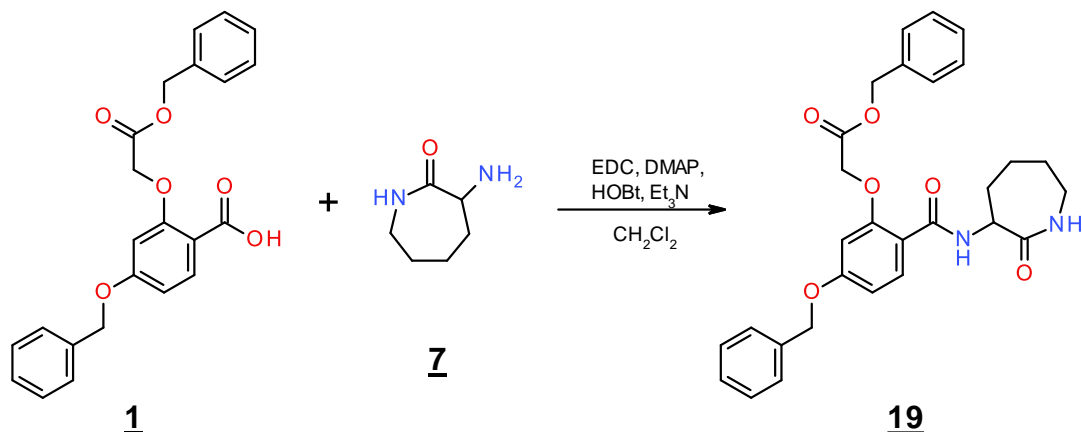
Rezultati

Izgled	bež kristali (zelo higroskopni)
Mr	295.29
η	88 %
Rf	0.00 (MF: CH ₂ Cl ₂ /MeOH = 9/1)
Tt	95 – 105 °C
¹ H NMR (400 MHz, DMSO)	δ = 1.10-1.45 (m, 2H, piperidin), 1.94 (bs, 1H, piperidin), 1.62-1.98 (m, 2H, piperidin+OH), 2.91-3.93 (m, 4H, piperidin), 4.20-4.46 (m, 1H, -CH-OH), 4.62 (s, 2H, -O-CH ₂ -CO-), 6.27 (d, J = 6.8 Hz, 1H, Ar-H), 6.38 (dd, J = 6.4, 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.98 (d, J = 6.4 Hz, 1H, Ar-H), 9.74 (s, 1H, Ar-OH), 13.18 (bs, 1H, -COOH) ppm
IR (KBr)	$\bar{\nu}$ = 3233, 2937, 1737, 1615, 1446, 1360, 1269, 1184, 1126, 1102, 1061 cm ⁻¹
MS ESI	m/z = 294.1 ([MH] ⁺ , 100)
HRMS	izmerjena vrednost: 294.0978 (izračunana vrednost za C ₁₄ H ₁₆ NO ₆ : 294.0981)

4.6. Sinteza 2-[5-hidroksi-2-[(2-oksoazepan-3-il)karbamoil]fenoksi]ocetne kisline (**20**)

4.6.1. Sinteza benzil 2-[5-benziloksi-2-[(2-oksoazepan-3-il)karbamoil]fenoksi]acetata (**19**)

Reakcija



Postopek

V epruveto smo zatehtali 3-aminoazepan-2-on (**7**, 1,274 g, 10,34 mmol), izhodno kislino **1** (300 mg, 0,765 mmol), EDC (175,9 mg, 0,918 mmol), DMAP (18,7 mg, 0,153 mmol), HOBt (20,7 mg, 0,153 mmol) in Et₃N (0,43 mL, 3,06 mmol). Dodali smo približno 5 mL CH₂Cl₂ in reakcijsko zmes segrevali 1 uro v mikrovalovnem reaktorju. Nato smo raztopino prenesli v lij ločnik in dodali 50 mL CH₂Cl₂. Organsko fazo smo spirali z 1M HCl (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 10 mL) in z nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 mL). Združene organske faze smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, odfiltrirali sušilno sredstvo in CH₂Cl₂ odstranili z rotavaporjem. S tankoplastno kromatografijo smo ugotovili prisotnost nečistot, zato smo se odločili za ločevanje s kolonsko kromatografijo. Reakcijsko zmes smo morali pred tem adsorbirati na silikagel. Po izvedeni kolonski kromatografiji smo frakcije z našim produktom združili in odparili topilo pod znižanim tlakom. Lepljivo belo zmes smo prelili z EtOAc. V topilu se naš produkt ni raztapljal, znebili pa smo se ostankov nečistot, ki so v EtOAc dobro topne. Topilo smo previdno odlili, produkt raztopili v CH₂Cl₂ in ga skoncentrirali pod znižanim tlakom. Skupno smo dobili 137 mg (0,273 mmol) spojine **19**.

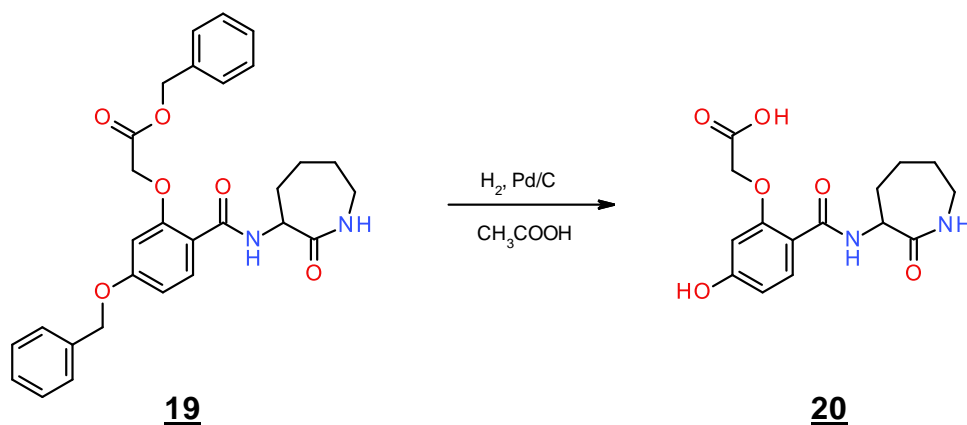
Rezultati

Izgled	beli sprijeti delci
Mr	502.56

η	36 %
Rf	0.43 (MF: EtOAc)
Tt	135 – 142 °C
$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3)	$\delta = 1.39\text{-}1.54$ (m, 1H, $-\text{CH}_2-$), $1.54\text{-}1.69$ (m, 1H, $-\text{CH}_2-$), $1.80\text{-}1.98$ (m, 2H, $-\text{CH}_2-$), $2.05\text{-}2.12$ (m, 1H, $-\text{CH}_2-$), $2.15\text{-}2.25$ (m, 1H, $-\text{CH}_2-$), $3.24\text{-}3.44$ (m, 1H, obročni $-\text{NH}-\underline{\text{CH}}-$), 3.40 (ddd, $J = 15.1, 11.3, 5.2$ Hz, obročni $-\text{NH}-\underline{\text{CH}}-$), $4.74\text{-}4.90$ (m, 3H, $\text{Ph}-\underline{\text{CH}}_2-\text{O}-\text{CO}-\text{CH}-$), 5.04 (s, 2H, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CO}-\text{O}-$), 5.26 (s, 2H, $\text{Ph}-\underline{\text{CH}}_2-\text{O}-$), 6.15 (m, 1H, obročni $-\text{NH}-$), 6.41 (d, $J = 2.0$ Hz, 1H, Ar-H), 6.72 (dd, $J = 8.8, 2.4$ Hz, 1H, Ar-H), $7.31\text{-}7.45$ (m, 10H, Ar-H), 8.19 (d, $J = 8.8$ Hz, 1H, Ar-H), 9.05 (d, $J = 7.2$ Hz, 1H, $-\text{Ar}-\text{CO}-\underline{\text{NH}}-$) ppm
IR (KBr)	$\bar{\nu} = 3550, 3368, 3213, 3069, 2922, 2849, 1748, 1679, 1640, 1609, 1524, 1493, 1434, 1250, 1202, 1163, 1122, 1064, 1033, 1004$ cm^{-1}
MS ESI	$m/z = 503.2$ ($[\text{MH}]^+$, 100)
HRMS	izmerjena vrednosti: 503.2182 (izračunana vrednost za $\text{C}_{29}\text{H}_{31}\text{N}_2\text{O}_6$: 503.2196)
HPLC	$\lambda = 220$ nm, $t_R = 10.8$ min, 96.9 % čistost $\lambda = 254$ nm, $t_R = 10.8$ min, 97.4 % čistost 10% ACN/ H_2O 5 min, nato do 30% v 10 min, do 90% ACN/ H_2O v 15 min, nato 2.5 min pri 90% ACN/ H_2O , nazaj na 10% v 18. minuti post time 6 min

4.6.2. Sinteza 2-[5-hidroksi-2-[(2-oksoazepan-3-il)karbamoil]fenoksi]ocetne kisline (20)

Reakcija



Postopek

V bučko smo zatehtali spojino **19** (100 mg, 0,199 mmol) in dodali 30 mL očetne kisline ter preprihovali z argonom približno 20 minut. Nato smo k reakcijski zmesi dodali približno 10 mg paladija, suspenzijo preprihovali z vodikom ter jo pustili mešati čez noč pod vodikovo

atmosfera. Naslednji dan smo odfiltrirali paladij in očetno kislino uparili z rotavaporjem. Preostanek smo poskusili raztopiti v CH_2Cl_2 . Pomagali smo si z ultrazvočno kadičko in segrevanjem pod refluxom. V raztopino smo po kapljicah dodajali dietileter do zamotnitve in postavili v digestorij. Naslednji dan smo odfiltrirali oborino in dobili 57 mg (0,177 mmol) produkta **20**.

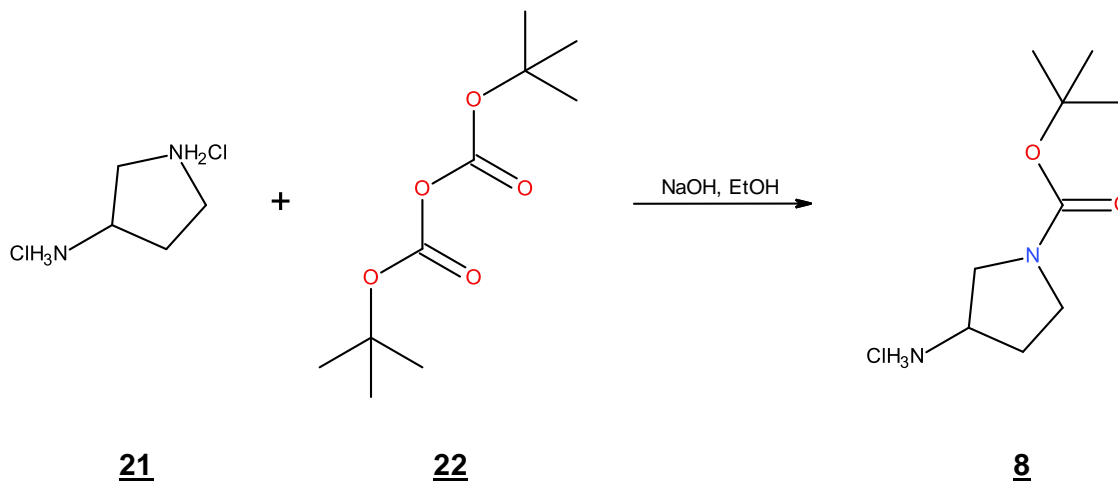
Rezultati

Izgled	beli kristali
Mr	322.31
η	89 %
Rf	0.00 (MF: EtOAc)
Tt	> 230 °C
^1H NMR (400 MHz, DMSO)	δ = 1.15-1.31 (m, 1H, -CH ₂ -), 1.37-1.52 (m, 1H, -CH ₂ -), 1.62-1.84 (m, 2H, -CH ₂ -), 1.84-2.03 (m, 2H, -CH ₂ -), 3.03-3.15 (m, 1H, -CH ₂ -), 3.23 (ddd, J = 14.5, 11.6, 5.3, 1H, -CH ₂ -), 4.52-4.61 (m, 1H, -CH-), 4.75 (s, 2H, -O-CH ₂ -CO-), 6.37 (d, J = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.47 (dd, J = 6.4, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 2H, Ar-H+CO-NH-), 8.89 (d, J = 6.0 Hz, 1H, -Ar-CO-NH-), 10.18 (s, 1H, Ar-OH), 13.27 (bs, 1H, -COOH) ppm
^{13}C NMR (400 MHz, DMSO)	δ = 28.18, 29.45, 31.47, 41.15, 52.66, 65.91, 100.45, 108.86, 113.31, 133.22, 158.09, 161.87, 163.36, 170.28, 174.77 ppm
IR (KBr)	$\bar{\nu}$ = 3358, 3134, 2933, 1748, 1633, 1574, 1542, 1465, 1268, 1189, 1106, 1066 cm^{-1}
MS ESI	m/z = 323.1 ([MH] ⁺ , 100)
HRMS	izmerjena vrednost: 323.1243 (izračunana vrednost za C ₁₅ H ₁₉ N ₂ O ₆ : 323.1247)
HPLC	λ = 220 nm, t_R = 5.1 min, 93.3 % čistost λ = 254 nm, t_R = 5.1 min, 93.1 % čistost 30% ACN/H ₂ O + 0.1% CF ₃ COOH do 90% ACN/H ₂ O + 0.1% CF ₃ COOH v 15 min, nato 2 min pri 90% ACN/H ₂ O + 0.1% CF ₃ COOH, nazaj na 30% v 18. minuti post time 6 min

4.7. Sinteza 2-[2-[(1-*tert*-butoksikarbonilpirolidin-3-il)karbamoil]-5-hidroksi-fenoksi]ocetne kisline (24)

4.7.1. Sinteza 1-(*tert*-butoksikarbonil)pirolidin-3-amonijevega klorida (8)

Reakcija



Postopek

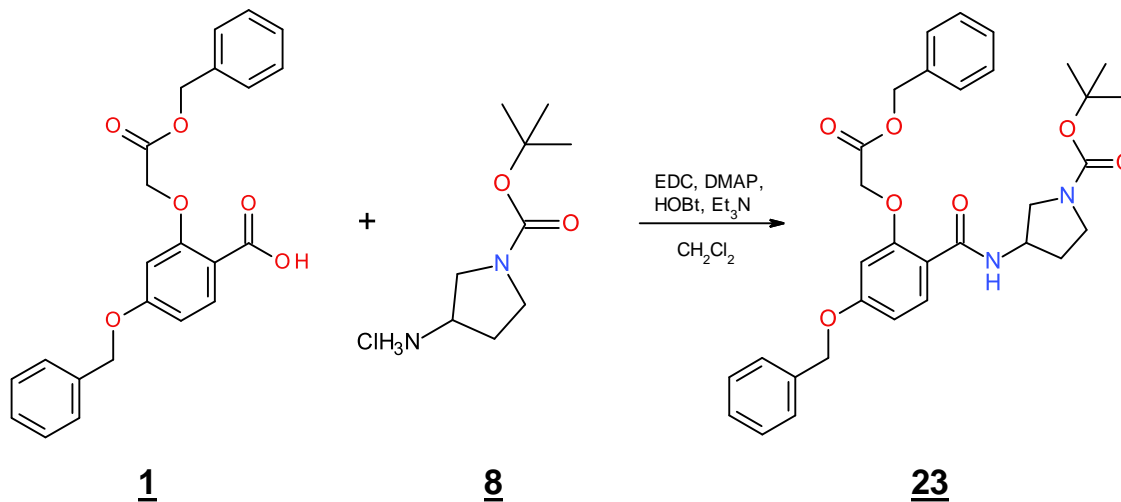
K raztopini 3-aminopirolidinijevega diklorida (21, 2,26 g, 14,3 mmol) v 30 mL vode in 30 mL EtOH smo med mešanjem na ledeni kopeli, počasi z dvema injekcijama, enakomerno (12 mL/h) kapljali raztopino 0,570 g (14,3 mmol) NaOH v 12 mL vode ter raztopino Boc-anhidrida (22, 3,275 g, 15,0 mmol) v 12 mL EtOH. Po dodatku obeh smo pustili reakcijsko zmes še 1 uro na ledeni kopeli in jo nato uparili z rotavaporjem. Preostanek smo raztopili v EtOH ter odfiltrirali nastalo oborino (NaCl). Matičnici smo dodali dietileter. Na dnu bučke je nastala lepljiva gmota rumene barve (2,79 g, 12,6 mmol), zato smo preostal dietileter le odlili in dokončno posušili še na rotavaporju. S produktom 8 smo šli v sintezo *tert*-butil-3-[[4-benziloksi-2-(2-benziloksi-2-okso-etoksi)benzoil]amino]pirolidin-1-karboksilata (23).

Rezultati

Izgled	bež kristali
Mr	222.11
η	99 %
Rf	0.00 (MF: EtOAc/heksan = 1/1)
Tt	80 – 86 °C
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 1.39 (s, 9H, Boc), 1.87-2.04 (m, 1H, pirolidin), 2.07-2.22 (m, 1H, pirolidin), 3.23-3.57 (m, 4H, pirolidin), 3.74 (bs, 1H, -CH-), 8.49 (bs, 3H, -NH ₃ -) ppm

4.7.2. Sinteza *tert*-butil-3-[[4-benziloksi-2-(2-benziloksi-2-okso-etoksi)benzoil]amino]pirolidin-1-karboksilata (23)

Reakcija



Postopek

V epruveto smo zatehtali spojino 8 (220 mg, 0,991 mmol), izhodno kislino 1 (299 mg, 0,762 mmol), EDC (175,3 mg, 0,914 mmol), DMAP (18,6 mg, 0,152 mmol), HOBt (20,6 mg, 0,152 mmol) in Et₃N (0,42 mL, 3,02 mmol). Dodali smo približno 5 mL CH₂Cl₂ in segrevali 1 uro v mikrovalovnem reaktorju. Raztopino smo nato prenesli v lij ločnik in ji dodali 50 mL CH₂Cl₂. Organsko fazo smo spirali z 1M HCl (2 × 10 mL), nasičeno raztopino NaHCO₃ (2 × 10 ml) in z nasičeno raztopino NaCl (1 × 10 ml). Združene organske faze smo sušili z brezvodnim Na₂SO₄, odfiltrirali sušilno sredstvo in CH₂Cl₂ odstranili z rotavaporjem. S kolonsko kromatografijo smo se znebili ostankov nečistot. Frakcije z našim produktom smo združili in odparili topilo pod znižanim tlakom. Skupno smo dobili 231 mg (0,412 mmol) produkta 23.

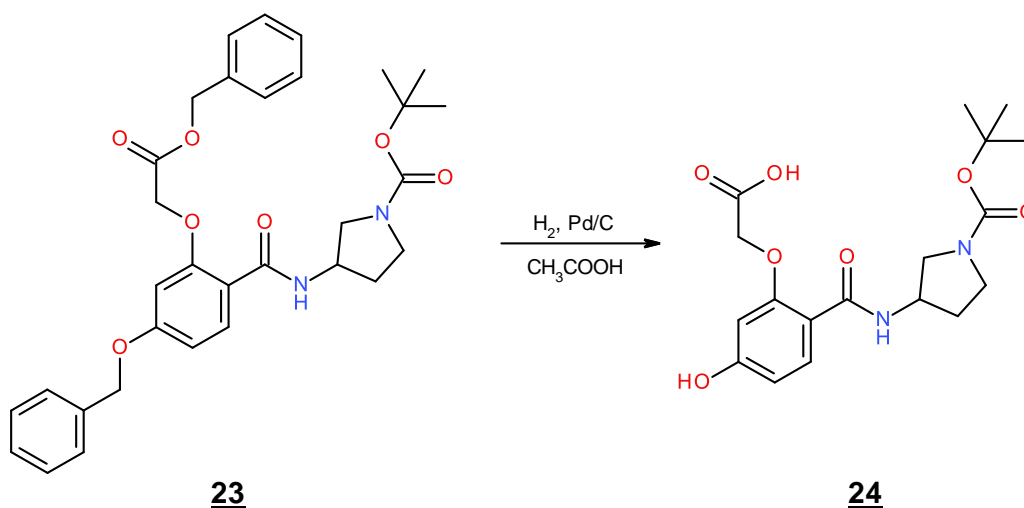
Rezultati

Izgled	večji beli delci
Mr	560.25
η	54 %
Rf	0.64 (MF: EtOAc/heksan = 1/1)
Tt	92 – 100 °C
¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 1.49 (s, 9H, Boc), 1.96-2.11 (m, 1H, -CH ₂ -), 2.24 (ddd, J = 13.3, 12.8, 6.3 Hz, 1H, -CH ₂ -), 3.36 (dd, 2H, pirolidin), 3.43-3.53 (m, 1H, -CH ₂ -), 3.53-3.64 (m, 1H, -CH ₂ -), 3.78 (dd, J = 11.0, 6.6 Hz, 1H, -CH ₂ -), 4.66 (ddd, J = 12.6,

	12.8, 6.5 Hz, 1H, -CH-), 4.70 (s, 2H, -O-CH ₂ -CO-O-), 5.09 (s, 2H, Ph-CH ₂ -O-CO-), 5.30 (s, 2H, Ph-CH ₂ -O-), 6.42 (d, <i>J</i> = 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 6.73 (dd, <i>J</i> = 6.4, 2.4 Hz, 1H, Ar-H), 7.33-7.46 (m, 10H, Ar-H), 8.22 (d, <i>J</i> = 8.8 Hz, 1H, Ar-H), 8.57 (d, <i>J</i> = 6.4 Hz, 1H, -CO-NH-) ppm
IR (KBr)	$\bar{\nu}$ = 3473, 3381, 3070, 2974, 2875, 1750, 1685, 1643, 1610, 1501, 1416, 1271, 1222, 1190, 1108, 1060 cm ⁻¹
MS ESI	<i>m/z</i> = 505.2 (100), 561.3 ([MH] ⁺ , 54)
HRMS	izmerjena vrednost: 561.2601 (izračunana vrednost za C ₃₂ H ₃₇ N ₂ O ₇ : 561.2606)

4.7.3. Sinteza 2-[2-[(1-*tert*-butoksikarbonilpirolidin-3-il)karbamoil]-5-hidroksifenoksi]ocetne kisline (**24**)

Reakcija



Postopek

V bučko smo zatehtali spojino **23** (180 mg, 0,321 mmol), ji dodali 30 mL očetne kisline in preprihovali z argonom približno 20 minut. Nato smo k reakcijski zmesi dodali približno 20 mg paladija in suspenzijo preprihovali z vodikom ter jo pustili na mešalu pod vodikovo atmosfero. Naslednji dan smo odstranili katalizator in uparili očetno kislino z rotavaporjem. Preostanek smo raztopili v EtOAc. Pomagali smo si z ultrazvočno kadičko in segrevanjem pod refluxom. Raztopino smo čez noč postavili v zamrzovalnik. Naslednji dan smo nastalo oborino segreti na sobno temperaturo in jo odfiltrirali. Produkt smo posušili s črpalko in dobili 36 mg (0,095 mmol) bež kristalov (**24**).

Rezultati

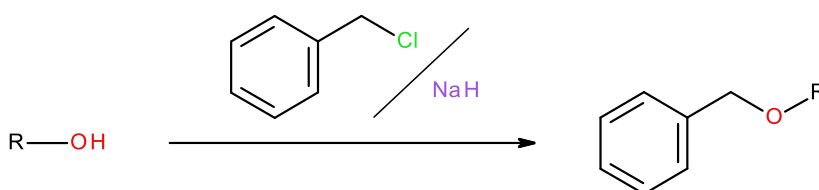
Izgled	bež kristali
--------	--------------

Mr	380.16
η	30 %
Rf	0.00 (MF: EtOAc + 3 kapljice očetne kisline)
Tt	145 – 153 °C
¹H NMR (400 MHz, CDCl ₃)	δ = 1.39 (s, 9H, Boc), 1.95 (ddd, J = 12.9, 13.6, 6.5 Hz, 1H, -CH₂-), 2.04-2.20 (m, 1H, -CH₂-), 3.18 (td, J = 11.7, 5.3 Hz, 1H, -CH₂-), 3.24-3.36 (m, 1H, -CH₂-), 3.37-3.48 (m, 1H, -CH₂-), 3.55 (ddd, J = 14.7, 10.6, 6.2 Hz, 1H, -CH₂-), 4.39 (ddd, J = 13.6, 7.1, 6.3 Hz, 1H, -CH-), 4.73 (s, 2H, -O-CH₂-CO-), 6.43 (d, J = 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 6.49 (dd, J = 6.8, 2.0 Hz, 1H, Ar-H), 7.80 (d, J = 8.4 Hz, 1H, ArH), 8.80 (s, 1H, -CO-NH-), 10.23 (br, 1H, Ar-OH), 12.6 (bs, 1H, -COOH) ppm
¹³C NMR (400 MHz, DMSO)	δ = 28.13, 29.68, 49.24, 50.98, 51.49, 65.76, 78.26, 100.31, 108.45, 112.49, 132.68, 153.51, 157.26, 161.62, 164.18, 170.37 ppm
IR (KBr)	$\bar{\nu}$ = 3347, 2979, 1754, 1666, 1611, 1549, 1434, 1290, 1239, 1187, 1114, 1068 cm⁻¹
MS ESI	m/z = 379.1 ([MH]⁺, 100)
HRMS	izmerjena vrednost: 379.1505 (izračunana vrednost za C₁₈H₂₃N₂O₇: 379.1499)

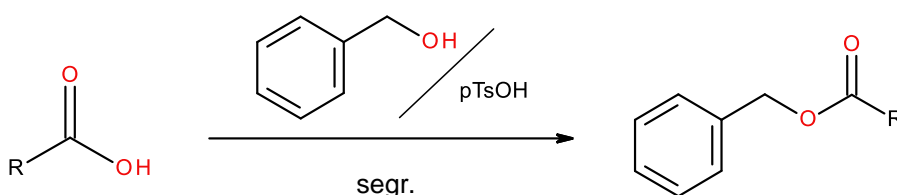
5. RAZPRAVA IN REZULTATI

5.1. RAZPRAVA SINTEZNIH POSTOPKOV

Pri sintezi vseh naših spojin smo izhajali iz 4-benziloksi-2-(benziloksikarbonilmetoksi) benzojske kisline (**1**), ki ima zaščiteni karboksilno skupino na mestu 2 in hidroksilno skupino na mestu 4 benzenskega obroča, zaradi česar je izboljšana njena topnost v organskih topilih in s tem omogočeno lažje čiščenje in izolacija končnih produktov. Zaščiteni skupini sta v obliki benzilnega estra oz. etra, ki ju odstranimo s katalitskim hidrogeniranjem. Na mestu 1 ima spojina **1** prosto -COOH skupino za vezavo aminov. Z zaščito omenjenih funkcionalnih skupin dosežemo selektivnost poteka reakcij na prosti -COOH skupini, saj se z uvedbo benzilne zaščite (Slika 8, Slika 9) izognemo nukleofilnim substitucijam karboksilne skupine na mestu 2 benzenskega obroča, hkrati pa zaščitimo šibko kislno hidroksilno skupino, ki deluje kot nukleofil.



Slika 8: Uvedba benzilne zaščite na hidroksilno skupino (nukleofilna S_N2 substitucija na benzilnem ogljiku).



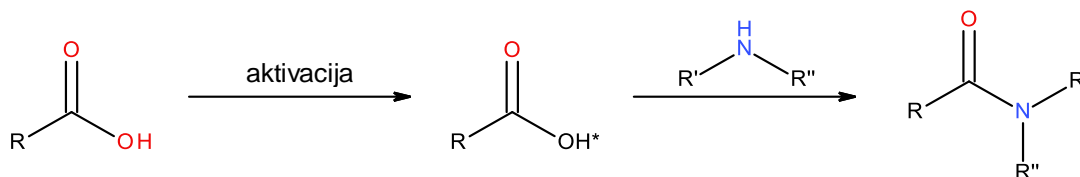
Slika 9: Uvedba benzilne zaščite na karboksilno skupino z uporabo *p*-toluensulfonske kisline.

Pri tvorbi spojin **9**, **11**, **13**, **15**, **17**, **19** in **23** smo uporabljali enak sintezni postopek. Spojini **1** smo dodali amin (**2** – **8**), sklopitveni reagent EDC, pomožna nukleofila HOBt in DMAP, Et_3N in raztopili v polarnem aprotičnem topilu CH_2Cl_2 . Epruveto z reakcijsko zmesjo smo postavili v mikrovalovni reaktor, ki skozi celoten potek reakcije zagotavlja homogenost mikrovalovnega obsevanja v električnem polju in vzdrževanje enakomerne temperature.

Energija se prenaša kinetično, mikrovalovi prehajajo steno epruvete in reakcijska zmes jih absorbira. Takšno obsevanje je boljše od konvencionalnega gretja, saj reakcije potečejo hitreje in bolj selektivno, z manj stranskimi produkti. Reakcija v mikrovalovnem reaktorju vključuje termolizo oz. razpad amonijeve soli (kislinsko – bazno ravnotežje) in spodbuja nukleofilni napad amina na karbonilni del kisline ter odstranitev vode (29). Tvori se amidna vez.

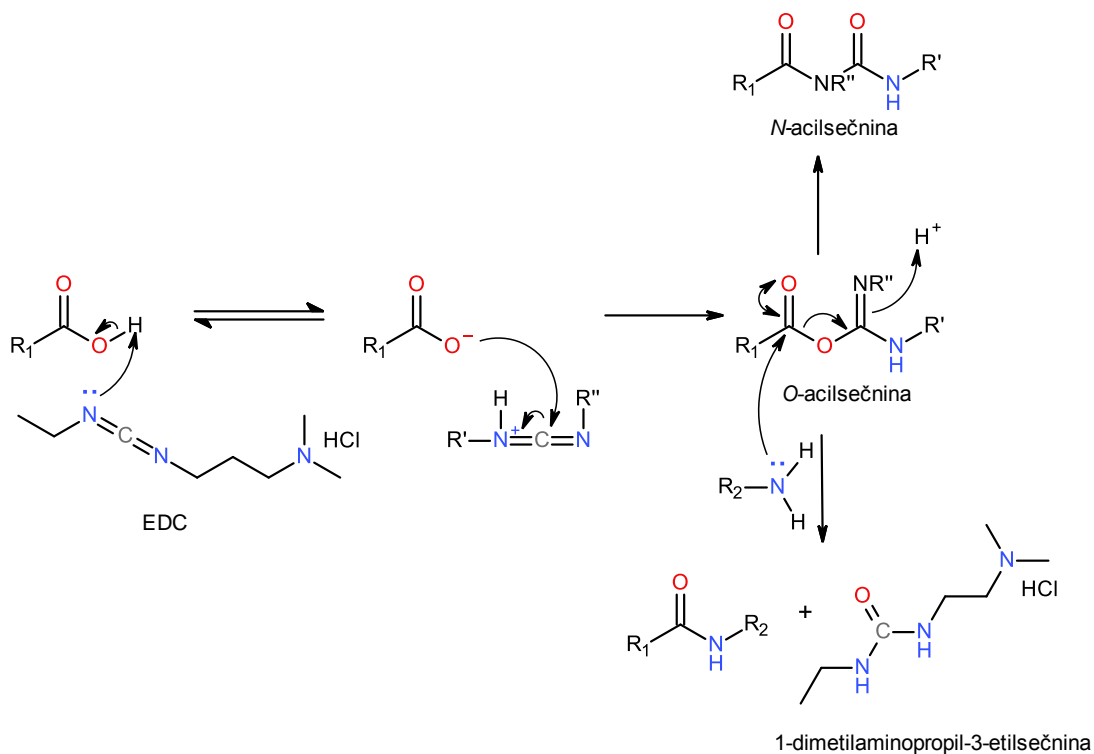
Tvorba amidne vezi

Amidno vez običajno tvorimo z združitvijo karboksilne kisline in amina, vendar pa karboksilna in amino funkcionalna skupina pri sobnih pogojih ne reagirata spontano, saj začne eliminacija vode, ki je nujna za tvorbo amidne vezi, potekati šele pri temperaturah višjih od 200 °C. Zaradi tega je pred dodatkom amina h kislini potrebna aktivacija karboksilne skupine, ki praviloma poteka s pretvorbo -OH skupine v dobro izstopajočo skupino (Slika 10) (30).



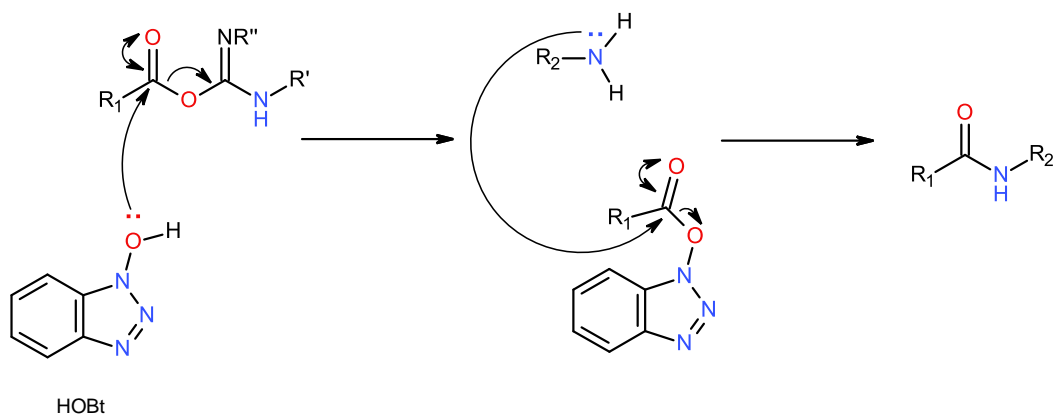
Slika 10 (30): Prikaz aktivacije -OH skupine (-OH* = aktivirana -OH skupina), ki je pogoj za nadaljnjo tvorbo amidne vezi.

Za aktivacijo karboksilne kisline smo pri tvorbi amidnih vezi naših spojin uporabili sklopitveni reagent EDC, ki spada v skupino karbodiimidov. Mehanizem njegovega delovanja je prikazan na sliki 11. V prvem koraku nastane *O*-acilsečninski intermediat, sledi nukleofilni napad amino skupine in nastanek amida. Stranski produkt te reakcije je 1-dimetilaminopropil-3-etilsečnina, ki je vodotopna v kislem in jo odstranimo z ekstrakcijo (30). Aktivacija -OH dela karboksilne skupine mora poteči hitro, saj lahko v nasprotnem primeru pride do deaktivacije sklopitvenega reagenta (31).



Slika 11 (32): Mehanizem delovanja EDC.

Aktivacija karboksilne kisline hitreje poteče v nepolarnih topilih, zato smo pri naših reakcijah uporabljali diklorometan. Z uporabo nepolarnega topila in pomožnih nukleofilov HOBt in DMAP smo zmanjšali obseg nastanka *N*-acilsečninskega ter drugih stranskih produktov (33, 34). Pomožna nukleofila reagirata z *O*-acilsečnino in s tem preprečita njeno premestitev do *N*-acilsečnine. Nastane intermediat, iz katerega po reakciji z aminom dobimo amid (Slika 12) (35).

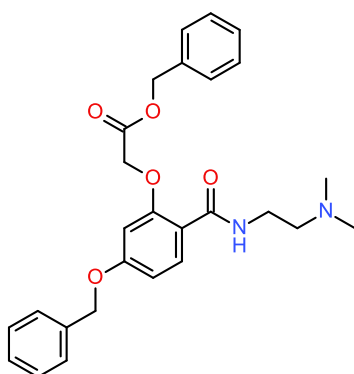


Slika 12 (32): Mehanizem delovanja HOBt.

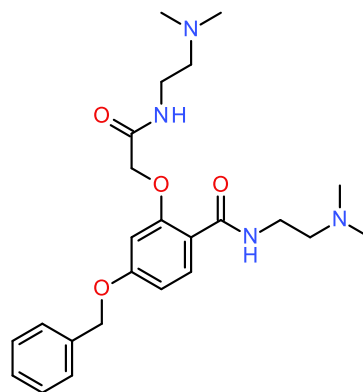
Poleg sklopitvenega reagenta in pomožnih nukleofilov smo k reakcijski zmesi dodali prebitek baze Et₃N. Ta nevtralizira kislino do nastanka soli, ki je močnejši nukleofil in s tem katalizira aktivacijo karboksilne skupine (31).

Sinteza 4-benziloksi-N-[2-(dimetilamino)etil]-2-[2-[2-(dimetilamino)etilamino]-2-okso-etoksi]benzamida (**11**)

V primeru tvorbe amidne vezi z aminom **3** je namesto želene spojine benzil 2-[5-benziloksi-2-[2-(dimetilamino)etilkarbamoil]fenoksi]acetata (**25**) nastala spojina **11**, ker se je amin vezal tudi na -COOH na mesto 2 izhodne spojine, ki naj bi bila zaščitena v obliki benzilnega estra.

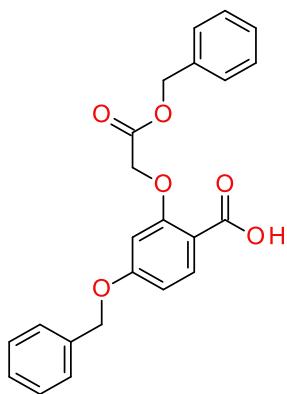


25

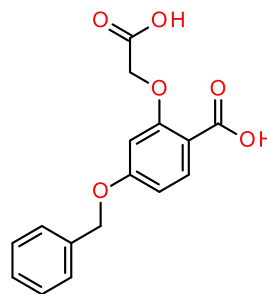


11

Iz poteka te reakcije sklepamo, da izhodna spojina verjetno ni bila popolnoma čista, ampak zmes spojine **1** in stranskega produkta 4-benziloksi-2-(karboksimetoksi)benzojske kisline (**26**).



1



26

Pri izolaciji spojine smo imeli težave, saj je produkt zelo polaren, posledično je bil tudi izkoristek reakcije slab. Reakcijska zmes se je začela obarjati, na koncu pa smo po dveh poizkusih uspeli izolirati v začetku nenačrtovano spojino **11**, ki ni derivat 2-(2-karbamoil-5-hidroksifenoksi)ocetne kisline. Sintetizirana spojina nima -COOH skupine, ki bi tvorila interakcije s C-terminalno domeno vezavnega mesta encima Ddl.

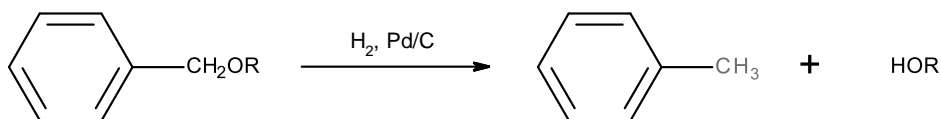
Čiščenje spojin

Po vezavi aminov na izhodno spojino **1**, je bilo v reakcijski zmesi opaznih še kar nekaj nečistot (izhodna kislina, pomožna nukleofila, EDC), ki smo se jih znebili v večji meri z ekstrakcijo. Lipofilne spojine **9**, **11**, **13**, **15**, **17**, **19** in **23** so ostale v organski fazi, vodno pa smo zavrgli. V večini primerov smo po ekstrakciji v organski fazi s TLC še vedno zaznali prisotnost nekaterih nečistot, ki smo se jih znebili s čiščenjem s klasično kolonsko kromatografijo. Mobilne faze smo izbirali na podlagi potovanja spojin na TLC aluminijski ploščici.

Končne spojine **10**, **12**, **14**, **16**, **18**, **20** in **24** smo očistili s filtriranjem, s katerim smo se znebili paladija. Topilo smo uparili z rotavaporjem. S postopkom kristalizacije s počasnim dodajanjem nepolarnih topil po kapljicah smo se znebili še zadnjih nečistot. Čiščenje končnih spojin **12** in **16** smo zaradi netopnosti v nepolarnih topilih izvedli z metodo reverznofazne kromatografije na izoleri. Za mobilno fazo smo uporabili gradient bidestilirane vode in CH₃CN ter 1% očetne kisline.

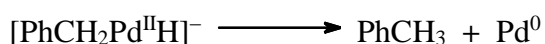
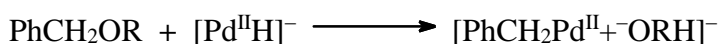
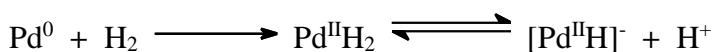
Katalitsko hidrogeniranje

Določene funkcionalne oziroma zaščitne skupine lahko popolnoma odstranimo in nadomestimo z vodikom (hidrogenoliza). Aromatske substituentne pogosto odstranimo s hidrogeniranjem preko prehodnih kovinskih katalizatorjev (katalitsko hidrogeniranje) (36).



Slika 13 (36): Katalitsko hidrogeniranje z uporabo kovinskega katalizatorja paladija.

Pri hidrogenolizi benzilnih zaščitnih skupin pride do napada O^- (*oksidativna adicija*) na aktiviran kovinski katalizator, pri čemer nastane vmesni intermediat kot je prikazano spodaj. Hidrogenoliza se zaključi z reduktivno eliminacijo kovine. Zaradi lahke cepitve benzil-kisikove vezi je benzilna zaščitna skupina uporabna tudi pri večstopenjskih sintezah (36).



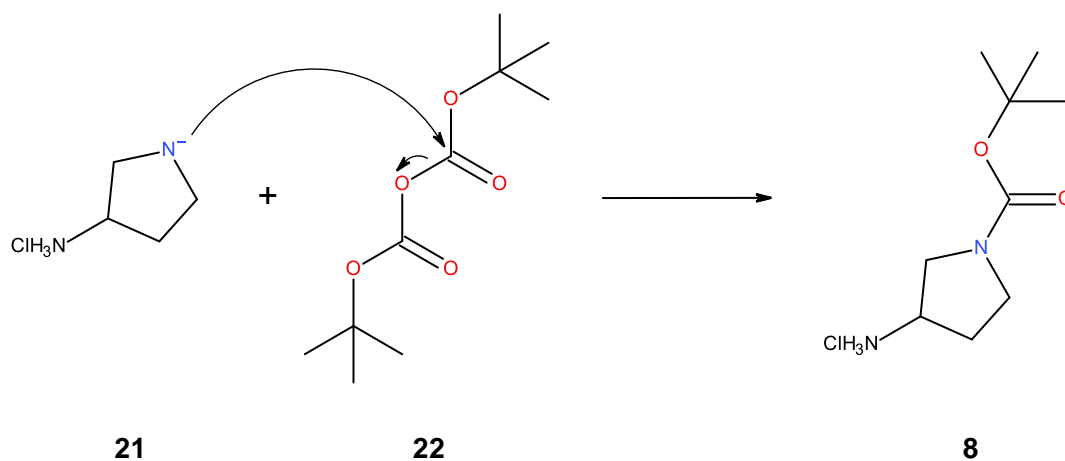
Hidrogeniranje amidne vezi zahteva ostrejšje pogoje, zato smo se s katalitskim hidrogeniranjem s paladijem znebili le obeh benzilnih zaščitnih skupin in se s tem izognili hkratni cepitvi amidne vezi (36).

Odščito spojin **9**, **11**, **13**, **15**, **17**, **19** in **23** smo torej izvajali s postopkom katalitskega hidrogeniranja z uporabo H_2 in katalizatorja paladija, adsorbiranega na ogljik. Izhodne spojine smo raztopili v očetni kislini. Bučko z reakcijsko zmesjo smo najprej nekaj minut preprihovali z argonom, da smo se znebili kisika in s tem preprečili vžig, saj je Pd/C na zraku in v prisotnosti organskega topila zelo reaktiven. Nato smo dodali fino uprašeno kovino, dispergirano na inertni ogljik, ter preprihovali še z vodikom. Hidrogeniranje poteka na površini kovine. H_2 se adsorbira na površino paladija, H-H vezi se cepijo in vodikovi atomi reagirajo s substratom, ki se nato veže na katalizator (32). Bučko smo vsakokrat pustili čez noč na mešalu, da je reakcija v celoti potekla.

Sinteza 1-(*tert*-butoksikarbonil)pirolidin-3-amonijevega klorida (**8**)

Pri sintezi amina **8** smo izhajali iz kupljenega 3-aminopirolidinijevega diklorida **21**, ki smo mu v obliki Boc skupine zaščitili pirolidinski amin. Obročni amin je bolj bazičen kot amin vezan na mesto 3. Za še večjo selektivnost smo poskrbeli s počasnim dodajanjem Boc-anhidrida in izvajanjem reakcije na ledeni kopeli. Uvajanje Boc zaščite je potekalo ob prisotnosti baze NaOH, ki je deprotonirala obročni amin, bila pa je pomembna tudi za nevtralizacijo reakcijske zmesi, saj se pri reakciji sprošča HCl. Po poteku reakcije smo topilo uparili in preostanek raztopili v EtOH. Nastalo oborino (NaCl) smo odfiltrirali. S

sintetiziranim aminom **8** smo šli naprej v sintezo spojine **23**, ki smo jo nato odščitili z zgoraj opisanim postopkom katalitskega hidrogeniranja, s katerim smo dosegli selektivno odščito benzilnih skupin in se izognili odcepu Boc. Ta zahteva ostrejšje pogoje odščite v kislem s trifluoroocetno kislino.

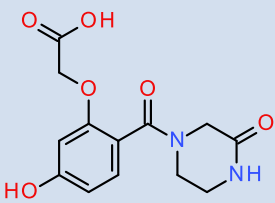
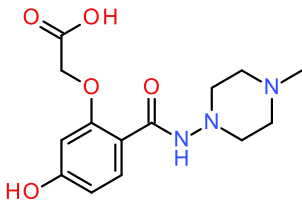
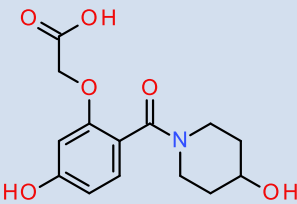
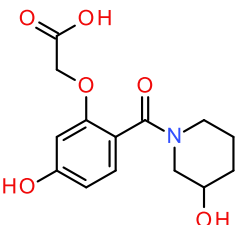
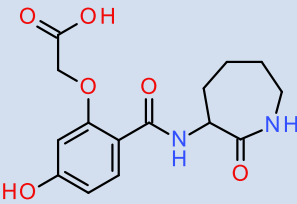


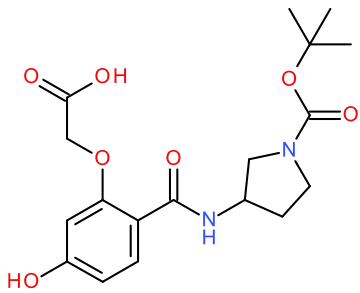
Slika 14: Nukleofilni napad obročnega dušika na elektrofilno skupino anhidrida (ogljik karbonilne skupine) pri uvajanju Boc zaščite na 3-aminopirrolidinijev diklorid.

5.2. BIOKEMIJSKO TESTIRANJE

Sintetiziranim spojinam **10**, **14**, **16**, **18**, **20** in **24** so na Katedri za farmacevtsko kemijo Fakultete za farmacijo testirali zaviralno delovanje na encim DdlB bakterije *E. coli*. Rezultati zaviralne aktivnosti pri koncentraciji 250 μM so prikazani v Preglednici I.

Preglednica I: Prikaz rezultatov biokemijskega testiranja.

OZNAKA SPOJINE	STRUKTURA SPOJINE	c (μM)	RA [%]
10		250	97
14		250	95
16		250	90
18		250	92
20		250	92

<u>24</u>		250	91
-----------	---	-----	----

Rezidualna aktivnost (RA) je razmerje med katalitično aktivnostjo encima DdlB v prisotnosti testiranega zaviralca in aktivnostjo encima v odsotnosti zaviralca. Izražena je v odstotkih: 100 % RA pomeni odsotnost zaviralne aktivnosti, 0 % pa popolno zaviranje encima. Vrednosti rezidualne aktivnosti naših spojin so med 90 in 97 %, kar pomeni, da sintetizirane spojine ne zavirajo encima DdlB. Pri interpretaciji rezultatov moramo upoštevati tudi vrednost eksperimentalne napake ± 10 %.

Razlogov za slabo vezavo spojin v aktivno mesto izoliranega encima je lahko več:

- zaradi možne nepravilne konformacije spojin je lahko predpostavljen model napačen
- možen pojav tautomerije amid – imid (hitre izmenjave dvojne vezi in vodika) in posledična položajna izomerija
- nestabilnost encima med pripravo: DdlB iz *E. coli* je fleksibilna struktura, kristaliziran encim z zaprtim aktivnim mestom, ki se odpre pri določenih pogojih (pH, T) in je kemijsko in termično nestabilen

6. SKLEP

V okviru magistrske naloge smo sintetizirali nove spojine kot potencialne zaviralce encima ligaza D-Ala:D-Ala. Izhajali smo iz 4-benziloksi-2-(benziloksikarbonilmetoksi)benzojske kisline, ki smo ji na prosto -COOH skupino pripenjali različne amine. S katalitskim hidrogeniranjem smo na koncu odstranili benzilni zaščiti na mestih 2 in 4. Sintetizirali smo šest derivatov 2-(2-karbamoil-5-hidroksifenoksi)ocetne kisline. Z vezavo aaminskih derivatov smo želeli optimizirati delovanje že znanih analogov prehodnega stanja encimsko katalizirane reakcije nastanka dipeptida D-Ala-D-Ala, ki imajo vlogo lažnih substratov, vendar pa zaradi svoje polarnosti slabo prehajajo v notranjost bakterijske celice in zato ne izkazujejo protibakterijske aktivnosti.

Pri tvorbi amidnih vezi s sklopitvenimi reakcijami nismo imeli večjih težav. Z uporabo mikrovalovnega reaktorja smo zagotovili večjo selektivnost in hitrejši potek reakcij. Najslabši izkoristek reakcije smo dosegli pri sintezi nenačrtovane spojine **11**, saj je v tem primeru namesto izhodne kisline reagirala nečistota z dvema karboksilnima skupinama. K slabemu izkoristku je nekoliko prispevala tudi prisotnost dveh polarnih verig. Po odščiti spojine **11** smo zato produkt **12**, z namenom manjših izgub, očistili z metodo reverznofazne kromatografije. Enak postopek čiščenja smo uporabili tudi pri izolaciji spojine **16**. Ostale končne spojine smo čistili s postopkom kristalizacije, vmesne spojine pa najprej z ekstrakcijo in nato s kolonsko kromatografijo. Pri izolaciji spojine **13** smo v drugem poizkusu ekstrakcijo izpustili, saj smo sprva ves produkt izgubili v vodno fazo. K nekoliko večji polarnosti in netopnosti te spojine v organskih topilih prispeva na mesto 2 (na amidno skupino) vezan 4-metilpiperazin.

Test na encimsko aktivnost je pokazal, da končne spojine nimajo zaviralnega učinka na DdlB bakterije *E. coli*, saj so vrednosti rezidualne aktivnosti encimov med 90 in 97 %. Kljub načrtovanju in z virtualnim rešetanjem predpostavljene vezavi spojin, so rezultati zaviralne aktivnosti sintetiziranih spojin slabi. K temu skupno prispeva več razlogov (konformacija spojin, tautomerija, nestabilnost encima), med drugim pa moramo biti kritični tudi do same metode virtualnega rešetanja, saj pri napovedi biološke aktivnosti ne upošteva vseh fizikalno-kemijskih značilnosti spojin. Vsi programi, ki sidrajo spojine, uporabljajo poenostavljeno Schrödingerjevo enačbo. Pri modeliranju je zelo pomembno tudi, katero enačbo uporabimo. Za en encim in en tip spojin je boljša ena enačba, za drug

tip pa druga. Prav tako lahko pride tudi do napak v kristalni strukturi pri kristalizaciji encima, zato je možno, da ne vidimo prave slike. Encim se odpira in zapira. Zaenkrat še ne vemo, kaj je tisti sprožilec, ki strukturo odpre in zapre. Tudi če načrtujemo spojine, ki se idealno vežejo v zaprto obliko encima, nam to nič ne pomaga, če ta spojina hkrati ne odpira encima.

7. VIRI IN LITERATURA

1. **El Zoeiby A, Sanschagrín F, Levesque RC:** Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Molecular Microbiology*, 2003, 47(1): 1 – 12.
2. **Besong GE, Bostock JM, Stubbings W, Chopra I, Roper DI, Lloyd AJ, Fishwick CW, Johnson AP:** A de novo designed inhibitor of D-Ala-D-Ala ligase from *E. coli*. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2005, 44: 6403 – 6406.
3. **Kladnik – Jenuš B:** *Farmakologija: učbenik za študente Visoke zdravstvene šole*. Maribor, 2006.
4. **Dale MM, Haylett DG:** Antibacterial agents. *Pharmacology Condensed, Elsevier limited*, 2009: 106 – 112.
5. The Action Of Antimicrobial Drugs. *Midlands Technical College*. [Dostop: 15. april 2016.] <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio225/chap20/ss2.htm>
6. **Mitscher LA:** Antibiotics and Antimicrobial Agents. [avt. knjige] Williams DA, Lemke TL: *Foye's Principles of Medicinal Chemistry*. s.l., Lippincott Williams & Wilkins, 2002: 822.
7. **Wright GD:** Mechanisms of resistance to antibiotics. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2003, 7: 563 – 569.
8. Insights into Antibiotic Resistance Through Metagenomic Approaches. *Medscape*. [Dostop: 31. marec 2016.] http://www.medscape.com/viewarticle/756378_2
9. **Pray LA:** Transposons: The jumping genes. *Nature Education*, 2008, 1(1): 204.
10. **Gobec S, Urleb U:** Inhibitorji biosinteze peptidoglikana. *Farmaceutski vestnik*, 1999, 50: 183 – 193.
11. **Vollmer W, Blanot D, De Pedro MA:** Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32: 149 – 167.

12. Insect Immunology Part 1. *What-when-how*. [Dostop: 27. april 2016] <http://what-when-how.com/insect-molecular-biology-and-biochemistry/insect-immunology-part-1/>
13. **Vehar B:** *Odkrivanje novih inhibitorjev D-alanil-D-alanin ligaze z virtualnim reševanjem (Diplomska naloga)*. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2008.
14. **Labischinski H, Maidhof H:** In *Bacterial Cell Wall*, Elsevier Science B.V., Amsterdam, 1994: 23 – 27.
15. **Barreteau H, Kovač A, Boniface A, Sova M, Gobec S, Blanot D:** Cytoplasmic steps of peptidoglycan biosynthesis. *FEMS Microbiology Reviews*, 2008, 32: 168 – 207.
16. **Scheffers DJ, Pinho M:** Bacterial Cell Wall Synthesis: New Insights from Localization Studies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2005, 69(4): 585 – 588.
17. **Van Heijenoort J:** Lipid Intermediates in the Biosynthesis of Bacterial Peptidoglycan. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2007, 71(4): 620 – 635.
18. **Van Heijenoort J:** Biosynthesis of the bacterial peptidoglycan unit. [avt. knjige] Ghuyssen J-M, Hackenbeck R: *Bacterial Cell Wall*, 1994: 39 – 54.
19. **Tytgat I, Colacino E, Tulkens PM, Poupaert JH, Prévost M, Van Bambeke F:** DD-Ligases as a Potential Target for Antibiotics: Past, Present and Future. *Current Medicinal Chemistry*, 2009, 16: 2566 – 2580.
20. **Zawadzke LE, Bugg TD, Walsh CT:** Existence of two D-alanine:D-alanine ligases in *Escherichia coli*: cloning and sequencing of the *ddlA* gene and purification and characterization of the DdlA and DdlB enzymes. *Biochemistry*, 1991, 30(6): 1673 – 1682.

21. **Škedelj V, Arsovska E, Tomašič T, Kroflič A, et al.:** 6-Arylpyrido[2,3-*d*]pyrimidines as Novel ATP-Competitive Inhibitors of Bacterial D-Alanine:D-Alanine Ligase. *PLoS One*, 2012, 7(8): e39922.
22. **Healy VL, Lessard I, Roper DI, Knox JR, Walsh CT:** Vancomycin resistance in enterococci: reprogramming of the D-Ala–D-Ala ligases in bacterial peptidoglycan biosynthesis. *Chemistry & Biology*, 2000, 7(5): R109 – R119.
23. COMPLEX OF D-ALA:D-ALA LIGASE WITH ADP AND A PHOSPHORYL PHOSPHONATE. *RCSB Protein Data Bank*. [Dostop: 30. april 2016] <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?structureId=1IOV>
24. **Fawaz MV, Topper M, Firestine SM:** The ATP-Grasp Enzymes. *Bioorganic Chemistry*, 2011, 39(5 – 6): 185 – 191.
25. **Kovač A, Majce V, Lenaršič R, Bombek S, Bostock JM, Chopra I, Polanc S, Gobec S:** Diazenedicarboxamides as inhibitors of D-alanine-D-alanine ligase (Ddl). *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 2007, 17(7): 2047 – 2054.
26. **Neuhaus FC, Lynch JL:** The enzymatic synthesis of D-alanyl-D-alanine. 3. On the inhibition of D-alanyl-D-alanine synthetase by the antibiotic D-cycloserine. *Biochemistry*, 1964, 3: 471 – 480.
27. **Liu S, Chang JS, Herberg JT, Horng MM, Tomich PK, Lin AH, Marotti KR:** Allosteric inhibition of *Staphylococcus aureus* D-alanine:D-alanine ligase revealed by crystallographic studies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2006, 103(41): 15178 – 15183.
28. **Mikec M:** *Sinteza dihidroksibenzamidnih zaviralcev biosinteze peptidoglikana (Magistrsko delo)*. Ljubljana, Fakulteta za farmacijo, Univerza v Ljubljani, 2016.
29. **Perreux L, Loupy A:** A tentative rationalization of microwave effects in organic synthesis according to the reaction medium, and mechanistic considerations. *Tetrahedron*, 2001, 57(45): 9199 – 9223.

30. **Valeur E, Bradley M:** Amide bond formation: beyond the myth of coupling reagents. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38(2): 606 – 631.
31. **Al-Warhi TI, Al-Hazimi HMA, El-Faham A:** Recent development in peptide coupling reagents. *Journal of Saudi Chemical Society*, 2012, 16(2): 97 – 116.
32. **Clayden J, Greeves N, Warren S:** *Organic Chemistry*. New York, Oxford University Press, 2012: 210-211, 214, 349-351, 391, 733.
33. **Carpino LA, El-Faham A:** The diisopropylcarbodiimide/1-Hydroxy-7-azabenzotriazole system: segment coupling and stepwise peptide assembly. *Tetrahedron*, 1999, 55(22): 6813 – 6830.
34. **Pearson AJ, Roush WR:** *Handbook of Reagents for Organic Synthesis, Activating Agents and Protecting Groups*. Chichester, John Wiley & Sons, 1999: 186 – 187.
35. **Montalbetti CAGN, Falque V:** Amide bond formation and peptide coupling. *Tetrahedron*, 2005, 61(46): 10827 – 10852.
36. **Carey FA, Sundberg RJ:** *Advanced Organic Chemistry: Part B: Reaction and Synthesis*. Charlottesville, University of Virginia, 2007: 394 – 396.